



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia
Laboratório de Virologia básica e aplicada

Caracterização biológica e filogenética de uma amostra de *Vaccinia virus* silvestre - SPAn232 (SAV)

Maisa Nascimento Soares Amaral

Belo Horizonte

2019.

MAISA NASCIMENTO SOARES AMARAL

**Caracterização biológica e filogenética de
uma amostra de *Vaccinia virus* silvestre -
SPAn232 (SAV)**

Monografia apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do Título de Especialista em Microbiologia Aplicada.

Orientação: Dr. Thiago Lima Leão
Laboratório de Virologia Básica e Aplicada – LVBA

UFMG
2019

*Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas,
aos meus amados pais Maria das Graças e “Coio” (In memoriam).*

Agradecimentos

Agradeço à minha mãe **Maria das Graças Nascimento** e ao meu amado **Pablo Nunes Agra Belmonte** pelo amor imensurável, pelo apoio incondicional e pelo sustento emocional, psicológico e principalmente financeiro que me permitiram essa conquista. Nenhuma palavra é capaz de transmitir minha imensa gratidão a vocês por tudo que apoiaram até aqui. Agradeço também a minha família, incluindo meu sogro João e minha querida sogra **Silvana** que facilitaram, auxiliaram e me ajudaram muito durante todo esse processo. Aos amigos agradeço por todo carinho, amor e estímulo, e por estarem presentes nos momentos de relaxamento e descanso, principalmente a minha amiga **Silvinha**, que confiou em mim permitindo assim essa grande oportunidade de desenvolver este trabalho. Aos companheiros de classe por tornar essa conquista mais prazerosa e a todos os membros do LVBA obrigada pela companhia e alegrias do dia a dia e que de alguma forma contribuíram para meu crescimento e aprendizagem; em especial a **Karine**, que além de amiga me ajudou sempre que precisei, me ensinando, orientando e até “salvando nos fins de semana”. Aos professores **Flávio** e Ediel obrigada por receberem tão bem, obrigada pela confiança, pelos ensinamentos e orientação durante todos esses anos.

Em especial deixo o meu muito obrigada ao meu amigo e orientador **Thiago** que desde quando comecei esse trabalho me acolheu de braços abertos e de boa vontade. Você com certeza é a chave para esta conquista. Me ensinou, me orientou, me ajudou. Hoje todo o amor que eu tenho pela virologia é graças a você que sempre tinha um tempinho para me mostrar como isso tudo é tão incrível e bonito. Com toda certeza digo: essa conquista é nossa! pois você esteve o tempo todo comigo nesta batalha e por isso sou imensamente grata a tudo que você me proporcionou.

RESUMO

A amostra *SPAn232 virus* (SPAnV) foi isolada na década de 60 na floresta de Cotia no estado de São Paulo durante um programa de vigilância epidemiológica do governo e foi originalmente agrupada como um *Cotia virus* (COTV - amostra que circulava nas mesmas regiões onde o SPAnV ocorria) devido a reações sorológicas cruzadas comuns entre os Poxvírus. Porém, um estudo molecular posterior baseado nas sequências dos genes TK, VGF e ATI reclassificou a amostra como uma variante de *Vaccinia virus*, sendo renomeada como SPAn232 (SAV) (DA FONSECA *et al.*, 2002). Outros estudos confirmaram a relação filogenética entre a variante SAV e outros *Vaccinia virus-brasileiros* VACV-BR (DRUMOND, *et al.* 2008). Contudo, um estudo mais recente (AFONSO., *et al.* 2012) usando outras amostras coletadas pelo Instituto Adolfo Lutz sugeriu uma possível contaminação com VACV da amostra de COTV estudada nos laboratórios da Universidade Federal de Minas Gerais. Neste trabalho, portanto, com o intuito de confirmar se SPAn232 poderia ser classificado como sendo uma possível linhagem de VACV, realizamos uma série de análises em um estudo biológico e molecular compreensivo da amostra onde abrangemos uma avaliação completa do ciclo de multiplicação do vírus, do fenótipo de placas de lise, da formação de pústulas ou feridas (*pocks*) em membrana corioalantóide de ovos embrionados (MCA) e também o sequenciamento total de seu genoma. O perfil do ciclo de multiplicação do vírus e a morfologia de placa de lise apresentou bastante similaridade aos dados descritos na literatura para os *Vaccinia virus*. Com o sequenciamento e análise filogenética, o genoma da amostra SAV revelou estar intimamente relacionado ao genoma da amostra de *Vaccinia virus Western Reserve* (VACV-WR protótipo dos *Vaccinia virus* e usado aqui como referência) variando apenas no comprimento e no percentual de identidade de 6 ORFs (do inglês *open reading frame* ou janela de leitura aberta). Com base nos resultados apresentados neste trabalho pressupõe-se que o isolado *SPAn232 virus* (SPAnv) é mais uma amostra variante de VACV brasileira que circulou e foi isolada juntamente com o *Cotia virus* (COTV) nas florestas brasileiras na década de 60.

ABSTRACT

The SPAn232 virus (SPAnV) sample was isolated in the 1960s in the Cotia forest in the state of São Paulo during a government epidemiological surveillance program and was originally grouped as a *Cotia virus* (COTV - sample that circulated in the same regions where the SPAnV occurred) due to common serological cross-reactions among Poxviruses. However, a subsequent molecular study based on the sequences of the TK, VGF and ATI genes reclassified the sample as a variant of *Vaccine virus*, being renamed SPAn232 (SAV) (DA FONSECA *et al.*, 2002). Other studies confirmed the phylogenetic relationship between the SAV variant and other *Vaccinia virus*-Brazilian VACV-BR (DRUMOND, *et al.* 2008). However, a more recent study (AFONSO *et al.*, 2012) using other samples collected by the Adolfo Lutz Institute suggested a possible VACV contamination of the COTV sample studied in the laboratories of the Federal University of Minas Gerais (UFMG). This work, therefore, in order to confirm if SPAn232 could be classified as a possible VACV strain, we performed a series of analyzes in a comprehensive biological and molecular study of the sample where we covered a complete evaluation of the virus multiplication cycle, phenotype of lysis plaques, formation of pustules or sores (pocks) in embryonic egg chorioallantoic membrane (MCA) and also the total sequencing of its genome. The pattern of the virus multiplication cycle and the lysis plate morphology presented a similarity to the data described in the literature for *Vaccinia virus*. With sequencing and phylogenetic analysis, the genome of the SAV sample was found to be closely related to the genome of the *Vaccinia virus* Western Reserve sample (*Vaccine virus* prototype VACV-WR and used herein as a reference) varying only in the length and percentage identity of 6 ORFs (open reading frame). Based on the results presented in this work it is assumed that the *SPAn232 virus* (SPAnv) isolate is another variant sample of Brazilian VACV that circulated and was isolated along with Cotia virus (COTV) in Brazilian forests in the 60's.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Relações filogenéticas na família <i>Poxviridae</i> – Fonte ICTV, 2019	14
Figura 2: Desenho esquemático representando a morfologia das diferentes partículas dos Poxvírus e suas estruturas. Fonte: Adaptado de Viral Zone, 2018 - https://viralzone.expasy.org	15
Figura 3: Representação esquemática da organização genômica dos Orthopoxvírus. A região central apresenta genes altamente conservados que codificam proteínas com funções essenciais, e as extremidades contêm os genes relativos a funções não essenciais. Fonte: adaptado de SMITH & MCFADDEN, 2002	17
Figura 4: Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos Poxvírus. Fonte: Adaptado de Viral Zone, 2018 - https://viralzone.expasy.org	19
Figura 5: Estados Brasileiros em que surtos de vaccínia bovina foram relatados. Adaptado de: DA FONSECA et al 2011	21
Figura 6: Imagem da amostra original encaminhada para nosso laboratório para estudos.	23
Figura 7: Base metodológica do sequenciamento Illumina, utilizando amplificação em ponte e clusterização de moléculas únicas. ADAPTADO DE MEDINI ET AL., 2008... 26	
Figura 8: Montagem do genoma - Contigs são gerados a partir do agrupamento de <i>reads</i> sobrepostas. Adaptado de RAMOS, 2011.....	27
Figura 9: Curva de ciclo único da amostra SAV e VACV-WR em células BSC-40. Monocamadas de células BSC-40 foram infectadas com as amostras virais SAV e VACV-WR na multiplicidade de infecção de 10. Nos tempos de 3, 6, 12, 24 e 48 horas após a infecção as células foram coletadas e, posteriormente, tituladas.....	35
Figura 10: Curva de ciclo único da amostra SAV em células BSC-40. Monocamadas de células BSC-40 foram infectadas com a amostra viral SAV na multiplicidade de infecção de 10. Em seguida, após uma hora de adsorção, a monocamada foi lavada e incubada com meio suplementado com 10% de SFB. Nos tempos de 3, 6, 12, 24 e 48 horas após a infecção as células foram coletadas e, posteriormente, tituladas.....	36
Figura 11: Ensaio de fenótipo de placa. O ensaio de fenótipo de placa da amostra SPAn232 vírus (SAV) vírus foi realizado em células BSC40, infectadas com 50 PFUs do vírus e incubadas por 48 horas. Após esse tempo as células foram fixadas com solução de 4% de formol e coradas com cristal violeta a 1%. A figura mais acinzentada a direita foi retirado do artigo de ABRAHÃO et al., 2009.	37
Figura 12: Visualização de <i>pocks</i> : Inoculação da amostra SPAn232 vírus (SAV) em membrana corioalantóide de ovos embrionados, mostrando a formação de <i>pocks</i> virais, característica clássica causada por vírus da família Poxviridae.	38
Figura 13: Gráfico sobre o conteúdo de bases das sequências - a) Gráfico de qualidade das sequências senso (Forward); b) Gráfico de qualidade das sequências anti-senso (Reverse).	39
Figura 14: Gráficos de qualidade das sequências gerados pelo FastQC; a) Gráfico de qualidade das sequências senso (Forward); b) Gráfico de qualidade das sequências anti-senso (Reverse).	39

Figura 15: Nível de duplicações das sequências – a) Gráfico de qualidade das sequências senso (Forward); b) Gráfico de qualidade das sequências anti-senso (Reverse).....	40
Figura 16: Gráficos de qualidade gerados pelo FastQC após a filtragem das sequências com <i>Trimmomatic</i> ; a) Gráfico de qualidade do Arquivo <i>paired-end</i> 1(R); b) Gráfico de qualidade do Arquivo <i>paired-end</i> (F).....	41
Figura 17: Gráficos de cobertura gerados na plataforma Galaxy Online após mapeamento e montagem com genoma de referência; a) Gráfico de qualidade do Arquivo <i>paired-end</i> 1(R); b) Gráfico de qualidade do Arquivo <i>paired-end</i> (F).	41
Figura 18: Representação tabular dos resultados da montagem de novo do genoma do SAV; a) resultados obtidos após a montagem com o programa Velvet; b) resultados obtidos após a montagem com o programa SPAdes	42
Figura 19: Gráficos do mapeamento dos <i>contigs</i> contra o genoma do VACV-WR como referência; a) Gráfico circos de mapeamento dos <i>contigs</i> obtidos com o programa <i>velvet</i> ; b) Gráfico circos de mapeamento dos <i>contigs</i> obtidos com o programa <i>SPAdes</i>	43
Figura 20: Reconstrução filogenética dos <i>Vaccinia Vírus</i> (VACV) pelo método estatístico de máxima verossimilhança	44

LISTA DE ABREVIATURAS

ACIP: Comitê Consultivo em Práticas de Imunizações

ARAV: *Araçatuba virus*

ATI: Corpúsculo de Inclusão do Tipo Acidófilico

BAV: *BeAn 58058 virus*

CDC: Centro para o Controle e Prevenção das Doenças

CEVs: vírus envelopados célula associados

CMC: carboximetilcelulose

COTV: *Cotia virus*

CPXV: *Cowpox virus*

CTGV: *Cantagalo virus*

D-MEM: Meio Eagle modificado por Dulbecco

DNA: Ácido desoxidorribonucleico

EEV: *extracellular enveloped virion* (vírus envelopado extracelular)

EUA: Estados Unidos

GAGs: glicosaminoglicanos

GP1V: *Guarani P1 virus*

GP2V: *Guarani P2 virus*

H.P.I: Horas pós infecção

HA: Hemaglutinina

IMV: *intracellular mature virion* (vírus maduro intracelular)

ITR's: *Inverted terminal repetitions* (repetições terminais invertidas)

kpb: kilobases

MCA: membrana corioalantóide

MOI: multiplicidade de infecção

NGS: *next generation sequencing* (sequenciamento de nova geração)

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPV: *Orthopoxvirus*

pb: pares de bases

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PFU: Unidades formadoras de placas

PSTV: *Passatempo virus*

RNA: ácido ribonucleico

SFB: soro fetal bovino

TK: Timidina Cinase

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro

VACV: *Vaccinia virus*

VACV-BR: *Vaccinia* brasileiros

VARV: *Variola virus*

VBH: *Belo Horizonte virus*

VGf: *vaccinia growth factor* (fator de crescimento viral)

WR: *VACV-Western Reserve*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Família <i>Poxviridae</i>	13
1.1.1. Classificação	14
1.1.2. Morfologia	15
1.1.3. Genoma	16
1.1.4. Ciclo de multiplicação.....	17
1.2. Vaccinia Vírus	20
1.2.1. Caracterização molecular dos VACV.....	22
1.3. Cotia Virus (COTV) e SPAn232 (SAV)	23
1.4. Sequenciamento de nova geração	23
1.4.1. Plataforma Illumina.....	25
1.4.2. Montagem e anotação do genoma.....	27
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo Geral	29
2.2. Objetivos Específicos.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. Sistemas celulares	30
3.1.1. Células BSC40.....	30
3.1.2. Membrana corioalantóide de ovos embrionados.....	30
3.2. Amplificação e origem da amostra <i>SPAn232 virus (SAV)</i>	30
3.3. Purificação da amostra viral	31
3.4. Titulação viral	31
3.5. Multiplicação da amostra viral <i>SPAn232 virus (SAV)</i> em membrana corioalantóide de ovos embrionados	32
3.6. Ensaio de infectividade viral	32
3.6.1. Fenótipo de placa	32
3.6.2. Curva de ciclo único	32
3.6.3. Curva de múltiplos ciclos	33
3.7. Sequenciamento e análise das sequências de DNA	33
3.7.1. Extração do DNA e sequenciamento genômico.....	33
3.7.2. Controle de qualidade das sequências.....	34
3.7.3. Montagem, anotação do genoma e análises filogenômicas	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Caracterização biológica	35
4.1.1. Curva de crescimento de ciclo único	35

4.1.2.	Curva de crescimento de múltiplos ciclos	36
4.1.3.	Fenótipo de placa	37
4.1.4.	Infecção MCA de ovos de galinha embrionados.....	37
4.2.	Caracterização molecular – Sequenciamento total do genoma.....	38
4.2.1.	Controle de qualidade dos dados do sequenciamento.....	38
4.2.2.	Montagem e anotação das sequências	42
5.	DISCUSSÃO	45
6.	CONCLUSÃO	47
7.	REFERÊNCIAS	48

INTRODUÇÃO

1.1. Família *Poxviridae*

Os membros da família *Poxviridae* são vírus grandes e envelopados, que possuem morfologia complexa, genoma de DNA e multiplicam-se no citoplasma das células de hospedeiros vertebrados e invertebrados, abrangendo um grande grupo de patógenos de importância médica e veterinária (MOSS, 1996). A família é composta por duas subfamílias, *Chordopoxvirinae* e *Entomopoxvirinae*, divididas de acordo com o tipo de hospedeiro. Dentre as subfamílias, existem catorze gêneros que juntos possuem setenta e uma espécies (ICTV, 2019).

Dentre as espécies, se destaca o *Variola virus* (VARV), o agente etiológico da varíola, uma das mais devastadoras enfermidades da história da humanidade (Schatzmayr, 2001). Entretanto, após um longo e intensificado programa de vacinação contra a doença a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou sua “erradicação” em 1980, depois de três anos do último caso registrado (WHO, 1980). Atualmente, amostras do VARV se encontram em apenas dois laboratórios no mundo, o Centro para o Controle e Prevenção das Doenças (CDC) em Atlanta (EUA) e o Centro de Investigação de Virologia e Biotecnologia em Koltsovo (Rússia). Contudo, apresenta-se como potencial ameaça contra todos os países, principalmente pela possibilidade de seu uso em atos terroristas como arma biológica (BREMAN, 1998) (SILVA, 2001). Além do VARV, o *Cowpox virus* (CPXV) e *Vaccinia virus* (VACV) também se destacam entre as espécies da família *Poxviridae* pelo fato de terem sido pioneiramente usados como imunógenos vacinais, sendo possivelmente o CPXV a vacina original usada por Jenner, e o VACV que o substituiu na campanha de erradicação da varíola nos anos 70 (JACOB *et al.*, 2009).

Dentro da família *Poxviridae* apenas duas espécies são patógenas especificamente de humanos o *Variola virus* (gênero *Orthopoxvirus*) e o *Molluscum contagiosum virus* (gênero *Molluscipoxivirus*), porém, dentro do gênero *Orthopoxvirus*, três outras espécies também podem vir a causar doença em humanos, sendo eles o *Monkeypox virus*, o *Cowpox virus* e o *Vaccinia virus*. Várias espécies da família têm grande importância médico-veterinária devido às possíveis transmissões para humanos e principalmente às graves doenças que causam em outros animais, incluindo o *Cowpox virus* que causa doença no gado, e o *Monkeypox virus* que pode causar doenças em animais domésticos (GUARNER, 2004). Outro exemplo, tem-se o *Myxoma virus* que causa myxomatose, doença letal em coelhos europeus (Fenner & Ross, 1994) (KERR, 1998). Outro exemplo é o *Avipoxvirus*, que acomete não só as espécies domésticas comerciais, como frangos e perus, mas também a grande maioria das aves silvestres e passeriformes, causando doenças nestes animais e também grandes perdas econômicas (Skinner, 2008)

Contudo, apesar do potencial de causar doenças em humanos e em outros animais, desde o fim da primeira e mais bem-sucedida campanha de vacinação, os poxvírus têm sido amplamente estudados e explorado sua potencial aplicação como vetores para expressão de genes exógenos (PANICALI & PAOLETTI, 1982). Atualmente são largamente utilizados como ferramentas biotecnológicas, tais como vetores para expressão gênica, na geração de vacinas para o campo veterinário e em humanos (RAMÍREZ *et al.*, 2000), na construção de bibliotecas genômicas (SMITH *et al.*, 2001) e até mesmo em imunoterapia do câncer (MASTRANGELO, & LATTIME,

2002). Características como tropismo celular, morfologia, genoma, ciclo de multiplicação e segurança são fatores responsáveis pelo uso deste vírus como ferramentas biotecnológicas.

1.1.1. Classificação

A família *Poxviridae* compõe-se de duas subfamílias, *Chordopoxvirinae* com onze gêneros sendo eles: *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Centapoxvirus*, *Cervidpoxvirus*, *Crocodylipoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Suipoxvirus* e *Yatapoxvirus*; e a subfamília *Entomopoxvirinae* com três gêneros sendo eles: *Alphaentomopoxvirus*, *Betaentomopoxvirus* e *Gammaentomopoxvirus* (ICTV, 2011). Algumas espécies como *Pteropox virus* e o *Squirrelpox virus* da subfamília *Chordopoxvirinae* ainda não foram classificados em nenhum dos gêneros, assim como as espécies *Diachasmimorpha entomopoxvirus* e *Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus* da subfamília *Entomopoxvirinae* que também não se encaixam em nenhum gênero (ICTV, 2019).

A. *Poxviridae*

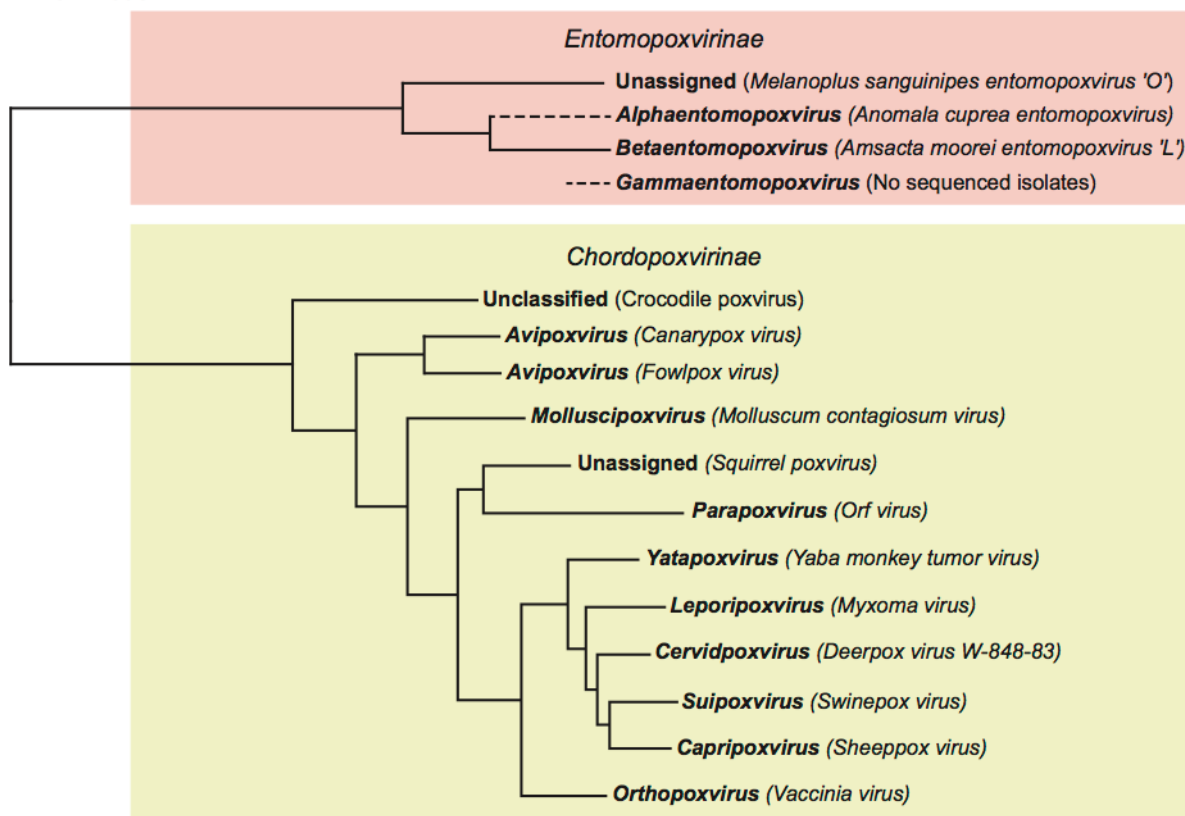


Figura 1: Relações filogenéticas na família *Poxviridae* – Fonte ICTV, 2019

As subfamílias são divididas com base no tipo de hospedeiro que infectam sendo *Chordopoxvirinae* com representantes que infectam vertebrados e *Entomopoxvirinae* que infectam invertebrados. O espectro de hospedeiros da família é amplo

abrangendo várias espécies, como por exemplo a subfamília *Entomopoxvirinae* que tem diferentes hospedeiros da classe Insecta, como os da ordem Diptera, Coleoptera e Lepdoptera. Já a subfamília *Chordopoxvirinae* tem o mais diverso espectro de hospedeiros que vão desde aves, animais unglados (cujos virus podem ser transmitidos por artrópodes), esquilos, coelhos, suínos, roedores, primatas não humanos e humanos, sendo que os últimos se encontram majoritariamente no gênero *Orthopoxvirus* (Tabela 1).

VÍRUS	ABREVIÇÃO	PRINCIPAIS HOSPEDEIROS
<i>Camelpox virus</i>	CMLV	camelo
<i>Cowpox virus</i>	CPXV	Bovino, humano, felino e roedor
<i>Ectromelia virus</i>	ECTV	camundongo
<i>Monkeypox virus</i>	MPXV	Macaco, roedor e humanos
<i>Raccoonpox virus</i>	RCNV	Guaxinim
<i>Taterapox virus</i>	GBLV	Gerbilo
<i>Vaccinia virus</i>	VACV	Humano, bovino, búfalo, suínos, roedores e colhos
<i>Buffalopoxvirus</i>	BPXV	Búfalo, bovino e humanos.
<i>Rabbitpox virus</i>	RPXV	Coelho
<i>Variola virus</i>	VARV	Humano
<i>Volepox virus</i>	VPXV	Camundongo da califórnia
<i>Uasin Gishu virus</i>	UGV	Cavalo

Tabela 1: Gênero Orthopoxvirus: vírus, abreviações, hospedeiros conhecidos e distribuição. Fonte: adaptado e atualizado de ESPOSITO et al., 2005

1.1.2. Morfologia

Os poxvirus são partículas virais morfológicamente complexas em forma de tijolo ou em forma oval com cerca de 200 a 400 nm de comprimento (KING et al., 2012). Podem apresentar dois tipos de partículas infecciosas estruturalmente diferentes, o vírus maduro intracelular (IMV - *intracellular mature virion*) e o vírus envelopado extracelular (EEV - *extracellular enveloped virion*) (Figura 2).

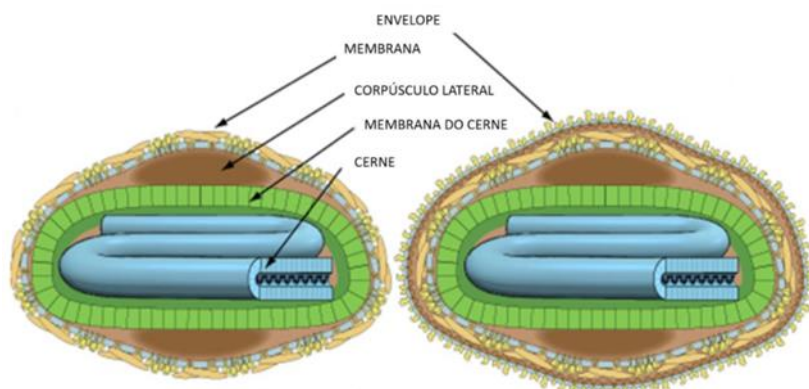


Figura 2: Desenho esquemático representando a morfologia das diferentes partículas dos Poxvirus e suas estruturas. Fonte: Adaptado de Viral Zone, 2018 - <https://viralzone.expasy.org>

As partículas IMV apresentam três elementos estruturais: uma **membrana lipídica** com proteínas tubulares ou globulares que possibilita a adsorção e fusão com a membrana plasmática do hospedeiro ou vesículas endocíticas; o **cerne viral** que por sua vez encapsida o genoma composto por DNA, enzimas virais e proteínas associadas ao DNA; e os **corpúsculos laterais** que se encontram localizados em ambos os lados do cerne e transportam proteínas que auxiliam na multiplicação viral, e que devido a posição onde se encontram tornam o cerne um disco bicôncavo ou com forma de halter em seções transversais (Figura 2) (SODEIK *et. al.* 2002). Essas partículas são muito importantes na transmissão célula a célula, pois devido a sua bicamada lipídica são mais resistentes à neutralização por anticorpos e ao complemento. Já as partículas EEV, além de conter todas estas estruturas citadas acima, possuem um envelope externamente à membrana, gerando uma maior resistência a compostos químicos e tornando essas partículas mais importantes na transmissão hospedeiro-hospedeiro (VANDERPLASSCHEN, 1998)

1.1.3. Genoma

Os membros da família *Poxviridae* possuem um genoma linear formado por uma única molécula de DNA dupla-fita variando de 140 (gênero *Parapoxvirus*) a 300 kilobases (kb) (gênero *Avipoxvirus* respectivamente) que codificam cerca de 130 a 320 proteínas, dependendo da espécie (JAMES, 2017). Seu tamanho relativamente grande permite a codificação de proteínas não essenciais ao ciclo de multiplicação, mas que são importantes na modulação da virulência das infecções. Ambas as fitas de DNA viral são ligadas covalentemente nas extremidades do genoma por sequências idênticas com orientações contrárias, denominadas repetições terminais invertidas (ITR's – do inglês *Inverted terminal repetitions*) (figura 3). Essas alças terminais são ricas em adenina e timina e possuem uma região altamente conservada com menos de 100 pares de base (pb) que contém sequências necessárias para a formação dos concatâmeros durante replicação do DNA e um conjunto de pequenas sequências repetidas em *tandem* (WITTEK, 1982; revisado por MOSS, 2001).

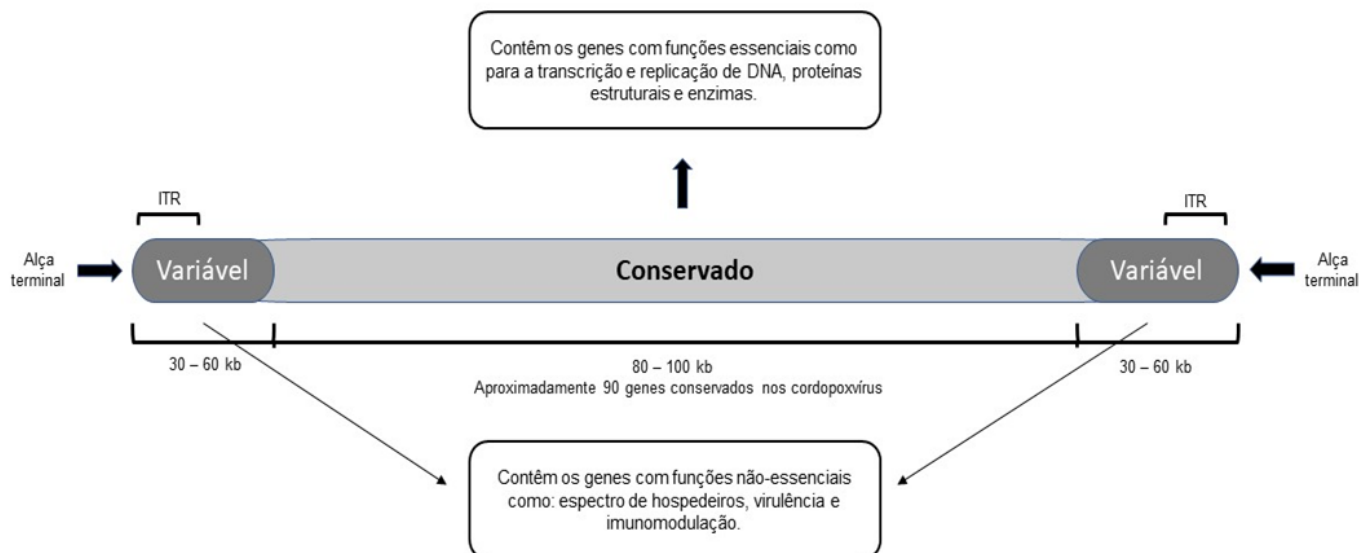


Figura 3: Representação esquemática da organização genômica dos Orthopoxvírus. A região central apresenta genes altamente conservados que codificam proteínas com funções essenciais, e as extremidades contêm os genes relativos a funções não essenciais. Fonte: adaptado de SMITH & MCFADDEN, 2002

A região central do genoma contém genes altamente conservados responsáveis pelas funções essenciais de biossíntese viral, como a transcrição, processamento do RNA, replicação do genoma e morfogênese dos novos vírions (figura 3). Já as regiões genômicas terminais representam 20 a 40% e contêm os genes não essenciais que codificam as informações responsáveis pela interação vírus-hospedeiro e pela sua patogenicidade, além disso, devido a sua alta taxa de variabilidade, essa região é de grande importância na evolução destes vírus (GUBSER *et al*, 2004).

1.1.4. Ciclo de multiplicação

O ciclo de multiplicação dos poxvírus é complexo devido à variedade de partículas virais formadas e dado ao fato de ocorrer inteiramente no citoplasma. Além disso, as partículas carregam muitos elementos essenciais à sua multiplicação, incluindo os fatores de transcrição de genes precoces e a RNA polimerase dependente de DNA e, portanto, o ciclo necessita de apenas alguns fatores de transcrição do núcleo celular para otimização da transcrição dos genes virais (MOSS, 2001). O *Vaccinia virus* é o mais estudado e bem caracterizado membro da família e, por isso, as informações seguintes são relativas ao seu ciclo de multiplicação que reflete os mecanismos que ocorrem durante o ciclo de multiplicação de todos os membros da família *Poxviridae*.

O ciclo inicia-se com a adsorção e penetração do vírus na célula hospedeira. A adsorção do vírus na célula é mediada por interações entre os ligantes virais e os receptores celulares, particularmente os glicosaminoglicanos (GAGs) de superfície celular e laminina, enquanto a penetração do vírus dentro da célula hospedeira é mediada por um complexo fusão/penetração de múltiplas subunidades proteicas que

compreende pelo menos uma dúzia de proteínas altamente conservadas (KING, *et al.*, 2011).

Como existem dois tipos de partículas infecciosas morfologicamente diferentes (as IMVs e EEVs – Figura 2-), o mecanismo de adsorção e penetração destas partículas nas células também é diferente. Ambas são revestidas por uma bicamada lipídica, porém as EEVs possuem uma segunda camada externa, o envelope, que contém proteínas específicas desta camada. Sabe-se que, por isso, as formas IMV e EEV ligam-se a diferentes receptores devido às diferentes proteínas em suas superfícies, porém, o conhecimento a cerca destes receptores não é totalmente elucidado (SMITH & MURPHY, 2003). De acordo com SENKEVICH *et al.*, 2005 ao menos oito proteínas estão envolvidas no processo de formação do complexo de fusão-penetração, sendo que quatro destas proteínas de membrana A21, H2, F9, E G9 são comprovadamente essenciais para este processo.

Estudos posteriores (MOSS, 2006) demonstraram que proteínas de superfície do IMV, como as A27, H3 e D8, ligam-se a glicosaminoglicanas celulares (GAGs) como os sulfato de heparina e o sulfato de condroitina, respectivamente. Porém, essa ligação parece ser dependente do tipo celular e, portanto, não essencial para que ocorra a adsorção das partículas (MOSS, 2007). Para o EEV, quatro proteínas distintas (A33R, A34R, A56R e B5R) estão presentes na superfície do vírus, porém, ainda não foi demonstrada interação física entre essas proteínas específicas do EEV e antígenos de superfície celular (SMITH & MURPHY, 2003). Estudos mais recentes demonstram que glicoesfingolípídeos podem ser usados alternativamente como receptores celulares para a adsorção destas partículas (PERINO, *et al.*, 2011).

Em relação ao processo de penetração dos vírus na célula, devido à sua única camada externa, as IMVs podem liberar o cerne viral (desnudamento primário) dentro do citoplasma celular através da fusão com a membrana celular, ou por endocitose (KING *et al.*, 2015). As proteínas de superfície dos IMVs A28, A21, H2, L5 parecem estar envolvidas neste processo (MOSS, 2006). No entanto, para as partículas EEVs o mecanismo de entrada é diferente devido ao envoltório proteico (envelope) presente nesta partícula. Neste caso, o envelope externo do vírus é rompido por uma reação não-fusogênica induzida pela interação com moléculas polianiónicas celulares e as glicoproteínas A34 e B5 do vírus (LAW *et al.*, 2006).

Os processos de replicação do DNA e morfogênese nos poxvírus são regulados por uma expressão gênica temporal ao longo de todo o ciclo de multiplicação através de três classes de genes: genes precoces, genes intermediários e genes tardios (CONDIT & NILES, 2002). Após a penetração na célula, ou seja, após a entrada do nucleocapsídeo contendo o genoma do vírus e enzimas associadas, o cerne viral é transportado da periferia celular, através de microtúbulos, até locais próximos ao núcleo onde a RNA polimerase e os fatores de transcrição presentes dentro nucleocapsídeo iniciam, ainda dentro do cerne viral, a expressão de genes precoces que codificam proteínas que atuam na perda do revestimento do nucleocapsídeo (desnudamento secundário), na transcrição de genes intermediários e na síntese de DNA, além de estarem relacionadas com a biossíntese de nucleotídeos e evasão imune (MOSS, 2001; CONDIT & NILES, 2002; MOSS 2007). A síntese de DNA pode ser detectada duas horas após a infecção, e a morfogênese da partícula ocorre em uma região do citoplasma onde acumula-se material nucleoprotéico denso, que é então chamada de fábrica viral (MOSS, 2013).

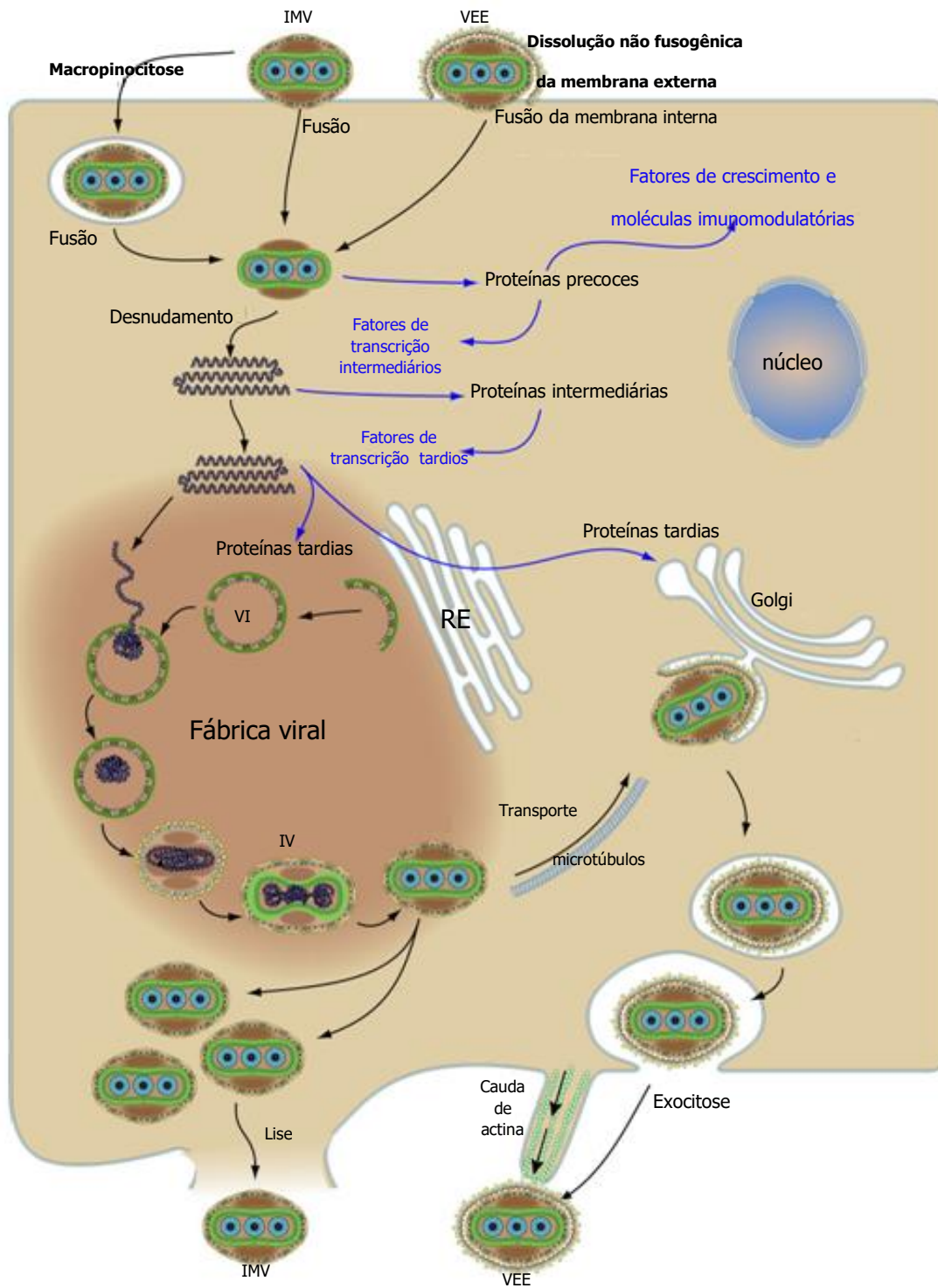


Figura 4: Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos Poxvírus. Fonte: Adaptado de Viral Zone, 2018 - <https://viralzone.expasy.org>

Para a expressão de genes intermediários e tardios, são necessários fatores de transcrição do hospedeiro e, portanto, esses genes são transcritos somente quando o DNA viral é liberado do nucleocapsídeo para o citoplasma. Esses genes dão origem a proteínas estruturais e elementos que serão associados às partículas em formação, e são, portanto, responsáveis pelo processamento e empacotamento do DNA sintetizado (MOSS, 2013). Concomitantemente à expressão destes genes ocorre a formação e montagem de partículas infecciosas. Esse processo de formação inicial das partículas dos poxvírus ocorre sequencialmente a partir de estruturas proteicas denominadas crescentes, que dão origem a partículas uniformes e esféricas, que em um estágio subsequente de maturação, formam o vírus imaturo (IV) (MOSS, 2006). . Após inúmeras etapas envolvendo clivagem de várias proteínas do capsídeo viral, condensação do cerne e reorganização do genoma partículas maduras intracelulares (IMVs) são formadas. Parte dos IMVs é transportada ao longo de microtúbulos até a rede do *trans*-Golgi ou endossomos, onde recebem uma dupla membrana, formando os IEVs. Estas últimas se movem através de microtúbulos até a periferia celular, onde se fundem com a membrana plasmática e são liberados para o meio como vírus envelopados extracelular (EEV) (MOSS 2006). As partículas que permanecem na superfície celular são chamadas de vírus envelopados célula associados (CEVs). Grande parte das IMVs produzidas, não chegam a receber o envelope e são liberadas nesta forma quando ocorre o rompimento da parede celular e consequente sua lise (MCFADDEN, 2005; SCHRAMM & LOCKER, 2005).

Como mencionado anteriormente (rever seção 1.2), devido a sua composição mais resistente as partículas envelopadas (EEVs) têm grande importância na disseminação viral tanto em cultura de células quanto *in vivo* (hospedeiro-hospedeiro), mesmo não sendo os mais numericamente representativos da progênie viral. Já as partículas IMVs, apesar de produzidas em grandes quantidades, são mais adequados a disseminação célula a célula, pois são altamente imunogênicas (VANDERPLASSCHEN, 1998).

1.2. Vaccinia Vírus

O *Vaccinia Vírus* (VACV) é uma espécie de poxvírus da subfamília *Chordopoxvirinae* e protótipo do gênero *Orthopoxvirus* (OPV). Apresenta um amplo espectro de hospedeiros englobando gado, roedores, macacos e cavalos, sendo inclusive uma das quatro espécies de poxvírus que infectam humanos (ICTV., 2018). O *Vaccinia Vírus* causa uma infecção em humanos que, quando sintomática, gera alterações cutâneas e lesões clássicas do tipo *pocks* (ou pústulas), com sintomas sistêmicos ou localizados. As lesões em animais infectados são mais comumente observadas nos tetos e úbere de vacas em lactação ou na boca e nariz de bezerros e também em cavalos (KROON., 2011). O curso da infecção em humanos, desde os primeiros sinais de vesículas à cicatrização completa, leva de duas a quatro semanas e o período de incubação de um a sete dias (DE SOUZA TRINDADE., 2007). O diagnóstico envolve observação clínica, técnicas sorológicas, virológicas, microscópicas e moleculares (Lobato et al., 2005).

Assim como os demais poxvírus, o VACV tem uma estrutura em “forma de tijolo” (*brickshaped*), um genoma composto de DNA linear dupla fita de aproximadamente

200 kb, 34% de G+C e com uma alça terminal em cada extremidade (CONDIT et al., 2006). As estruturas morfológicas, características do genoma e fases do ciclo de multiplicação são descritas mais detalhadamente na sessão 1 deste trabalho. Embora algumas teorias tentem explicar, até os dias de hoje a origem do VACV não foi totalmente elucidada e nenhum hospedeiro natural é conhecido (Fenner et al., 1988; TRINDADE et al., 2007).

Vaccinia virus foi uma das amostras virais utilizadas para prevenção da varíola, sendo a responsável pela erradicação da doença em 1980. Porém, mesmo após a suspensão do programa de vacinação devido à erradicação, desde 2001 nos Estados Unidos, o Comitê Consultivo em Práticas de Imunizações (ACIP) recomendou o uso da vacinação contra a varíola em pessoas que trabalham com outros vírus do gênero *Orthopoxvirus* e em oficiais das forças armadas como forma de prevenir um possível ataque bioterrorista. (Vellozzi et al., 2005; MODLIN, J. et al., 2005). No entanto, como partículas virais infecciosas permanecem por um longo tempo sendo liberadas a partir das crostas formadas como consequência da administração da vacina, alguns casos de transmissão acidental vêm sendo relatados (VORA et al., 2008).

Atualmente, vem sendo relatado que os vírus vaccínia são os responsáveis por doenças zoonóticas de grande importância que afetam gado leiteiro e humanos em grande parte do território nacional (figura 5)(DAMASO et al., 2000, QUIXABEIRA-SANTOS et al., 2011, TRINDADE et al., 2003, LEITE et al., 2005, TRINDADE et al., 2006 e TRINDADE et al., 2007). A circulação de VACV no Brasil (VACV-BR) é bastante significativa pois, os surtos infecciosos causados por estes vírus representam um perigo para a saúde pública e, além disso, podem gerar grandes problemas econômicos para a indústria de laticínios no país. Por outro lado, a propagação deste vírus em ambientes naturais e em animais domésticos e selvagens apresenta uma oportunidade para expandir a compreensão da história natural e da biologia evolutiva do VACV (KROON, 2011).

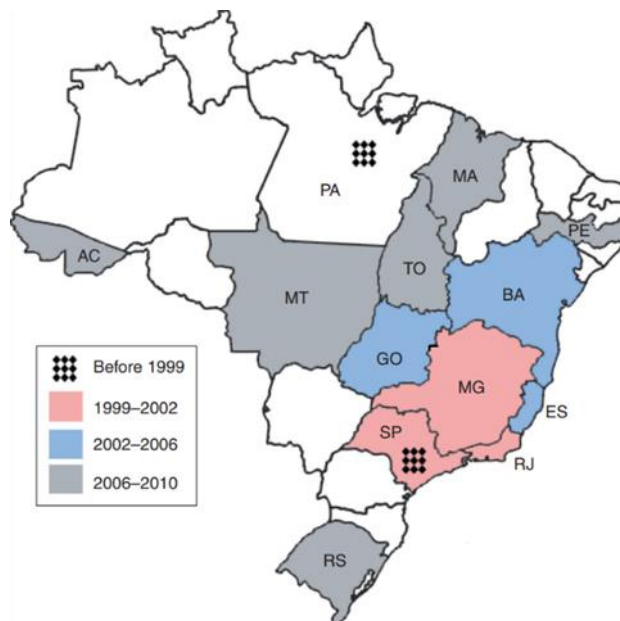


Figura 5: Estados Brasileiros em que surtos de vaccínia bovina foram relatados.
Adaptado de: DA FONSECA et al 2011

Portanto, é possível inferir que a ativa circulação de VACV no Brasil é um acontecimento complexo e ainda passível de muitos estudos. A heterogeneidade genética e a diversidade geográfica encontrada indicam que nem todas as amostras compartilham a mesma origem (DAMASO *et al.*, 2000), já que amostras diferentes foram isoladas em uma mesma região e amostras geneticamente semelhantes foram isoladas de diferentes regiões. De acordo com as análises moleculares realizadas pelos estudos acima e por outras análises (TRINDADE *et al.*, 2007), foi possível observar uma dicotomia fenotípica evidente entre os VACV-BR. Portanto, os VACV brasileiros podem ser separados em dois grandes grupos monofiléticos que refletem diferentes propriedades biológicas. O Grupo 1 contém as amostras menos virulentas, sendo elas: *Araçatuba virus* (ARAV), *Cantagalo virus* (CTGV), *Guarani P2 virus* (GP2V) e *Passatempo virus* (PSTV); e o grupo 2 contém as amostras mais virulentas sendo elas: *Guarani P1 virus* GP1V, *Belo Horizonte virus* (VBH), *BeAn 58058 virus* (BAV), *SPAN232 virus* (SAV). O VACV-*Western Reserve* (WR) protótipo dos VACV apresenta uma estreita relação com o grupo 2 (TRINDADE *et al.*, 2007).

Contudo, desde o fim do programa de vacinação nos anos 80, o VACV começou a ser empregado em outras áreas da pesquisa como ferramentas para pesquisa em biologia molecular, biologia celular e imunologia. Exemplo disso é o uso de VACV recombinantes como vacinas para prevenir doenças não relacionadas, como imunoterapia contra o câncer e principalmente o uso de VACV como vetores de expressão (MOSS., 2001).

1.2.1. Caracterização molecular dos VACV

De acordo com vários estudos, a caracterização molecular das amostras de VACV podem ocorrer a partir de genes ou regiões subgenômicas muito conservadas do DNA viral. De acordo com DA FONSECA, 2011 os genes Timidina Cinase (TK), Corpúsculo de Inclusão do Tipo Acidofílico (ATI), Hemaglutinina (HA) são alguns dos genes que podem ser sequenciados para caracterização destes vírus (DA FONSECA *et al.*, 2002)

O gene da hemaglutinina (HA) é um gene não estrutural que codifica uma glicoproteína do envelope viral na fase final da infecção por *Orthopoxvirus*. (DAMASO *et al.*, 2000). A proteína do corpúsculo de inclusão citoplasmática do tipo acidofílica é codificada pelo gene ATI, molecularmente caracterizada em várias espécies de *Orthopoxvirus*, porém alguns *Orthopoxvirus* podem não possuir esse gene (ULAETO, *et al.*, 1996). O gene TK é um gene altamente conservado no genoma dos *Orthopoxvirus*, sendo responsável em codificar a timidina-cinase, uma enzima participante do metabolismo de ácidos nucleicos. Esse gene tem sido utilizado amplamente para caracterização molecular de *Orthopoxvirus* (TRINDADE *et al.*, 2003).

O estudo e caracterização destas amostras são de fundamental importância quando se trata de questões como a origem e a circulação destes vírus ou mesmo quando se quer resolver questões sobre a cadeia de transmissão envolvida nos surtos e os reservatórios naturais destes patógenos (DA FONSECA *et al.*, 2011).

1.3. Cotia Virus (COTV) e SPAn232 (SAV)

Nos últimos sessenta anos começaram a ser registrados inúmeros trabalhos demonstrando a ativa circulação de amostras de VACV no território Brasileiro. Os primeiros isolamentos de poxvírus no Brasil ocorreram na década de 60, durante o desenvolvimento de um programa de vigilância epidemiológica coordenado pelo Instituto Adolfo Lutz, que tinha o objetivo de pesquisar e identificar arboviroses circulantes em partes específicas do país. Durante esse programa, o *Cotia virus* (COTV), um recombinante entre *Leporipoxvirus* e *Orthopoxvirus* (UEDA *et al.*, 1978, 1995 e ESPOSITO *et al.*, 1980) foi isolado a partir de camundongos sentinela na Floresta de Cotia estado de São Paulo (LOPES., 1965). Um outro isolado coletado, também na floresta de Cotia durante a vigilância epidemiológica do governo, denominado COT232 foi agrupado originalmente como um Cotia Virus (COTV) devido a reações sorológicas cruzadas com este que são comuns entre os poxvírus (Lopes., 1965). Porém, estudos moleculares posteriores baseados nas sequências dos genes TK (*Thymidine kinase* - timidina cinase), VGF (*vaccinia growth factor* - fator de crescimento viral) e ATI (*A-type inclusion* – genes do corpúsculo de inclusão do tipo acidófilo) reclassificou a amostra como uma variante de *Vaccinia virus*, sendo renomeada como *SPAn232 virus* (SAV) (DA FONSECA *et al.*, 2002) amostra que circulava nas mesmas regiões onde o COTV ocorria. Outros estudos confirmaram a relação filogenética entre a variante SAV e VACV WR (DRUMOND, *et al.* 2008). Contudo, um estudo mais recente (AFONSO., *et al.* 2012) usando outras amostras coletadas pelo Instituto Adolfo Lutz sugeriu uma possível contaminação com VACV da amostra de COTV estudada nos laboratórios da Universidade Federal de Minas Gerais.



Figura 6: Imagem da amostra original encaminhada para nosso laboratório para estudos.

Portanto, atualmente com base nos estudos publicados (UEDA *et al.*, 1978; UEDA *et al.*, 1995; DA FONSECA *et al.*, 2002; DRUMOND, *et al.* 2008 e AFONSO, PP., *et al.* 2012), o agrupamento da amostra SPAnV dentre os poxvírus é ainda controverso.

1.4. Sequenciamento de nova geração

As técnicas de sequenciamento podem ser resumidamente definidas como um conjunto de instrumentos, materiais, protocolos e métodos que estão envolvidos na coleta, preparação e isolamento da amostra para o sequenciamento e a montagem de uma sequência de DNA final (CHAN, 2005). As primeiras estratégias de sequenciamento surgiram no final da década de 1970, quando dois grupos de pesquisadores desenvolveram metodologias que tinham com o objetivo final, o

sequenciamento de DNA, ou seja, a leitura e identificação da ordem em que as bases nitrogenadas se dispõem no material genético dos organismos (DAVIES, 2001). Tais técnicas consistiam principalmente em métodos como o de degradação química (MAXAM E GILBERT, 1977) ou o método Sanger com terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (SANGER *et al.*, 1977).

Durante muitos anos, devido a maior facilidade de decifrar os dados e a sua automatização, o método de sequenciamento de terminação de cadeia, publicada pelo Inglês Frederik Sanger e seus colaboradores em 1977, foi considerada padrão ouro para o sequenciamento, sendo responsável inclusive pelo Projeto de sequenciamento do Genoma Humano no final dos anos 90. Desde então, apesar da técnica de Sanger ter permitido a introdução do sequenciamento gênico, a percepção das nítidas limitações desta técnica em projetos de alta demanda, gerou grandes esforços para criação de técnicas mais rápidas e baratas para o sequenciamento de genomas.

As novas tecnologias de sequenciamento, denominadas de tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS – *next generation sequencing*) são tecnologias que utilizam metodologias diferentes às de Sanger e promovem um sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida. Essas novas tecnologias possuem em comum o poder de gerar informações muitas vezes maior que o sequenciamento de Sanger (*high throughput sequencing -HTS*), com uma grande economia de tempo e de custo. A diferença está na mudança radical dos mecanismos básicos de geração de dados, que através do uso da clonagem *in vitro* em suporte sólido para as unidades de sequenciamento, que permitem que milhares de leituras possam ser produzidas de uma só vez, dispensam o laborioso trabalho destinado a clonagem *in vivo* dos fragmentos de DNA e a separação dos fragmentos em géis (CARVALHO *et al.*, 2010).

Desde o lançamento da primeira plataforma em 2005, a plataforma 454-Roche, novos métodos vêm sendo constantemente testados, aprimorados, ou ainda incorporados por outras tecnologias. Neste sentido, surge no mercado uma competição acirrada entre os fabricantes para melhorar ainda mais estas tecnologias, aumentando os comprimentos de leitura, reduzindo custos e corrigindo erros durante as reações. Além disso, há um esforço constante de pesquisadores na área da bioinformática em desenvolver programas computacionais voltados à análise e interpretação dos dados liberados pelas novas plataformas. Devido à alta capacidade de geração de dados somada ao constante desenvolvimento de ferramentas computacionais direcionadas para sua análise, o sequenciamento de nova geração (NGS) apresenta atualmente um largo espectro de aplicações na pesquisa científica, sendo utilizada não apenas no estudo de genomas completos, mas também em conjuntos específicos de genes, regiões regulatórias do genoma e sequenciamento de RNA além da aplicação em pesquisas e desenvolvimento nas áreas de diagnóstico molecular, oncologia, genética microbiana, doenças complexas, genômica agrária, genômica forense, entre inúmeras outras (CHRISTOFF, 2010).

Atualmente existem diversas tecnologias voltadas para o sequenciamento do DNA em larga escala, podendo citar dentre elas a Roche/454, Illumina/Solexa, SoliD System, Ion Proton, Helicos BioSciences e Nanopore Sequencing. Apesar de serem diferentes em suas especificidades, todos esses sequenciadores de nova geração apresentam características em comum, como por exemplo:

1. **Preparo das amostras:** toda plataforma de sequenciamento de nova geração produz uma biblioteca de sequencias fragmentadas que são ligadas a sequencias de adaptadores personalizados, os quais serão usados nas etapas posteriores.
2. **Amplificação dos fragmentos:** todas as plataformas fazem uso de uma superfície sólida (uma lâmina de vidro ou uma microesfera) para amplificar os fragmentos a serem sequenciados.
3. **Reação de sequenciamento:** apesar da especificidade de cada equipamento e da diferente metodologia de alguns deles, todos tem a capacidade de gerar dados brutos sendo estes de milhares a milhões de moléculas de DNA simultaneamente e todos realizam reações de sequenciamento como uma série orquestrada de etapas repetitivas que são executadas e detectadas automaticamente (MARDIS, 2008).
4. Capacidade de obter a **sequência de ambas as extremidades dos fragmentos** de DNA que compreendem a biblioteca de sequenciamento. Dependendo do instrumento e da abordagem de construção da biblioteca usada, pode-se sequenciar ambas as extremidades de fragmentos lineares (*paired-end sequencing*) ou ambas extremidades de fragmentos anteriormente circularizados (*mate-pair sequencing*) (MARDIS, 2008).

As metodologias para as reações de sequenciamento usadas pelas plataformas citadas acima são a grande diferença entre elas e por isso é possível separar estas plataformas de acordo com o método de sequenciamento. O pirosequenciamento, por exemplo, metodologia usada na plataforma 454-Roche, é uma técnica que tem como princípio a detecção na forma de luz de uma molécula de pirofosfato liberada durante a incorporação de desoxinucleotídeos à molécula de DNA nascente pela DNA polimerase (PCR em emulsão) (CHRISTOFF, 2010). Outro exemplo de metodologia é o sequenciamento por ligação e a tecnologia SOLiD (*Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*). Neste sistema, a reação de sequenciamento é catalisada pela enzima ligase, e os fragmentos de interesse são amplificados nas superfícies de uma esfera magnética por PCR de emulsão. Estas esferas com os anplicons são depositadas em uma lâmina (*flow cell*) e o sequenciamento por ligação se inicia com a hibridização de uma sequência de *primes* ao adaptador do fragmento. Esta ligação emite um sinal de fluorescência que será detectado pelo programa do equipamento e determinará a sequência nucleotídica, uma vez emitido o sinal este fragmento hibridizado é clivado e um novo ciclo se inicia (CHRISTOFF, 2010). Contudo, existem diversas plataformas e, principalmente, diferentes características e finalidades entre elas, o que faz com que a escolha da plataforma a ser usada seja efetivamente pela questão a ser estudada.

1.4.1. Plataforma Illumina

Entre as citadas acima, a plataforma Illumina nos últimos anos tem ganhado grande destaque, e atualmente é a tecnologia mais amplamente utilizado no mundo, sendo que a cada ano a metodologia passa por melhorias, se adaptando ainda mais às necessidades experimentais (CHRISTOFF, 2010 e QUAIL *et al*, 2012). Esse feito é

devido ao amplo espectro de utilidade, a um baixo custo por base sequenciada e pelo grande volume de sequencias obtidas (GLENN, 2011). Além disso, o comprimento reduzido das *reads* (leituras) obtidas por essa tecnologia, demanda a utilização de coberturas maiores (cobertura mínima de 8x) gerando assim, conjuntos de dados de alta qualidade, com pequenas taxas de erros ($\sim 10^{-16}$) (RIBEIRO *et al*, 2016).

O fluxo de trabalho dos sequenciadores Illumina pode ser dividido em quatro etapas: Preparação das bibliotecas, geração dos *clusters*, sequenciamento e análise dos dados gerados. A biblioteca gerada pela Illumina, pode ser de dois tipos: *paired-end* que proporciona o sequenciamento nas duas extremidades de *reads* com tamanho entre 200 e 500 nucleotídeos; e *mate-pair* que também sequencia as duas extremidades de *reads* maiores (de 2000 a 5000 nucleotídeos). Durante a preparação dessas bibliotecas, o DNA de interesse é clivado, e os fragmentos de tamanho apropriado são selecionados e ligados à adaptadores específicos em ambas as extremidades. Através destes adaptadores, esses fragmentos hibridizam-se a pequenos *primers* imobilizados na célula de fluxo (*flow cell*) (CHRISTOFF, 2010). Em seguida, ocorre a formação de agrupamentos de moléculas idênticas (*clusters*) pela metodologia de amplificação em ponte (figura 7), em que uma molécula de DNA é entendida pela reação da polimerase em cadeia, formando uma região de dupla-fita que é posteriormente desnaturada para poder se anelar em outro primer complementar hibridizado na célula de fluxo e iniciar um novo ciclo de amplificação. Durante a amplificação das moléculas complementares as mesmas mantêm-se formando uma “ponte” em forma de “U” entre as extremidades imobilizadas na superfície (CHRISTOFF, 2010).

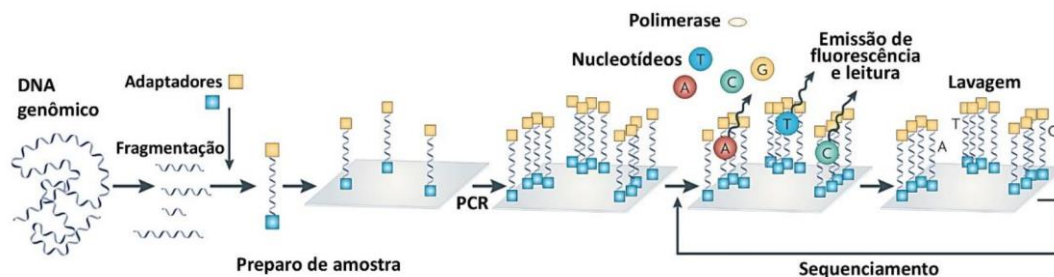


Figura 7: Base metodológica do sequenciamento Illumina, utilizando amplificação em ponte e clusterização de moléculas únicas. ADAPTADO DE MEDINI ET AL., 2008.

Após a formação dos *clusters* o sequenciamento Illumina ocorre pela metodologia de síntese. Para tal processo, são adicionados, ao longo de toda extensão da placa, os quatro tipos de didesoxinucleotídeos terminadores marcados com fluorescência e reversivelmente bloqueados na extremidade 3'OH (A, T, G e C), junto com a enzima DNA polimerase, que fará a incorporação do didesoxinucleotídeo apropriado na cadeia crescente de DNA. Quando um nucleotídeo é adicionado, uma luz que difere em função da base incorporada é emitida. O número elevado de fragmentos no *clusters* (acima de um milhão) é necessário para produzir intensidade suficiente que permita detectar com exatidão uma determinada base no sequenciamento. Em seguida, efetua-se uma etapa de lavagem para remoção do grupo bloqueador presente na extremidade 3' junto com o fluoróforos, fato este que permitirá a incorporação do segundo nucleotídeo e início de um novo ciclo (MARDIS, 2008). Estes ciclos se repetem até que toda a extensão do DNA seja polimerizada. Uma imagem, contendo a cor da fluorescência, é capturada para cada posição dos *clusters* na placa de vidro e

no fim essas imagens são decodificadas para determinar a sequência de bases de cada cluster na placa.

1.4.2. Montagem e anotação do genoma

Posteriormente ao processo de sequenciamento, tem-se a análise dos dados para montagem e anotação dos genomas sequenciados. Montagem é o processo de alinhamento dos inúmeros fragmentos gerados durante o sequenciamento, e esse processo é feito graças ao desenvolvimento de vários programas de computador (*assemblers*) que alinham os reads (fragmentos) gerados baseando-se em regiões de sobreposição entre eles para produzir sequências únicas denominadas *contigs* (Figura 8).

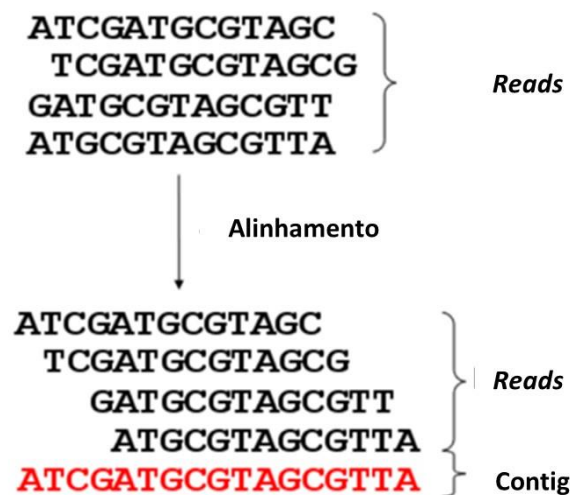


Figura 8: Montagem do genoma - Contigs são gerados a partir do agrupamento de *reads* sobrepostas. Adaptado de RAMOS, 2011.

Ou seja, montar um genoma consiste no processamento e agrupamento das sequências que foram geradas pelo sequenciador, que considerando regiões iguais entre elas formam sobreposições destas sequências de forma a tentar reconstruir a sequência original (SHUSTER., 2008). Já o processo de anotação genômica consiste em identificar os genes codificados pelas sequências e suas funções, e então compara-los buscando similaridades ou diferenças em diferentes bancos de dados com ferramentas de alinhamento local.

JUSTIFICATIVA

Considerando os inúmeros trabalhos que demonstram a ativa circulação de amostras de VACV no território brasileiro causando doenças e surtos de interesse médico e veterinário e grandes perdas econômicas (devido ao seu caráter ocupacional) que vem sendo publicados desde os anos 2000 (DAMASO et al., 2000; DA FONSECA et al., 2002; TRINDADE et al., 2004; TRINDADE et al., 2004; LEITE et al., 2005; TRINDADE et al., 2007; ABRAHÃO et al., 2009; TRINDADE et al., 2009 e QUIXABEIRA SANTOS et al., 2011) vê-se a importância do estudo e conhecimento acerca destes vírus. Além disso, apesar da varíola ter sido erradicada a quase quarenta anos atrás, ainda existe uma certa preocupação de Instituições de saúde e Segurança pública acerca da utilização do VARV como arma biológica, especialmente se os rumores da existência de estoques clandestinos do vírus forem verdadeiros.

Adicionalmente, é importante destacar que devido ao fim da campanha de vacinação contra a varíola existem atualmente gerações de pessoas não imunizadas contra os *Orthopoxvirus*. Esses dados nos reforça a importância do conhecimento e estudo acerca dos VACV e dos poxvírus de forma geral, e destaca a necessidade de pesquisas contínuas sobre a ecologia, epidemiologia, origem e evolução da doença e dos agentes causadores.

Apesar disso, existem ainda muitos questionamentos acerca dos VACV no Brasil, incluindo a confirmação de sua origem, a cadeia de transmissão envolvida nos surtos causados por estes vírus e quais são os reservatórios naturais destes parasitas. As respostas destas perguntas não só esclarecerão mais detalhes dos surtos de vaccínia bovina, como também possibilitarão o entendimento de muitos aspectos da biologia dos *Orthopoxvirus* e de sua evolução como um todo (DA FONSECA et al., 2011 e TRINDADE et al., 2007). Por isso, pesquisas em torno destas questões, como o trabalho que se segue, se fazem tão necessárias, pois a caracterização das amostras circulantes, seguindo o sequenciamento de seus genomas são de grande importância para auxiliar nas respostas à estas questões, ou mesmo desenvolver estratégias para controle epidemiológico.

Além disso, devido aos últimos estudos sobre a amostra SPAnV, cujo agrupamento dentre os poxvírus parece ainda ser controverso entre os autores que ora o classificam como um isolado COTV ora como um isolado VACV (UEDA et al., 1978; UEDA et al., 1995; DA FONSECA et al., 2002; DRUMOND, et al. 2008 e AFONSO, PP., et al 2012), este trabalho tem como o objetivo conduzir um estudo de caracterização biológica e molecular para então classificar corretamente a amostra SPAnV para um dos grupos da família Poxviridae.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Classificar a amostra viral SPAn232 pertencente à Família *Poxviridae*.

2.2. Objetivos Específicos

- Isolar clones da amostra viral SPAn232 (SAV).
- Avaliar o perfil multiplicação *in vitro* e o fenótipo de placa de lise do vírus *SPAn232 virus* (SAV).
- Isolar, sequenciar, montar e anotar o genoma completo da amostra *SPAn232 virus* (SAV).
- Elucidar a taxonomia da amostra *SPAn232 virus* (SAV) baseada no genoma completo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Sistemas celulares

3.1.1. Células BSC40

Linhagens contínuas de células epiteliais de rins de macaco verde africano (BSC-40) foram cultivadas em garrafas contendo meio essencial mínimo D-MEM (Meio Eagle modificado por Dulbecco) (Sigma®) suplementado com antibióticos (Estreptomicina a 10mg/ml e Penicilina a 100 U/mL), antifúngico Anfotericina B a 25 µg/ml) e complementado com 10% de soro fetal bovino (SFB- Cultilab, Campinas, Brasil) e armazenadas a 37°C, em estufa (Thermo Scientific Forma® Series II 3111 Water-Jacket CO2 Incubator) com 5% de CO₂. O meio foi trocado duas a três vezes por semana, variando de acordo com a necessidade.

3.1.2. Membrana corioalantóide de ovos embrionados

Os ovos embrionados de galinha utilizados para inoculação de vírus em membrana corioalantóide (MCA) foram obtidos com aproximadamente 10 dias de postura em uma granja na cidade de Pedro Leopoldo, na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil. Enquanto no laboratório, foram mantidos em estufa a 37°C após a infecção até o momento da coleta.

3.2. Amplificação e origem da amostra *SPAn232 virus* (SAV)

A amostra *SPAn232 virus* (SAV) foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Os estoques virais foram produzidos através da multiplicação em células BSC-40, para isso foram realizadas três passagens cegas (sem a observação de efeito citopático) em poços de 35 mm. As células infectadas foram coletadas após o surgimento de efeito citopático viral em ~90% da monocamada celular e algumas placas de lise (cerca de 48h após a infecção). Após a amplificação inicial, alguns clones foram selecionados e coletados para seguir com a amplificação dos vírus.

Os clones virais obtidos foram sempre congelados e descongelados por três vezes a -80°C (ou em nitrogênio líquido, aproximadamente -196°C) e em banho de água a 37°C, respectivamente, e submetidos a três ciclos de sonicação em banho de gelo antes de prosseguir com a infecção permitindo a lise celular e liberação dos vírions maduros intracelulares. Primeiramente, os clones foram amplificados por meio de passagens sucessivas em garrafas de 25 cm², 75 cm² e 150 cm² para se obter um

título viral adequado. Posteriormente, aproximadamente 10 garrafas de 150 cm² com ~90% de confluência foram infectadas sob uma multiplicidade de infecção (M.O.I) de 0,01 PFU_{/ml} (unidades formadoras de placa por mililitro). A adsorção viral ocorreu em meio DMEM sem suplementação de SFB por uma hora sob agitação constante a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após a adsorção, foi adicionado DMEM com 2,5% de SFB e as garrafas foram incubadas nas mesmas condições anteriores por mais 48 horas. Após esse período, o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1X (1.5 mM NaCl; 40 mM Na₂HPO₄; 20 mM KH₂PO₄; pH 7.2), depois foram removidas com auxílio de raspador de células e sedimentadas por centrifugação por 10 minutos a 25200g (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B) a 4° C. O sedimento resultante foi armazenado a -80°C para subsequente purificação das partículas virais (CAMPOS E KROON 1993).

3.3. Purificação da amostra viral

O sedimento de células infectadas obtido do processo de amplificação da amostra viral (ver item 4.2) foi ressuscitado e homogeneizado em 8_{ml} de Tris-HCL, pH 8,0 e centrifugado a 2.500 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi mantido em banho de gelo e o sedimento celular foi lisado em solução de lise (MgCl₂ 1mM; Tris10mM, pH 7,0; KCl 10mM). Após a adição de 10ml desta solução, a suspensão foi incubada em banho de gelo, durante 10 minutos e em seguida, as células foram lisadas mecanicamente em um homogeneizador do tipo *Douncer* (Wheaton, USA) por 80 vezes. O lisado foi centrifugado e o sobrenadante armazenado junto com o da etapa anterior. Este processo foi realizado duas vezes. Toda a suspensão viral resultante da lise foi centrifugada em um colchão de sacarose (36%) a 12.000 rpm (rotor AH 629 - ultracentrífuga Sorvall), a 4° C por 2 horas para a remoção dos debris celulares. Ao término do procedimento o sobrenadante e a sacarose foram desprezados e o sedimento contendo as partículas virais foi ressuscitado em 1 mL de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. O material obtido foi distribuído em pequenas alíquotas (40 μ L) e armazenado a -80° C para serem utilizadas em experimentos posteriores.

3.4. Titulação viral

Monocamadas de células BSC40 cultivadas em placas de 6 poços com cerca de 90% de confluência foram infectadas com diluições seriadas da amostra *SPAN232 virus* (SAV). Para isso, os poços da placa contendo as células foram lavados com PBS e infectados com 500 _{μ L} das seguintes diluições virais: 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ e 10⁻⁸. Um poço da placa foi utilizado como controle da viabilidade celular, sendo feito apenas uma simulação de infecção (mock). Após 1 hora de adsorção em meio sem SFB, o inóculo foi descartado e acrescentado 2_{ml} de DMEM contendo 2,5% de SFB em todos os poços e as placas incubadas em estufa úmida durante um período de 48 horas, a 37° C, em atmosfera de CO₂ a 5%. Em seguida, as células foram fixadas com solução de formol a 4% por 15 minutos, lavadas com água e, posteriormente, coradas com solução cristal violeta a 1% (p/v) por 15 minutos. O título viral foi calculado pelo número de placas de lise viral obtidas no poço da diluição que apresentou entre 30 a

300 placas de lise, multiplicado pelo inverso da diluição, e depois corrigindo o título para o volume em ml.

3.5. Multiplicação da amostra viral *SPAN232 virus (SAV)* em membrana corioalantóide de ovos embrionados

A inoculação da amostra SAV em MCA foi feita por deslocamento da câmara de ar dos ovos embrionados pela técnica convencional, após visualização por um ovoscópio. Um volume de 100 µL contendo 1000 pfu de vírus 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, para causar a morte do embrião. As MCAs foram retiradas assepticamente dos ovos e foram usadas para avaliar a presença e fenótipo de "poks". Também foi realizada a inoculação de MCA com o vírus VACV-WR (protótipo do Vaccinia virus), com a finalidade de comparar as curvas entre a amostra teste e a referência.

3.6. Ensaios de infectividade viral

3.6.1. Fenótipo de placa

A avaliação do fenótipo de placa de lise viral da amostra SAV foi feita utilizando células BSC-40 crescidas em placas de 6 poços em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) até que atingissem a confluência de 90%. Quando confluentes as placas foram infectadas sob a multiplicidade de infecção (M.O.I) de 0,01 de vírus. Após 1 hora de adsorção com as células mantidas em estufa a 37° C e atmosfera de 5% de CO₂ o inoculo viral foi descartado e adicionado meio líquido (DMEM com 2,5% de SFB) ou meio semi-sólido (DMEM com 2,5% de SFB e 3% de carboximetilcelulose, CMC) e então as placas foram novamente incubadas em estufa onde permaneceram incubadas por 48 horas à 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Posteriormente as células infectadas foram fixadas com solução de 4% de formol e coradas com cristal violeta a 1%.

3.6.2. Curva de ciclo único

Para a determinação e avaliação da curva de multiplicação de ciclo único da amostra viral SAV foi utilizado células BSC-40, cultivadas em placas de 6 poços e suplementadas com meio DMEM com 10% de SFB. Após atingir a confluência de 90%, o meio foi descartado, as células foram lavadas com PBS, e uma solução viral em M.O.I de 10 foi inoculada nas monocamadas. Após 1 hora de adsorção em estufa a 37° C e atmosfera de 5% de CO₂ o inoculo foi descartado e adicionado 2_{mL} de meio DMEM com 2,5% de SFB e incubadas novamente nas mesmas condições. Em diferentes intervalos após a infecção (3, 6, 12, 24 e 48 horas após infecção) 1_{mL} do

meio foi descartado e juntamente com o mL restante as células foram raspadas mecanicamente com o auxílio de um êmbolo de seringa de 1_{mL}, coletadas e armazenadas em freezer -80°C. As amostras coletadas foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento para lise celular sendo posteriormente titulados, como já descrito (item 4.2) deste projeto, para determinação do número total de partículas virais infecciosas produzidas. Uma curva do vírus VACV-WR (protótipo dos Vaccinia virus) foi também realizada a fim de comparação entre as curvas de ambas as amostras.

3.6.3. Curva de múltiplos ciclos

Para criar uma curva de multiplicação de múltiplos-ciclos da amostra de SAV foram utilizadas células BSC-40, cultivadas em placas de 6 poços suplementadas com DMEM 10% de SFB. Após crescimento celular atingir confluência de 90%, o meio foi descartado e a solução viral foi inoculada com uma M.O.I de 0,01. Após um período de 1 hora de adsorção, o qual as células ficaram mantidas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, a monocamada celular foi lavada com PBS 1X e em seguida, adicionou-se meio DMEM a 2,5% de SFB. As placas foram novamente incubadas em estufa nas condições previamente indicadas, onde permaneceram por diferentes intervalos (3, 24, 48, 72 e 96 horas de infecção). Em cada tempo indicado 1_{mL} do meio foi descartado e juntamente com o mL restante as células foram raspadas mecanicamente com o auxílio de um êmbolo de seringa de 1_{mL}, coletadas e armazenadas em freezer -80°C. Esse produto foi submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento para lise celular sendo posteriormente titulado, como descrito anteriormente no item 4.2 deste projeto, para determinação do número total de partículas produzidas. Uma curva do vírus VACV-WR foi também realizada a fim de comparação entre as curvas de ambas as amostras.

3.7. Sequenciamento e análise das sequências de DNA

3.7.1. Extração do DNA e sequenciamento genômico

O isolamento do genoma viral realizado através da técnica de extração e purificação de ácidos nucleicos com Fenol/clorofórmio/Álcool Isoamílico. Após a extração dos ácidos nucleicos, a avaliação quanto a concentração e a qualidade do material foi medida por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose a 0,8% e quantificação com reagente fluorimétrico no equipamento *Qubit® Fluorometer Quantitation* (Life Technologies).

As bibliotecas de fragmentos de DNA genômico para sequenciamento foram construídas utilizando-se o kit *Nextera® XT DNA Sample Preparation* (Illumina®). As bibliotecas produzidas foram então submetidas ao sequenciamento na plataforma de sequenciamento Illumina *MiSeq* com *kit MiSeq Reagent Nano Kit, v2 (500 cycles)*,

Illumina, no modo *paired-end*, em que ocorre o sequenciamento dos fragmentos a partir de ambas as extremidades.

3.7.2. Controle de qualidade das sequências

Para a análise dos dados de sequenciamento foi utilizado o programa FastQC (plataforma *Galaxy* online - <https://usegalaxy.org>) que a partir dos módulos *Per Base Sequence Quality*, *Per Base Sequence Content* e *Adapter Content*, é possível identificar a presença de adaptadores de sequenciamento, bases de má qualidade e regiões com distorções no conteúdo nucleotídico. Para limpeza e eliminação destas sequências foi utilizado o programa Trimmomatic (BOLGER *et al.* 2014) também presente na plataforma *Galaxy*.

3.7.3. Montagem, anotação do genoma e análises filogenômicas

Após o controle de qualidade, utilizamos o programa *Bowtie2* (LANGMEAD, B *et al.*, 2018) (plataforma *Galaxy* online) para conduzir um alinhamento entre as *reads* do sequenciamento de SPAn232 SAV (antes e depois da filtragem) com sequências genômicas de VACV-WR e CEyV2, amostra protótipo e a mais próxima, cujo genoma já foi sequenciado, respectivamente. Os resultados destas montagens com genomas de referência foram avaliados com o programa Tablet (MILNE, I *et al.*, 2009) e busca por identidade utilizando-se a ferramenta BLAST contra o banco de nucleotídeos do NCBI (nt) (Altschul *et al.*, 1990)

Para a montagem *de novo* (sem genoma de referência) usando grafos de Buijn foram utilizadas e comparadas as ferramentas SPAdes (BANKEVICH, N *et al.*, 2012) e Velvet (ZERBINO and BIRNEY 2008) e o melhoramento das montagens seguindo parte do pipeline Viramp (WAN, Y. *et al.*, 2015) através da plataforma *Galaxy* online. Os genomas montados foram anotados automaticamente usando o programa *Genome Annotation Transfer Utility* (GATU) (TCHEREPANOV, V *et al.*, 2006) e verificados usando o programa Artemis (CARVER, T *et al.*, 2012).

As sequências obtidas nas montagens foram usadas para reconstruir árvores filogenéticas de Máxima Verossimilhança com o modelo de substituição nucleotídica mais adequado para o conjunto de dados utilizando o programa IQ-TREE (NGUYEN, K *et al.*, 2015) e para visualizar a árvore e interpretar os resultados, o programa FigTree (RAMBAUT, A. 2010).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização biológica

4.1.1. Curva de crescimento de ciclo único

Para avaliar a multiplicação da amostra viral foi realizada uma curva de ciclo único do isolado *SPAn232 virus* (SAV) em células BSC-40. O ensaio foi realizado em cinco momentos independentes (replica biológica) e as titulações de cada curva foram realizadas em triplicata (réplica técnica). Uma curva do vírus VACV-WR (protótipo dos Vaccinia virus) foi também realizada a fim de comparação entre as curvas de ambas as amostras. O resultado pode ser visualizado na **Figura 9** abaixo:

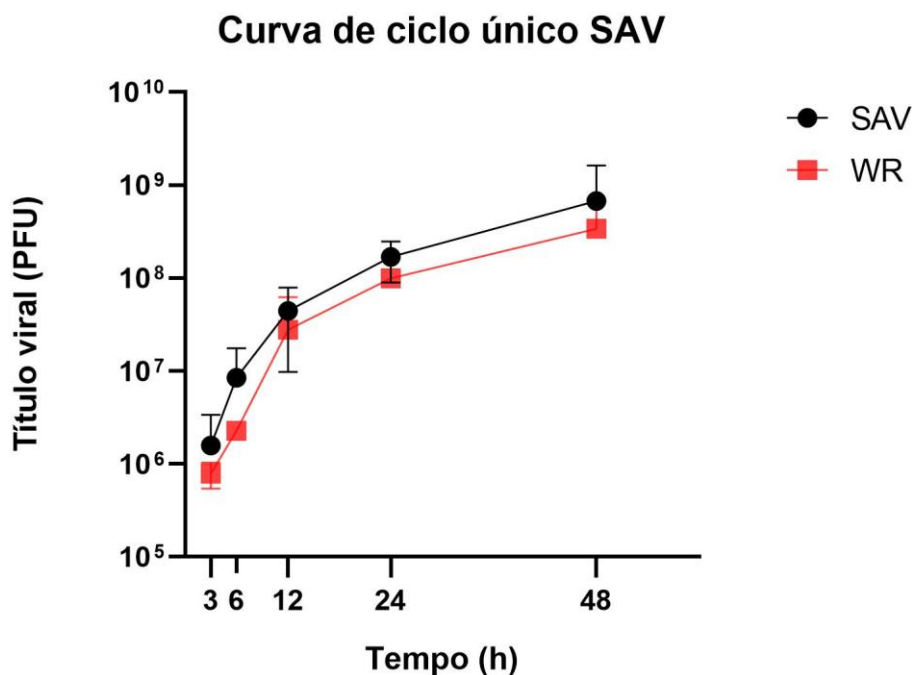


Figura 9: Curva de ciclo único da amostra SAV e VACV-WR em células BSC-40. Monocamadas de células BSC-40 foram infectadas com as amostras virais SAV e VACV-WR na multiplicidade de infecção de 10. Nos tempos de 3, 6, 12, 24 e 48 horas após a infecção as células foram coletadas e, posteriormente, tituladas.

A curva de ciclo único da amostra SAV apresenta um perfil de multiplicação bastante similar ao protótipo da espécie, o VACV-WR. Doze horas após a infecção, o vírus já apresenta um grande número de partículas viáveis, um aumento de quase 2 logs a quantidade de partículas infecciosas (de 10^6 a 10^8) em comparação com o primeiro

ponto da curva (3h). Além disso, observa-se um crescimento muito gradual do número de partículas até o tempo de 48h após a infecção.

4.1.2. Curva de crescimento de múltiplos ciclos

Para avaliar o crescimento da amostra viral foi realizada uma curva de múltiplos-ciclos do isolado *SPAN232 virus* (SAV) em células BSC-40. O ensaio foi realizado em cinco momentos independentes (replica biológica) e as titulações de cada curva foram realizadas em triplicata (réplica técnica). O resultado pode ser visualizado na 10 abaixo:

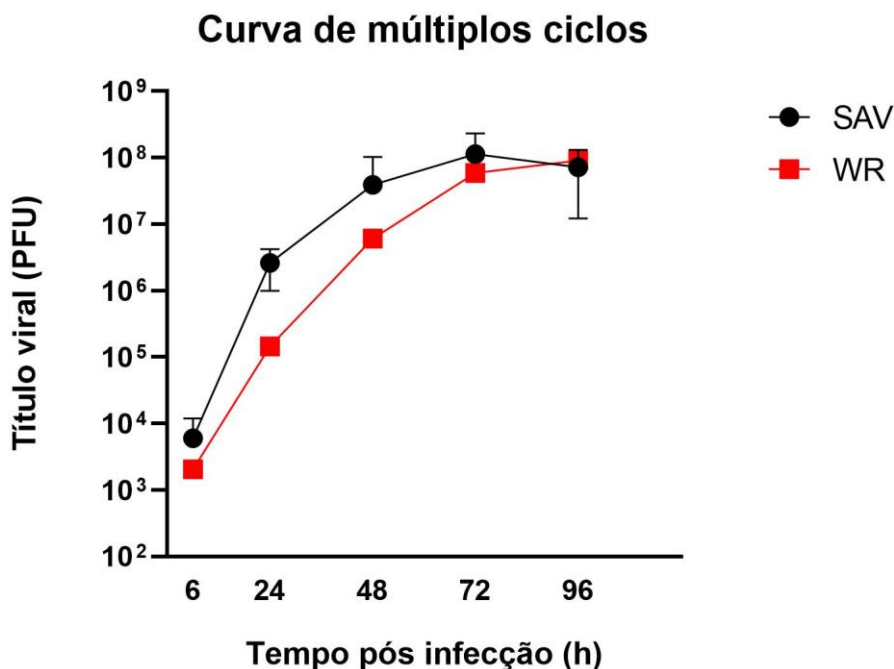


Figura 10: Curva de ciclo único da amostra SAV em células BSC-40. Monocamadas de células BSC-40 foram infectadas com a amostra viral SAV na multiplicidade de infecção de 10. Em seguida, após uma hora de adsorção, a monocamada foi lavada e incubada com meio suplementado com 10% de SFB. Nos tempos de 3, 6, 12, 24 e 48 horas após a infecção as células foram coletadas e, posteriormente, tituladas.

Na curva de múltiplos-ciclos do vírus SAV, assim como a de ciclo único, observa-se um aumento gradual na quantidade de vírions até o tempo de 48h p.i, sendo que nesta curva especificamente é possível observar que este aumento se mantém até o tempo de 72h p.i. A partir deste tempo (72h) nota-se então uma variação no padrão de crescimento. Tanto na curva de WR quanto na curva da amostra SAV o crescimento a partir do tempo de 72 varia, sendo que, no caso do SAV o número de partículas viáveis decai, e no caso do WR a taxa de multiplicação no número de partículas diminui ao ponto de se observar pouca diferença entre o tempo de 72h e o tempo de 96h. Além disso, também é possível observar uma grande semelhança entre a curva da amostra SAV e da amostra VACV-WR. Até quarenta e oito horas após a infecção a

taxa de aumento do número de partículas viáveis é maior que nos outros pontos, sendo que é possível observar que há um declínio no crescimento a partir do tempo de 72 h.p.i. Isso pode ser atribuído, assim como na curva de ciclo único à uma possível saturação das células para a replicação do vírus, ou seja, o número de células viáveis para a replicação do vírus diminui e conseqüentemente, diminui também o número de partículas virais.

4.1.3. Fenótipo de placa

O ensaio de fenótipo de placa viral foi realizado para observar a morfologia das placas de lise viral da amostra *SPAn232 virus* (SAV) em células BSC40. A monocamada foi infectada com 50 PFUs desses vírus, e incubadas com – DMEN líquido e CMC (carboximetilcelulose) – por 48 horas, e o resultado pode ser observado na figura 11 abaixo.

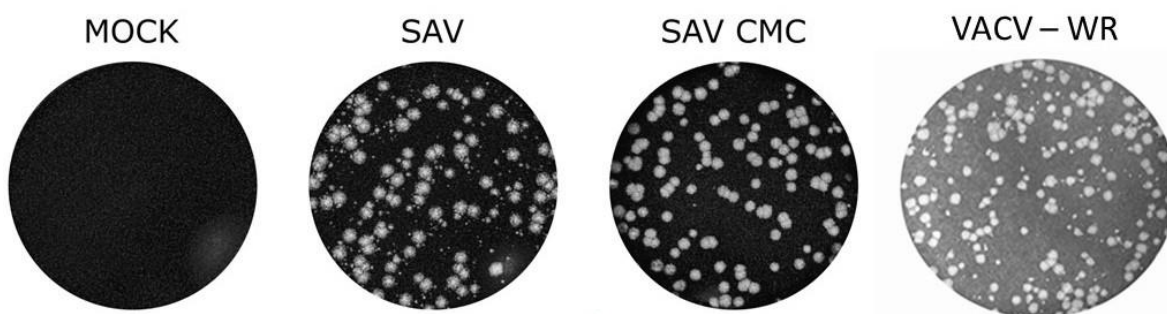


Figura 11: Ensaio de fenótipo de placa. O ensaio de fenótipo de placa da amostra *SPAn232 virus* (SAV) vírus foi realizado em células BSC40, infectadas com 50 PFUs do vírus e incubadas por 48 horas. Após esse tempo as células foram fixadas com solução de 4% de formol e coradas com cristal violeta a 1%. A figura mais acinzentada a direita foi retirado do artigo de ABRAHÃO et al., 2009.

Como mostra a figura 10, o ensaio de fenótipo de placa da amostra de vaccínia vírus SAV, após 48 de infecção o vírus já apresentou placas de lise de tamanho similar, evidenciando a homogeneidade do clone na morfologia destas placas com meio semi-sólido (CMC).. Em meio líquido, o SAV, não apresenta perfil “cometa” nas placas de lise, o que pode ser observado em algumas amostras de VACV. A morfologia e o diâmetro das placas de lise viral apresentada acima é similar às de diversas outras amostras de VACV já descritas na literatura, como mostrado na direita da figura o VACV-WR, retirado de ABRAHÃO et al., 2009 (PARRISH e MOSS., 2006; SATHESHKUMAR e MOSS., 2009; CAMPOS *et al.*, 2011).

4.1.4. Infecção MCA de ovos de galinha embrionados.

A caracterização biológica prosseguiu com a inoculação da amostra SAV em membrana corioalantóide (MCA) de ovos de galinhas embrionados, para a observação

de formação de *pocks* virais, característica exclusiva dos poxvírus. Os ovos inoculados com a amostra *SPAn232 virus* (SAV) revelaram *pocks* pequenos e esbranquiçados (figura 12), típicos de VACV, disseminados por toda a superfície da MCA, mas principalmente na região do inóculo. Este resultado foi similarmente observado nos ovos inoculados com VACV-WR (usado como amostra controle neste experimento). Esses *pocks* são uma característica clássica dos membros da família *Poxviridae*, e no passado eram uma das principais formas utilizadas para a descrição e caracterização destes vírus.

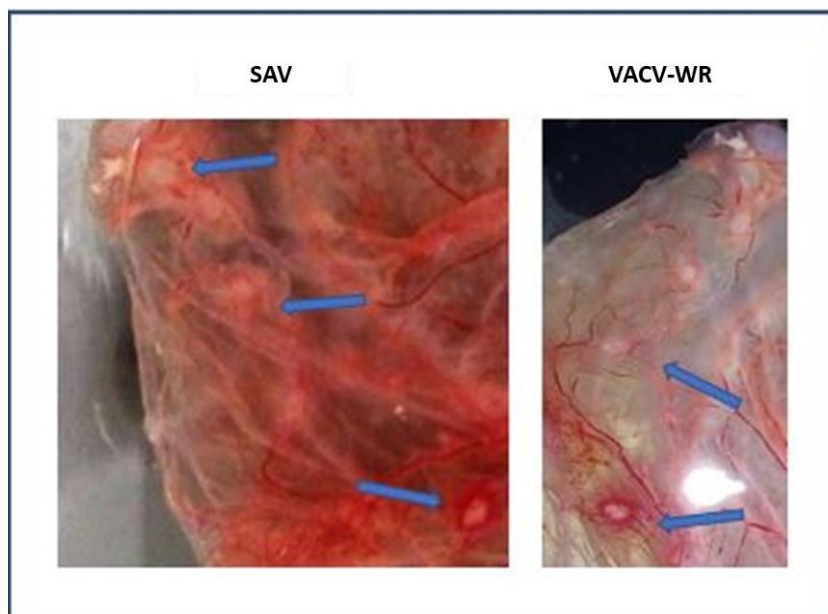


Figura 12: Visualização de *pocks*: Inoculação da amostra *SPAn232 virus* (SAV) em membrana corioalantóide de ovos embrionados, mostrando a formação de *pocks* virais, característica clássica causada por vírus da família *Poxviridae*.

De acordo com a figura é possível observar a formação de *pocks* causados pela inoculação da amostra SAV. Esses *pocks* são uma característica clássica dos membros da família *Poxviridae*, e que antigamente eram uma das principais formas utilizadas para a descrição e caracterização destes vírus.

4.2. Caracterização molecular – Sequenciamento total do genoma

4.2.1. Controle de qualidade dos dados do sequenciamento

O sequenciamento do genoma da amostra *SPAn232 virus* (SAV) utilizando a plataforma Illumina, equipamento Miseq V2 (500 c) gerou dois arquivos *paired-end* (*Forward* – F – e *Reverse* – R -) cada um com 1.529.186 sequências, sendo cada sequência de 35 a 251 pares de bases. Pela análise com a ferramenta *FastQC* foi possível observar uma boa qualidade das sequências (**Figura 13**) já que a maioria delas se encontra dentro da faixa verde, acima do fator de qualidade mínimo de 20.

Além disso foi possível identificar erros no módulo *Per Base Sequence Content* e no módulo *Sequence Duplication Levels* (figuras 12 e 13).

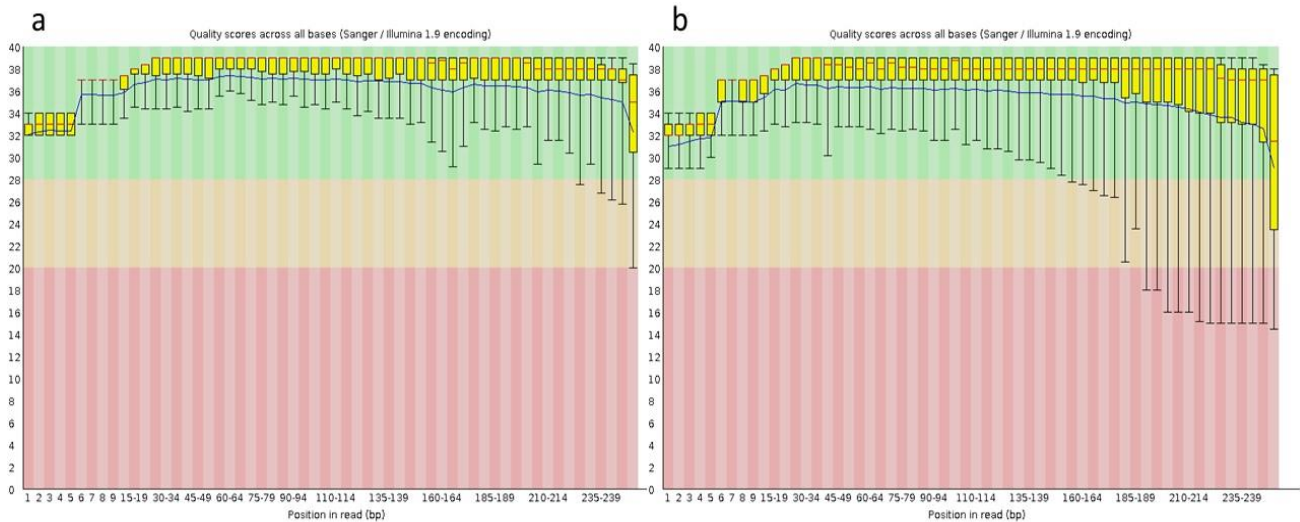


Figura 13: Gráfico sobre o conteúdo de bases das sequências - a) Gráfico de qualidade das sequências senso (Forward); b) Gráfico de qualidade das sequências anti-senso (Reverse).

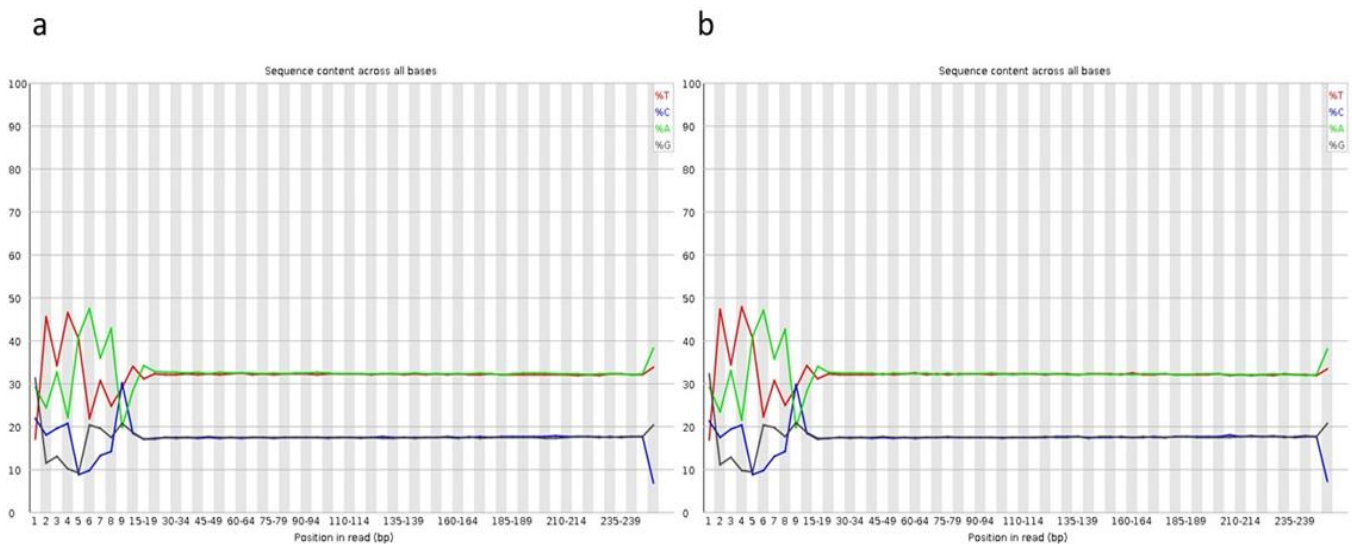


Figura 14: Gráficos de qualidade das sequências gerados pelo FastQC; a) Gráfico de qualidade das sequências senso (Forward); b) Gráfico de qualidade das sequências anti-senso (Reverse).

Per Base Sequence Content ou conteúdo de bases das sequencias é um módulo que apresenta uma proporção da posição de cada base nas sequencias, ou seja, deve refletir a quantidade relativa de cada base em relação a quantidade total destas bases no genoma. Na figura 14 podemos observar que cada base é dada por uma cor específica, e que no início do

sequenciamento há uma grande instabilidade ou um balanço na proporção das bases, sendo este o motivo do erro ou aviso neste módulo. No entanto, para algumas bibliotecas isto é muito comum devido ao modo como foram fragmentadas, podendo gerar desequilíbrio na quantidade de bases no início do processo.

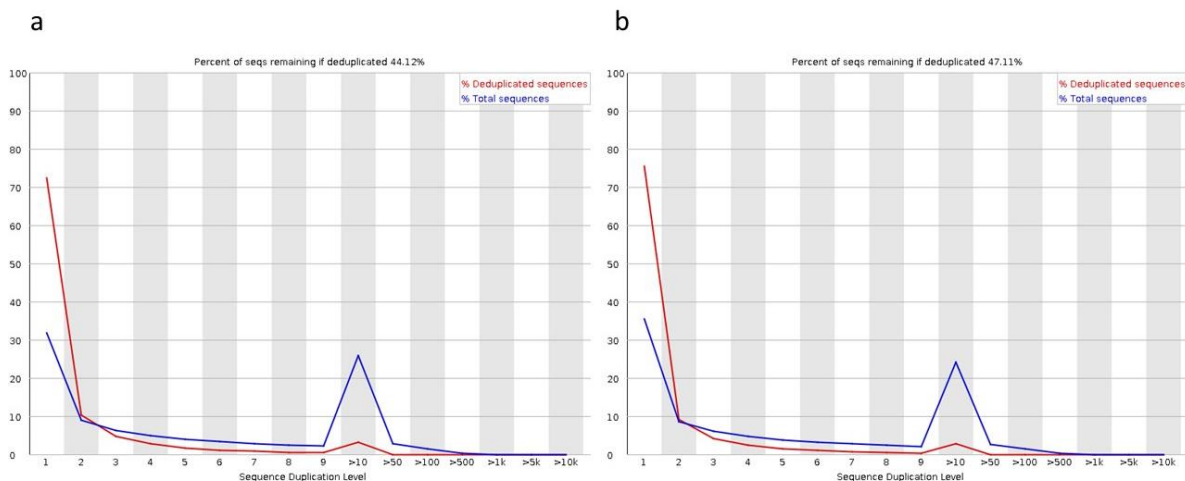


Figura 15: Nível de duplicações das sequências – a) Gráfico de qualidade das sequências senso (Forward); b) Gráfico de qualidade das sequências anti-senso (Reverse).

Sequence Duplication Levels ou níveis de sequências duplicadas representa o número relativo de sequências com diferentes graus de duplicação (figura 15). Um erro ou aviso neste módulo pode indicar um viés de enriquecimento ou mesmo uma baixa cobertura da sequência alvo. Como mostrado na figura 15, houve relativamente um alto nível de duplicação das sequências (47,11%), porém, a partir do ponto 10 a linha vermelha que mostra o nível de duplicação se torna mais plana e mais rente ao eixo, mostrando que apesar do erro no módulo, a maior parte das sequencias são únicas. Além disso, assim como no gráfico de conteúdo de bases das sequencias, apesar do erro, ambos os problemas não afetam a análise dos dados e estes erros não podem ser corrigidos no controle de qualidade

Após o processo de filtragem pelo software *Trimmomatic*, quatro arquivos foram gerados, sendo dois arquivos *paired-ends* com as sequências pareadas e dois arquivos *unpaired*, que contém as sequências cujo par foi removido na filtragem. Naturalmente, após a filtragem, a quantidade de sequências diminuiu e o tamanho das sequências também. Os arquivos *paired-end 1* (Forward) e *paired-end 2* (Reverse) ficaram com 1.496.870 sequências cada um, e o tamanho das sequências passaram a variar de 1 – 251 pares de bases de tamanho.

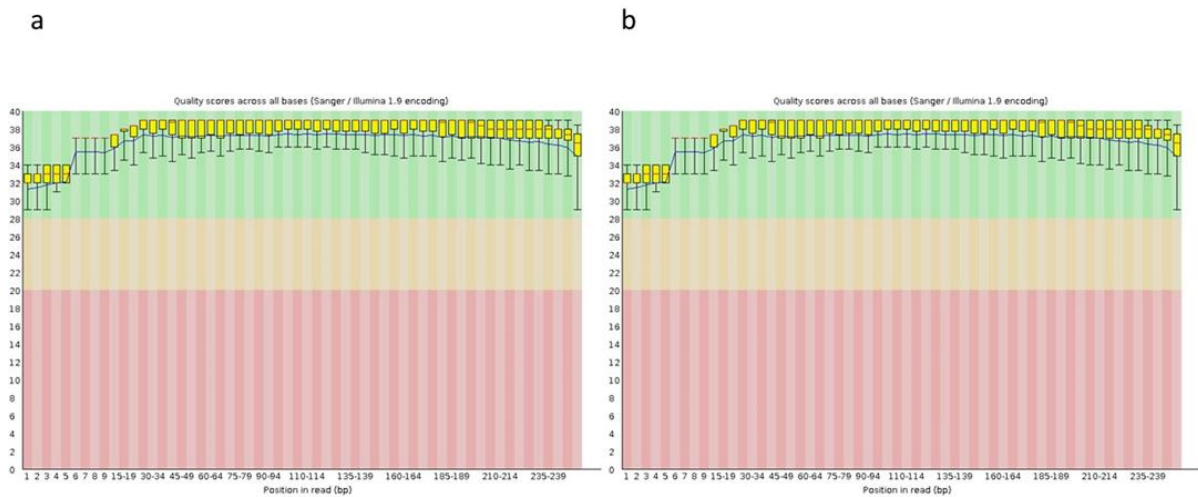


Figura 16: Gráficos de qualidade gerados pelo FastQC após a filtragem das sequências com *Trimmomatic*; a) Gráfico de qualidade do Arquivo *paired-end* 1(R); b) Gráfico de qualidade do Arquivo *paired-end* (F).

De acordo com a figura 16, após a trimagem observa-se que a qualidade dos dados melhorou, apresentando agora todas as sequencias dentro da linha verde, acima do fator de qualidade 30. Além disso, as barras de erro (linha preta) reduziram de tamanho, aumentando a confiabilidade dos dados.

Por fim avaliamos o nível de cobertura do sequenciamento. De acordo com a figura 17a, nota-se uma maior profundidade de cobertura em sequencias de maior tamanho (a partir de 500 pb). Na figura 16b observa-se que quanto menor a sequência maior foi a cobertura do sequenciamento, ou seja, os poucos fragmentos de sequências de grande tamanho tiveram uma menor cobertura, e as sequências de menor tamanho (grande maioria) tiveram um alto nível de cobertura. Além disso foi observado uma profundidade abrangendo milhares de vezes a cobertura do genoma viral demonstrando alta qualidade dos dados e a possibilidade de montar o genoma completo fidedigno.

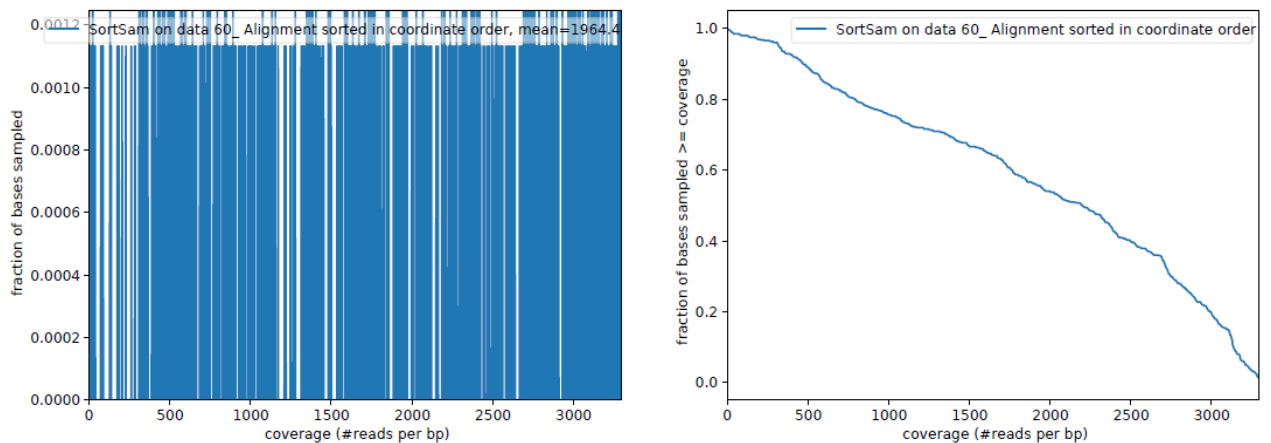


Figura 17: Gráficos de cobertura gerados na plataforma Galaxy Online após mapeamento e montagem com genoma de referência; a) Gráfico de qualidade do Arquivo *pairedend* 1(R); b) Gráfico de qualidade do Arquivo *paired-end* (F).

4.2.2. Montagem e anotação das sequências

Após controle de qualidade das amostras, os arquivos resultantes foram usados para a montagem do genoma *de novo* com os programas Velvet e SPAdes. Com o programa velvet, conseguimos obter 12 *scaffolds*, sendo o maior contig com 51049 pb, o N50 de 46237 pb e o conteúdo GC de 33,41% (Figura 18a). Já com o programa SPAdes, obtivemos um total de 2 *scaffolds* no final sendo o maior contig com 174863pb, representado mais de 90% do genoma dos VACV, com um conteúdo GC de 33.36% (Figura 17b). Vale ressaltar que com o programa Velvet foram observados apenas 8.49 nucleotídeos não identificados a cada 100kb enquanto que com o programa SPAdes foram identificados 41.00 nucleotídeos não identificados a cada 100kb. O genoma final da amostra SAV obtido com o velvet foi de 188.479 pb e com o SPAdes foi de 182.917pb (Figura 16). O genoma do VACV-WR depositado no GenBank e usado como referência possui 194.711pb.

Assembly	A)	velvet	Assembly	B)	SPAdes
# contigs (>= 0 bp)		13	# contigs (>= 0 bp)		18
# contigs (>= 1000 bp)		10	# contigs (>= 1000 bp)		2
Total length (>= 0 bp)		188699	Total length (>= 0 bp)		186064
Total length (>= 1000 bp)		187333	Total length (>= 1000 bp)		182917
# contigs		12	# contigs		2
Total length		188479	Total length		182917
Largest contig		51049	Largest contig		174863
GC (%)		33.41	GC (%)		33.36
N50		46237	N50		174863
N75		14306	N75		174863
L50		2	L50		1
L75		4	L75		1
# N's per 100 kbp		8.49	# N's per 100 kbp		41.00

Figura 18: Representação tabular dos resultados da montagem de novo do genoma do SAV; a) resultados obtidos após a montagem com o programa Velvet; b) resultados obtidos após a montagem com o programa SPAdes

A figura 19 representa através de um gráfico circular a montagem do genoma por ambos os programas utilizados. Do lado direito de cada círculo têm-se o genoma de referência (VACV-WR) e do lado esquerdo de cada dos círculos, têm-se a montagem do genoma de interesse (SAV). Com estes gráficos é possível observar os *contigs* formados e relaciona-los com o genoma de referência. Os gaps da montagem são representados na figura através dos espaços em branco entre os *contigs*. As linhas e cores dentro dos círculos representam a relação dos contigs formados com a montagem do genoma de interesse com o genoma de referência.

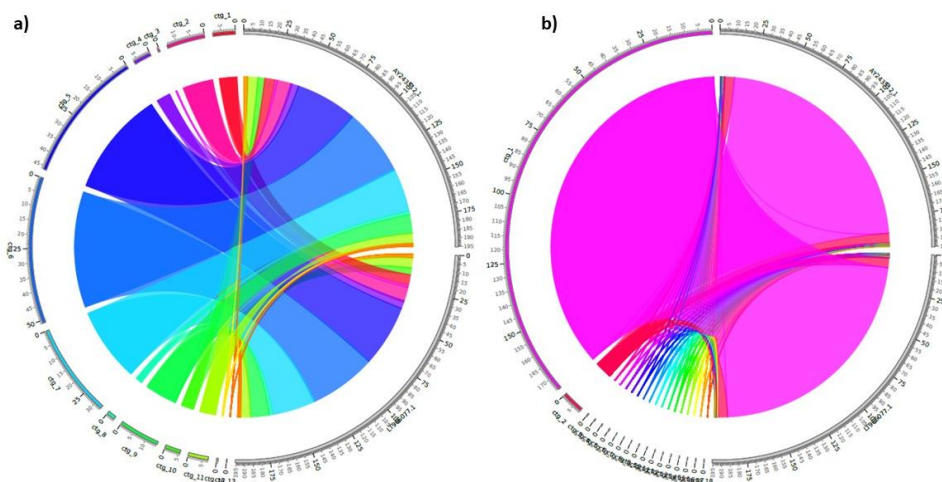


Figura 19: Gráficos do mapeamento dos *contigs* contra o genoma do VACV-WR como referência; a) Gráfico circos de mapeamento dos *contigs* obtidos com o programa *velvet*; b) Gráfico circos de mapeamento dos *contigs* obtidos com o programa *SPAdes*.

Como pode ser observado na figura 19, alguns gaps na região ITR do genoma foram deixados durante a montagem dos *contigs* com o programa *Velvet* e também com o programa *SPAdes*, apesar de minimizados (ou excluídos) durante a finalização da montagem e obtenção dos *scaffolds*. Isso já era esperado uma vez que essas regiões repetitivas dificultam muito a montagem do genoma e normalmente precisam ser finalizadas com auxílio de sequenciamento pelo método de Sanger ou com uso de redes neurais (ZHAO, K *et al.*, 2016).

A anotação automática do genoma detectou todas as 211 *ORFs* presentes no genoma de referência (VACV-WR) com, surpreendentemente, apenas 6 *ORFs* não idênticas. Todo o conjunto de dados sugere que a amostra SAV é uma VACV. A figura 20 apresenta a reconstrução filogenética dos *Vaccinia Virus* (VACV) pelo método estatístico de máxima verossimilhança. A árvore filogenética obtida associou a amostra SAV (SPAN232_UFMG) no grupo 2 dos VACV brasileiros.

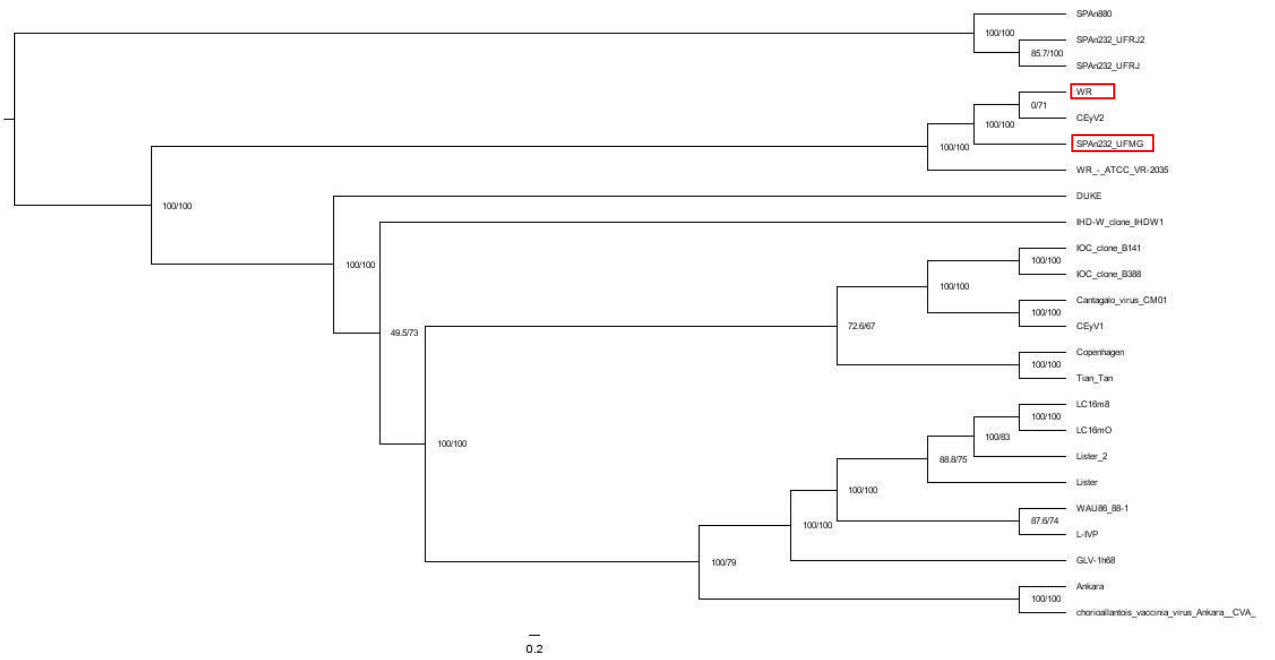


Figura 20: Reconstrução filogenética dos *Vaccinia Vírus* (VACV) pelo método estatístico de máxima verossimilhança

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho com o intuito de confirmar se SPAn232 poderia ser classificado como membro do gênero *Orthopoxvirus*, mais especificamente sendo uma possível linhagem de VACV, realizamos uma série de análises em um estudo biológico e molecular compreensivo da amostra onde abrangemos uma avaliação completa do ciclo de multiplicação do vírus, fenótipo de placas de lise, *pocks* em MCA e também o sequenciamento total de seu genoma.

De acordo com os resultados das curvas de multiplicação os vírus SAV e WR exibem um perfil bastante similar entre os vírus SAV e WR. As amostras apresentaram um aumento de partículas viáveis iniciando, surpreendentemente, com 6 horas pós infecção, e permanece crescente até o tempo de 48h após infecção nas curvas de ciclo único. O ensaio não apresentou diferença estatística ($p < 0,0564$). Complementando este resultado, a curva de múltiplos ciclos também revelou uma grande similaridade entre os vírus testados. Ambos apresentaram um aumento crescente do número de partículas até o tempo de 72h após infecção, sendo observado que nesta curva o vírus SAV diferente do WR apresentou maior capacidade replicativa devido ao maior número de partículas viáveis amostradas. A partir do tempo de 72 horas observa-se que o perfil de replicação das amostras variou, sendo que no caso do VACV-WR o número de partículas se manteve quase estável e no caso da amostra SAV o número de partículas diminuiu. Ambas as curvas de multiplicação viral representadas nos gráficos (figura 7 e 8) somente reforçam os dados já publicados por FONSECA *et al.*, 2002, trabalho onde foi caracterizado o isolado *SPAn232 virus* (SAV) como uma amostra de *Vaccinia virus*. Contudo, essa grande semelhança no perfil replicativo das amostras podem ser explicados pelo fato de ambos pertencerem ao mesmo subgrupo (grupo 2) dentro dos VACV (DRUMOND, *et al.* 2008).

A similaridade observada nos ensaios acima citados entre os vírus WR e SAV pode ser corroborada pelos resultados obtidos nos ensaios de fenótipo de placa de lise viral e infecção de MCA. Como mostra a figura 10, o ensaio de fenótipo de placa da amostra de vaccinia virus SAV apresentou placas de lise de tamanho similar, evidenciando sua homogeneidade na morfologia destas placas. A morfologia e o diâmetro das placas de lise viral apresentada acima é similar às de outras amostras de VACV já descritas na literatura (ABRAHÃO *et al.*, 2009; PARRISH e MOSS., 2006; SATHESHKUMAR e MOSS., 2009; CAMPOS *et al.*, 2011), porém é bastante diferente do apresentado por AFONSO., *et al.* 2012 onde a amostra SPAnV apresentou pequenas placas de lise detectáveis somente depois de 8 dias de após a infecção. Estes resultados (assim como os dados resultantes da análise do ciclo de multiplicação) indicam que provavelmente o isolado trabalhado no laboratório da UFRJ na verdade é diferente do isolado endereçado aos laboratórios da UFMG, mesmo sendo ambos nomeados como amostra de cotia virus SPAn232.

Os resultados da caracterização biológica descritos acima podem também ser corroborados e até explicados pelos resultados obtidos através do sequenciamento completo do genoma da amostra SAV. Com base nas sequências geradas após o alinhamento automático foi possível observar uma alta identidade com a amostra VACV-WR. Além disso, a árvore filogenética formada após o alinhamento agrupou a amostra SAV junto com o único membro do grupo 2 isolado no Brasil já sequenciado completamente, o CEyV2, bem como o VACV-WR também pertencente ao grupo 2.

Assim, esses resultados vão de acordo com dados já publicados na literatura (DRUMOND et al; 2008) em que análises filogenéticas de alguns genes confirma a separação dos VACV brasileiros em dois grupos, e ainda propõe que alguns das amostras analisadas (*BeAn58058* - BAV; *Guarani P1 virus* - GP1V e *Belo Horizonte virus* - VBH) incluindo a amostra SPAn232 (SAV) são íntimos geneticamente ao VACV-WR.

Portanto compondo-se de todos os dados apresentados neste trabalho, incluindo todas análises biológicas feitas, o sequenciamento do genoma e a análise filogenética realizada e ilustrada através da árvore filogenética pressupõe-se que o isolado SPAn232 virus (SPAnv) é mais uma amostra variante de VACV brasileira que circulou e foi isolada juntamente com o *Cotia virus* (COTV) nas florestas brasileiras na década de 60. Resultados anteriores que classificam o isolado SPAn232 virus (SPAnv) como um novo agente COTV possivelmente ocorreram devido a reações cruzadas.

6. CONCLUSÃO

Através do presente trabalho, conclui-se que:

- A amostra SPAn232 (SAV) apresenta um perfil de multiplicação bastante similar ao VACV-WR e muito divergente da amostra SPAn232 (COTV) analisada no RJ (AFONSO., et al 2012) em relação ao ciclo replicativo.
- A amostra SPAn232 (SAV) apresenta uma taxa de multiplicação maior que o VACV-WR.
- A amostra SPAn232 (SAV) apresenta morfologia de placa de lise bastante similar ao VACV-WR e distingue drasticamente da amostra SPAn232 (COTV) analisada no RJ (AFONSO., et al 2012).
- O tempo para o aparecimento do efeito citopático e placas de lise da amostra SPAn232 (SAV) é de 48h.
- O genoma da amostra SPAn232 (SAV) é intimamente relacionado ao genoma de VACV-WR, variando apenas no comprimento e no número de identidade de ORFs.
- A amostra SPAn232 virus (SPAnv) armazenada e caracterizada na UFMG é mais uma amostra variante de VACV brasileira, diferente da amostra encaminhada para a UFRJ que é um COTV.

7. REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, Jônatas S. et al. One more piece in the VACV ecological puzzle: could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil? **PloS one**, v. 4, n. 10, p. e7428, 2009.

ABRAHÃO, S. et al. Vaccinia Virus Infection in Monkeys, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 976-979, Junho 2010.

AFONSO, Priscila P. et al. Biological characterization and next-generation genome sequencing of the unclassified Cotia virus SPAn232 (Poxviridae). **Journal of virology**, v. 86, n. 9, p. 5039-5054, 2012.

BREMAN, Joel G.; HENDERSON, D. A. Poxvirus dilemmas—monkeypox, smallpox, and biologic terrorism. 1998. **N Engl J Med**. (1998).

CARVER, Tim et al. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 4, p. 464-469, 2011.

CONDIT, R. C., AND NILES, E. G. (2002). Regulation of viral transcription elongation and termination during vaccinia virus infection. **Biochim Biophys Acta** 1577(2), 325-36

CONDIT, Richard C.; MOUSSATCHE, Nissin; TRAKTMAN, Paula. In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion. **Advances in virus research**, v. 66, p. 31-124, 2006.

DA FONSECA, Flávio G. et al. Characterization of a vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. **Journal of general virology**, v. 83, n. 1, p. 223-228, 2002.

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

DE SOUZA TRINDADE, Giliane et al. Zoonotic vaccinia virus infection in Brazil: clinical description and implications for health professionals. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1370-1372, 2007.

DRUMOND BP, et al. 2008. Brazilian vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. **Microbes Infect.** 10: 185–197

ESPOSITO, J.J., et al., The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses - **ICTV 2005**

ESPOSITO, Joseph J. et al. Studies on the poxvirus Cotia. **Journal of General Virology**, v. 47, n. 1, p. 37-46, 1980.

FENNER F, Henderson DA, Arita I, Jezek Z, Ladnyi ID. Smallpox and its eradication. History of international public health. No. 6. Geneva: **World Health Organization**, 1989.

- FENNER, F. et al. Early efforts at control: variolation, vaccination, and isolation and quarantine. **History of International Public Health**, v. 6, p. 245-276, 1988.
- FERNANDES, T. M. Vacina antivariólica: seu primeiro século no Brasil (da vacina Jenneriana à animal). **História, Ciências, Saúde Manguinhos**, v. 6, n. 1.
- FONSECA, Flávio Guimarães da et al. Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. **Archives of virology**, v. 143, n. 6, p. 1171-1186, 1998.
- GUARNER, Jeannette et al. Monkeypox transmission and pathogenesis in prairie dogs. **Emerging infectious diseases**, v. 10, n. 3, p. 426, 2004.
- GUBSER, C; HÚE, S; KELLAM, KELLAM, P & SMITH, G. L. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 105-117. 2004
- HENDERSON, Donald A. et al. Smallpox as a biological weapon: medical and public health management. **Jama**, v. 281, n. 22, p. 2127-2137, 1999.
- ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. **ICTV**, 2018. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>.
- JACOBS. Bertram L. et al. Vaccinia virus vaccines: past, present and future. **Antiviral Research**, v.84, n.1, p 1-13, 2009.
- JAMES, N. **FENNER'S VETERINARY VIROLOGY – POXVIRIDAE CAP7**. Elsevier Academic Press, 2017.
- KERR, Peter J.; BEST, S. M. Myxoma virus in rabbits. **Revue scientifique et technique-Office international des epizooties**, v. 17, p. 256-264, 1998.
- KING, Andrew MQ et al. (Ed.). **Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier, 2012.
- KROON, Erna Geessien et al. Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: from field to therapy. **Antiviral research**, v. 92, n. 2, p. 150-163, 2011.
- LANGMEAD, Ben et al. "Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors" **Bioinformatics (Oxford, England)** vol. 35,3 (2018): 421-432.
- LAW, Mansun et al. Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 15, p. 5989-5994, 2006.
- LEITE, A. et al. Passatempo Virus, a Vaccinia Virus Strain, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 1935-1938, dezembro 2005.
- LI, H.; HANDSAKER, B.; WYSOKER, A.; FENNELL, T.; RUAN, J.; HOMER, N.; MARTH, G.; ABECASIS, G.; DURBIN, R. The sequence alignment/map format and SAMtools. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 16, p. 2078-2079, ago. 2009.
- LOBATO, Z. I. P. et al. Outbreak of exantemal disease caused by Vaccinia virus in human and cattle in Zona da Mata region, Minas Gerais. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 57, n. 4, p. 423-429, 2005.

LOPES, Oscar De Souza et al. Cotia virus: a new agent isolated from sentinel mice in São Paulo, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 14, n. 1, p. 156-157, 1965.

MASTRANGELO, Michael J.; LATTIME, Edmund C. Virotherapy clinical trials for regional disease: in situ immune modulation using recombinant poxvirus vectors. **Cancer gene therapy**, v. 9, n. 12, p. 1013, 2002.

MCFADDEN et al., POXVIRUS TROPISM. **NATURE**, v. 3, p. 201-213, Março 2005.

MILNE, Iain et al. Tablet—next generation sequence assembly visualization. **Bioinformatics**, v. 26, n. 3, p. 401-402, 2009.

MOSS, B. Poxviridae: The viruses and their replication. In “**Virology**” (BN Fields, DM Knipe, RM Chanock, TP Monath, PM Howley, JL Melnick, B. Roizman, and SE Strauss, Eds.), Vol. 2. 1996.

MOSS, B. *Poxviridae: The viruses and their replication*. IN **Fundamental Virology**. Forth Edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

MOSS, B. Poxviridae: The Viruses and Their Replication. In: **B. N. Fields**, Knipe, D. M., Howley, P.M. (Ed.). **Virology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, v.2, p.2906-2946. 2007.

MOSS, Bernard. Poxvirus DNA replication. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, p. a010199, 2013.

MOSS, Bernard. Poxvirus entry and membrane fusion. **Virology**, v. 344, n. 1, p. 48-54, 2006.

MOSS, Bernard. Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development. **Science**, v. 252, n. 5013, p. 1662-1667, 1991.

PANICALI, Dennis; PAOLETTI, Enzo. Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, n. 16, p. 4927-4931, 1982.

PARRISH, Susan; MOSS, Bernard. Characterization of a vaccinia virus mutant with a deletion of the D10R gene encoding a putative negative regulator of gene expression. **Journal of virology**, v. 80, n. 2, p. 553-561, 2006.

PATTISON, Mark; MCMULLIN, Paul; BRADBURY, Janet M. (Ed.). **Poultry diseases**. Elsevier Health Sciences, 2008.

PIGNOLET, Beatrice et al. Safety and immunogenicity of myxoma virus as a new viral vector for small ruminants. **Journal of general virology**, v. 89, n. 6, p. 1371-1379, 2008.

QUIXABEIRA-SANTOS, J. C. et al. Animal Movement and Establishment of Vaccinia Virus Cantagalo Strain in Amazon Biome, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 726-729, Abril 2011.

RAMÍREZ, Juan C.; GHERARDI, M. Magdalena; ESTEBAN, Mariano. Biology of attenuated modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and

activation of B-and T-cell immune responses in comparison with the Western Reserve strain and advantages as a vaccine. **Journal of virology**, v. 74, n. 2, p. 923-933, 2000.

ROTZ LD, Dotson DA, Damon IK, Becher JA. Vaccinia (smallpox) vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2001. ACIP. **MMWR Recomm Rep** 2001; 50:1–25

SATHESHKUMAR, P. S.; MOSS, Bernard. Characterization of a newly identified 35-amino-acid component of the vaccinia virus entry/fusion complex conserved in all chordopoxviruses. **Journal of virology**, v. 83, n. 24, p. 12822-12832, 2009.

SCHRAMM, B.; LOCKER, K. Review Cytoplasmic Organization of Poxvirus DNA Replication. **Traffic**, p. 839–846, 2005

SENKEVICH, Tatiana G. et al. Poxvirus multiprotein entry–fusion complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 51, p. 18572-18577, 2005.

SHUSTER, S. C. **Next-generation sequencing transform today’s biology**. Nat. Method, v. 5, p. 16-18, 2008

SILVA, Luiz Jacintho da. Guerra biológica, bioterrorismo e saúde pública. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 6, p. 1519-1523, Dec. 2001.

SMITH, E. S.; MANDOKHOT, A.; EVANS, E. E.; MUELLER, L.; BORRELLO, M. B.; SAHASRABUDHE, D. M. & ZAUDERER, M. Letality-based selection of recombinant genes in mammalian cells: Application to identifying tumor antigens. **Nature Medicine**. v.7, p. 967-972. 2001

SMITH, G. L., B. J. Murphy, et al. Vaccinia virus motility. **Annu Rev Microbiol**, v.57, p.323-42. 2003

SODEIK, Beate; KRIJNSE-LOCKER, Jacomine. Assembly of vaccinia virus revisited: de novo membrane synthesis or acquisition from the host?. **Trends in microbiology**, v. 10, n. 1, p. 15-24, 2002.

TRINDADE, D. S. et al. Araçatuba Virus: A Vaccinialike Virus Associated with Infection in Humans and Cattle. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 155-160, fevereiro 2003

TRINDADE, et al. Isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brasil: Implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, p. 486–490, 2006.

TRINDADE, Giliane S. et al. Belo Horizonte virus: a vaccinia-like virus lacking the A-type inclusion body gene isolated from infected mice. **Journal of general virology**, v. 85, n. 7, p. 2015-2021, 2004.

TRINDADE, Giliane S. et al. Brazilian vaccinia viruses and their origins. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 7, p. 965, 2007.

UEDA, Y. et al. Studies on Cotia virus—an unclassified poxvirus. **Journal of General Virology**, v. 40, n. 2, p. 263-276, 1978.

UEDA, Yoshiaki; MORIKAWA, Shigeru; WATANABE, Takahiro. Unclassified poxvirus: characterization and physical mapping of Cotia virus DNA and location of a sequence capable of encoding a thymidine kinase. **Virology**, v. 210, n. 1, p. 67-72, 1995.

VANDERPLASSCHEN, Alain et al. Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 13, p. 7544-7549, 1998.

VELLOZZI, Claudia et al. Generalized vaccinia, progressive vaccinia, and eczema vaccinatum are rare following smallpox (vaccinia) vaccination: United States surveillance, 2003. **Clinical infectious diseases**, v. 41, n. 5, p. 689-697, 2005.

VORA, Surabhi et al. Severe eczema vaccinatum in a household contact of a smallpox vaccinee. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 10, p. 1555-1561, 2008.

WAN, Yinan et al. VirAmp: a galaxy-based viral genome assembly pipeline. **Gigascience**, v. 4, n. 1, p. 19, 2015.

WITTEK, RICCARDO. "Organization and expression of the poxvirus genome." **Experientia** 38.3 (1982): 285-297.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. The global eradication of smallpox. Final Report of the Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication. **Geneva**, Switzerland, 1980.