

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Perfil fenotípico das células NK em uma re-
exposição viral, *in vitro*, após uma infecção
humana natural prévia pelo *Vaccinia virus*

EDUARDO AUGUSTO DOS SANTOS MOREIRA SILVA

Belo Horizonte

2014

EDUARDO AUGUSTO DOS SANTOS MOREIRA SILVA

Perfil fenotípico das células NK em uma re-exposição viral, *in vitro*, após uma infecção humana natural prévia pelo *Vaccinia virus*

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia, do Departamento de Bioquímica e Imunologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Correa Oliveira

Doutorando: Eduardo Augusto dos Santos Moreira Silva

Belo Horizonte

2014



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE EDUARDO AUGUSTO DOS SANTOS MOREIRA SILVA. Aos dezesseis dias do mês de maio de 2014 às 09:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Perfil fenotípico das células NK em uma re-exposição viral in vitro, após uma infecção humana natural prévia pelo Vaccinia virus", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Rodrigo Corrêa Oliveira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Cláudio Antonio Bonjardim (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Ana Maria Caetano de Faria (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli (Centro de Pesquisas Rene Rachou-FIOCRUZ), aprovado; Dr. Daniel Santos Mansur (Universidade Federal de Santa Catarina), aprovado; Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira - Orientador (Centro de Pesquisas Rene Rachou-FIOCRUZ), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado APROVADO. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 16 de maio de 2014.

Lis Antonelli
 Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli (Centro de Pesquisas Rene Rachou-FIOCRUZ)

Daniel Santos Mansur
 Dr. Daniel Santos Mansur (Universidade Federal de Santa Catarina)

Ana Maria Caetano de Faria
 Dra. Ana Maria Caetano de Faria (UFMG)

Cláudio Antonio Bonjardim
 Dr. Cláudio Antonio Bonjardim (UFMG)

Rodrigo Corrêa Oliveira
 Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira - Orientador (Centro de Pesquisas Rene Rachou-FIOCRUZ)

Jader dos Santos Cruz
 Prof. Jader dos Santos Cruz
 Coordenador de Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

A Dani, Bianca e a Deus por tudo e pelo apoio na realização desse trabalho.

Aos meus pais que sempre apoiaram meus estudos e colaboraram para a concretização dessa nova etapa.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, eu gostaria de agradecer a Deus, pela força nos momentos mais difíceis dessa trajetória e por iluminar o meu caminho na conquista dessa nova etapa.

A Dani, por toda a sua paciência, perseverança, apoio, respeito, colaboração e amor, aspectos essenciais para o sucesso desse trabalho. Obrigado por tudo.

Aos meus pais, pelo carinho, amizade e apoio para a concretização desse trabalho.

Ao meu orientador Rodrigo, pela oportunidade e orientação durante a execução desse trabalho.

Aos meus irmãos, pelo incentivo e apoio e por fazerem parte da minha vida.

Aos amigos e companheiros de Laboratório.

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia.

A Celise pelo apoio e ajuda nas questões burocráticas.

A toda minha família e amigos que, de alguma forma, contribuíram para a conquista desse sonho.

A todos os pacientes que contribuíram voluntariamente para participação nesse trabalho.

"Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, por que o mundo pertence a quem se atreve. E a vida é "muito" para ser insignificante." (Augusto Branco).

RESUMO

Vaccinia virus (VACV) é o agente causador de uma importante zoonose que afeta o gado bovino e seres humanos em várias regiões do Brasil. Pouco se sabe acerca da resposta imunológica contra uma infecção natural pelo VACV, mas tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa são importantes. As células NK, nesse contexto, constituem um elemento importante na resposta imune inata contra o VACV, sendo os receptores citotóxicos naturais (NCR) figuram entre os receptores mais importantes das células NK no reconhecimento das células infectadas pelo VACV. Existem poucos estudos acerca da participação desses NCRs e outros receptores de ativação das células NK. Desse modo, o presente estudo tem como objetivo descrever e comparar o fenótipo das células NK de indivíduos previamente vacinados com indivíduos previamente infectados pelo VACV, após uma estimulação *in vitro* com VACV. Nossos dados sugerem que a estimulação com o VACV gera uma resposta citotóxica pelas células NK, evidenciadas pelo aumento dos NCRs em indivíduos previamente infectados (vacinados ou não) e nos indivíduos não infectados vacinados, quando comparados com indivíduos não infectados não vacinados. No entanto, os processos de degranulação e secreção parecem estar inibidos nos indivíduos infectados (vacinados ou não) e nos indivíduos não infectados vacinados, quando comparados com indivíduos não infectados não vacinados. Demonstrou-se que a estimulação com o VACV gera uma diminuição no percentual de células expressando perforina, granzima A e CD107a, mas causa um aumento no percentual de CD94, CD161 e Granzima B nos indivíduos infectados (vacinados ou não) e nos indivíduos não infectados vacinados, quando comparados com indivíduos não infectados não vacinados. Além disso, o percentual de células IFN- γ^+ foi significativamente menor em indivíduos não infectados não vacinados, comparados aos indivíduos infectados e não infectados vacinados. Em relação ao TNF- α houve aumento do percentual de células TNF- α^+ , nos indivíduos infectados (vacinados ou não) e nos indivíduos não infectados vacinados, quando comparados com indivíduos não infectados não vacinados.

Palavras chaves: Vaccinia virus; Infecções por Poxvirus; Infecções; Zoonoses; Vacina contra a varíola

Apoio financeiro: CAPES/CNPQ/FAPEMIG

ABSTRACT

Vaccinia virus (VACV) is the causative agent of a zoonotic infection that affects cattle and humans in many regions of Brazil. Little is known about the human immunological response against VACV natural infection, but it is clear that both the innate and adaptative responses are important. It seems that the natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44, and NKp46 are the most important NK cell receptors for the recognition of the VACV-infected target cell. At this moment, there are few studies that analyze the profile of natural killer after a natural VACV infection. So, the present study compares the profile of NK cells in an *in vitro* re-exposure by *Vaccinia virus* (VACV), in groups that have had a previous vaccination or natural infection. A short stimulation with UV-inactivated VACV was performed. Our data suggests that stimulation with VACV triggers a cytotoxic response by NK cells marked by an increase of NCRs in infected (vaccinated and unvaccinated) subjects and in non-infected vaccinated patients, when compared with non-infected unvaccinated individuals. However, the degranulation and secretion processes are inhibited in infected (vaccinated and unvaccinated) subjects and in the non-infected vaccinated patients, when compared with non-infected unvaccinated individuals. We demonstrated that stimulation with VACV downregulates the percentage of expression of Perforin, Granzyme A, and CD107a, but upregulate CD94, CD161 e Granzyme B in infected (vaccinated and unvaccinated) subjects and in non-infected vaccinated patients, when compared with non-infected unvaccinated individuals. Furthermore, the percentage of IFN- γ^+ NK cells was significantly lower in non-infected unvaccinated subjects, when compared with infected (vaccinated and unvaccinated) and non-infected vaccinated individuals. Our results also show that the percentage of TNF- α^+ NK cells was significantly higher in infected (vaccinated and unvaccinated) subjects and in non-infected vaccinated patients, when compared with non-infected unvaccinated individuals, after *in vitro* stimulation with UV-inactivated VACV.

Keywords: Vaccinia virus; Poxviridae Infections; Infection; Zoonoses; Smallpox Vaccine.

Financial support: CAPES/CNPQ/FAPEMIG

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Morfologia dos Poxvirus.....	22
FIGURA 2:	Organização do genoma do VACV	23
FIGURA 3:	Representação esquemática das etapas da replicação do VACV	26
FIGURA 4:	Eczema vaccinatum	28
FIGURA 5:	Lesões em humanos causadas por amostras de VACV	41
FIGURA 6:	Lesões em bovinos causadas por amostras de VACV	42
FIGURA 7:	Representação esquemática de algumas proteínas imunomodulatórias codificadas por poxvírus	62
FIGURA 8:	Representação das regiões do estado de Minas Gerais que foram afetadas pelos surtos de Vaccinia virus, em 2005.....	71
FIGURA 9:	Seleção de células NK, co-expressando marcadores celulares	81
FIGURA 10:	Fluxograma de trabalho	83

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1:	Comparação do percentual de células NK expressando os NCRs (NKp30, NKp44 e NKp46) e a molécula CD161, entre os grupos de indivíduos infectados ou não, antes e após estimulação <i>in vitro</i> com o VACV inativado	92
GRÁFICO 2	Comparação do percentual de células NK expressando os NCRs (NKp30, NKp44 e NKp46) e a molécula CD161, entre os grupos de indivíduos infectados ou não, após estimulação <i>in vitro</i> com o VACV inativado	94
GRÁFICO 3	Expressão de CD107a, Perforina e Granzimas A e B em células Natural Killer de indivíduos infectados ou não pelo Vaccinia virus, antes e após estimulação <i>in vitro</i> com o vírus inativado	96
GRÁFICO 4	Expressão de CD94 em células Natural Killer de indivíduos infectados ou não pelo <i>Vaccinia virus</i>, antes e após estimulação <i>in vitro</i> com o vírus inativado	98
GRÁFICO 5	Expressão de IFN-γ e TNF-α em células Natural Killer de indivíduos infectados ou não pelo Vaccinia virus, antes e após estimulação <i>in vitro</i> com o vírus inativado	100

LISTA DE TABELAS

TABELA 1:	Caracterização e Distribuição absoluta da amostragem estudada	86
TABELA 2:	Frequência dos sintomas apresentados pelos indivíduos infectados vacinados e não vacinados	88
TABELA 3:	Distribuição relativa das subpopulações de células NK no sangue total de indivíduos previamente infectados ou não submetidos ou não à vacinação contra a varíola, após a estimulação in vitro com o VACV inativado por luz UV	90

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Classificação dos vírus da subfamília Chordopoxvinae	20
QUADRO 2: Relação dos anticorpos usados para caracterização das células NK.	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ARAV	Araçatuba vírus
BAV	BeAn vírus
BHV	Belo Horizonte vírus
CTGV	Cantagalo vírus
CDC	Centers for Disease Control
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DNA	Deoxyribonucleic acid
Fig	Figura
GP1V	Guarani P1 virus
GP2V	Guarani P2 virus
HA	Hemaglutinina
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ICTV	International Committee on Taxonomy of Virus
IFN- γ	Interferon gamma
ITRs	Inverse Terminal Repeat
μ g	Microgramas
μ L	Microlitro
mL	Mililitro
μ M	Micromolar
mM	Milimolar
ORF	Open read frame
pb	Pares de base
PBS	Phosphate Buffered Saline (Solução Tampão Salina)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PSTV	Passatempo vírus
RNA	Ribonucleic acid
RNA _m	RNA mensageiro
rpm	Rotações por minuto
Tab	Tabela
Th1	T helper 1
TK	Timidina kinase

TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VARV	Varíola virus
VGF	Vaccinia growth factor
VACV	Vaccinia virus
VE	Vírus envelopado
VM	Vírus maduro

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO	16
1.1) Histórico	17
1.2) Os <i>Poxvirus</i>	19
1.2.1) <i>Classificação dos Poxvirus</i>	19
1.2.2) <i>Morfologia dos Poxvirus</i>	21
1.2.3) <i>Genoma dos Poxvirus</i>	22
1.2.4) <i>Ciclo de multiplicação dos Poxvirus</i>	23
1.2.5) <i>Poxvírus Isolados na Atualidade</i>	27
1.2.6) <i>Poxvírus isolados no Brasil</i>	29
1.2.6.1) <u><i>Vírus BeAn 58058</i></u>	30
1.2.6.2) <u><i>SPAN232 vírus (SPANv)</i></u>	31
1.2.6.3) <u><i>Vírus Cantagalo</i></u>	31
1.2.6.4) <u><i>Vírus Muriaé</i></u>	32
1.2.6.5) <u><i>Vírus Passatempo</i></u>	32
1.2.6.6) <u><i>Vírus Belo Horizonte</i></u>	33
1.2.6.7) <u><i>Vírus Araçatuba</i></u>	34
1.2.6.8) <u><i>Vírus Guarani</i></u>	35
1.2.6.9) <u><i>Outros casos</i></u>	36
1.2.7) <i>Vias de transmissão</i>	37
1.2.8) <i>Vias de eliminação</i>	38
1.2.9) <i>Hospedeiros dos VACV</i>	39
1.2.10) <i>Patogênese viral e sinais clínicos das infecções por Poxvirus em humanos</i>	39
1.2.11) <i>Patogênese viral e sinais clínicos das infecções por Poxvirus em bovinos</i>	41
1.2.12) <i>Diagnóstico</i>	43
1.2.13) <i>Origem dos Vaccinia virus isolados no Brasil</i>	43
1.3) <i>Resposta imune contra as infecções por Poxvirus</i>	45

<i>1.3.1) Participação do sistema Interferon e outras citocinas na resposta imune contra o Vaccinia virus</i>	46
<i>1.3.2) Participação do sistema do complemento na resposta imune contra o Vaccinia virus</i>	49
<i>1.3.3) Participação das células do sistema monocítico-fagocitário na resposta imune contra o Vaccinia virus</i>	50
<i>1.3.4) Participação das células Natural Killer na resposta protetora contra o Vaccinia virus</i>	51
<i>1.3.3) Participação das células do sistema imune adaptativo e a manutenção da memória imunológica contra o VACV</i>	56
<i>1.3.4) Evasão imune dos Poxvírus</i>	59
1.4) Problema	62
1.5) Hipótese	63
1.6) Justificativa	63
2) OBJETIVOS	66
2.1) Objetivo Geral	67
2.1) Objetivos Específicos	67
3) METODOLOGIA	68
3.1) População estudada	69
3. 2) Coleta das amostras	72
3.3) Avaliação hematológica	73
3.4) Células e vírus	73
3.5) Ensaio de soroneutralização	74
3.6) Ensaio de ELISA IgG	75
3.7) Análise de marcadores de superfície e citocinas intracitoplasmáticas em células NK do sangue periférico após estimulação <i>in vitro</i>	75
3.8) Obtenção e análise dos dados no citômetro de fluxo	79
3.9) Análise Estatística	82
4) RESULTADOS	84
4.1) Análise clínica epidemiológica	85

4.2) Estudo do perfil imunofenotípico de leucócitos do sangue periférico: porcentagem de células NK na população total de células do sangue periférico	89
4.3) Estudo do perfil imunofenotípico de leucócitos do sangue periférico: frequência de subpopulações de células NK	90
<i>4.3.1) Análise de Células NK co-expressando NKp30, NKp44 e NKp46 e CD161</i>	<i>91</i>
<i>4.3.2) Análise de Células NK co-expressando CD107a, Perforina, Granzima A e Granzima B.....</i>	<i>95</i>
<i>4.3.3) Análise de Células NK co-expressando C94</i>	<i>97</i>
<i>4.3.4) Estudo do padrão de citocinas intracitoplasmáticas: expressão de IFNγe TNFα por Células NK, antes e após estimulação in vitro com VACV</i>	<i>99</i>
5) DISCUSSÃO	101
6) CONCLUSÃO	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
APÊNDICE A	151
APÊNDICE B	156
APÊNDICE C	159
ANEXO A	161
ANEXO B	162
ANEXO C	163
ANEXO D	164

1) INTRODUÇÃO

1) INTRODUÇÃO

1.1) Histórico

A varíola é, dentre as chamadas “doenças pestilenciais”, uma das que mais marcou a história da humanidade, tornando-se um símbolo de morte e deformidade. Matando e deformando pessoas; tão assustadora que os chineses não davam nome às crianças enquanto não sobrevivessem a um ataque da enfermidade: só então poderiam ser contadas no número dos vivos (SCLAR, 1996). E não era exclusivamente uma “peste do Oriente”; como Thomas Babington Macaulay (1800-59) escreve, em “A história da Inglaterra desde a ascensão de James II – vol. 4”:

A varíola estava sempre presente, enchendo de cadáveres os pátios das igrejas, amedrontando constantemente aqueles a quem não tinha ainda atacado. Estampava nas criaturas cujas vidas poupava as medonhas marcas de seu poder, tornando a criança uma hedionda criatura que fazia a mãe estremecer, transformando a face das noivas em objeto de horror para seus prometidos.

Em 1796, Edward Jenner demonstrou que o material colhido de pústulas humanas causadas pelo vírus da varíola bovina ou *Cowpox virus* (CPV) quando inoculados em uma pessoa saudável causavam uma infecção similar e proporcionavam proteção contra a infecção da varíola humana. Foi a partir dessas observações que se evidenciou o fenômeno da imunização, o que por sua vez deu origem ao desenvolvimento da vacina, palavra derivada do latim *vacca*, que significa vaca (HENDERSON; MOSS, 1999; FENNER, 1996).

Amplas campanhas mundiais para erradicação da varíola foram propostas, ocorrendo, então, vacinação em massa em todas as regiões da Terra. O último caso de infecção natural por varíola ocorreu na Somália em 1977. Posteriormente, em 1978, ocorreu na Inglaterra um caso fatal de varíola contraído em laboratório, quando, por falha nos cuidados de biossegurança, uma amostra de vírus atingiu um profissional que trabalhava em sala próxima ao local onde o vírus da varíola era manipulado. Sendo assim, desde o começo da História, a varíola imprimiu sua marca nos assuntos médicos, políticos e culturais do homem até a sua erradicação, declarada pela

Organização Mundial da Saúde em maio de 1980, sendo, então, descontinuada a sua vacinação. (FENNER *et al.*, 1988; HENDERSON; MOSS, 1999). A sua erradicação representa um dos marcos fundamentais da saúde pública em todos os tempos, tendo se tornado um emblema do uso da ciência e da tecnologia para o controle das doenças. (RASKA, 1976; FENNER *et al.*, 1988).

A descontinuação da vacinação da varíola tem tornado o ser humano susceptível a diferentes *Orthopoxvirus* de caráter zoonótico. Após a erradicação da varíola e a descontinuação da vacinação, inúmeras infecções semelhantes à mesma foram relatadas e, além disso, vírus relacionados ao vírus da varíola foram isolados principalmente de roedores e macacos, indicando a presença de *Orthopoxvirus* circulando no meio ambiente. (FENNER, 1989; BAXBY *et al.*, 1986; KOLHAPURE *et al.*, 1997; HUTIN *et al.*, 2001). Ao circularem na população humana, estes *Poxvirus* podem desenvolver alguns tipos de adaptações, como o aumento de patogenicidade e transmissibilidade, sendo estes efeitos altamente deletérios ao homem. (SHCHELKUNOV *et al.*, 2002). Existe um grande temor de que estes vírus possam determinar uma nova forma de “varíola”, e infelizmente, pouco se conhece sobre o ciclo, circulação e reservatórios destes *Orthopoxvirus* zoonóticos na natureza. Além disso, são desconhecidos diversos aspectos em relação à biologia da interação destes vírus com o corpo humano, principalmente a interação com o sistema imune.

No cenário da medicina moderna os *Poxvirus* são amplamente utilizados como modelos. O *Vaccinia virus* (VACV), utilizado como vacina para erradicar a varíola, tornou-se um modelo para os estudos biológicos e bioquímicos de vírus. Além disto, o VACV tem emergido como sistema para criação de vacinas recombinantes. (TRAKTMAN *et al.*, 1990; FENNER, 2000). Apesar da carência de informações a respeito de diversos aspectos dos *Poxvirus*, estes estão sendo amplamente utilizados pela microbiologia moderna. Deste modo, devemos não negligenciar a possibilidade destes vírus criados em laboratório se estabelecerem na natureza e até mesmo recombinar com *Poxvirus* circulantes, além de outros aspectos desconhecidos acerca da biologia destes vírus.

1.2) Os *Poxvirus*

1.2.1) *Classificação dos Poxvirus*

A família *Poxviridae* é constituída de vírions ovóides ou em forma de tijolo, possuem o material genético na forma de DNA de dupla fita, medindo entre 130 Kpb (*ParaPoxvirus*) e 300 Kpb (*AviPoxvirus*), ligado covalentemente em sua extremidade e, possuem a característica de se replicarem no citoplasma da célula hospedeira. (MOSS, 1996; FENNER, 2000).

A família *Poxviridae* pode ser dividida em duas subfamílias, *Chordopoxviridae* (vírus que infectam vertebrados) e *Entomopoxviridae* (vírus que infectam invertebrados) (ICTVdB, 2011). Os vírus pertencentes à subfamília *Chordopoxviridae* são divididos em 8 gêneros, dos quais quatro (*OrthoPoxvirus*, *ParaPoxvirus*, *MollusciPoxvirus* e *YataPoxvirus*) incluem agentes etiológicos de infecções humanas (SARAL *et al.*, 2006; de SOUZA TRINDADE *et al.*, 2007; LENDERMAN *et al.*, 2007; NAZARIAN *et al.*, 2007). Os oito gêneros são: *OrthoPoxvirus*, *ParaPoxvirus*, *CapriPoxvirus*, *SuiPoxvirus*, *LeporiPoxvirus*, *AviPoxvirus*, *YataPoxvirus* e *MollusciPoxvirus*. Apenas 2 espécies são exclusivamente humanas o vírus da varíola (*OrthoPoxvirus*) e o vírus do molusco contagioso (*MollusciPoxvirus*). Os membros da subfamília *Entomopoxvirinae* apresentam como espectro de hospedeiros diversas ordens da classe *Insecta*, incluindo Diptera, Coleoptera, Orthoptera e Lepdoptera (DAMON, 2007; BECKER *et al.*, 2008).

O VACV é considerado um protótipo dos *OrthoPoxvirus*, não possuindo hospedeiro natural conhecido. Além desse, outras espécies desse gênero podem causar doença no homem. (FENNER, 1996; MOSS, 1996). A classificação geral das poxviroses e suas características estão apresentadas no Quadro 1 de acordo com Shchelkunov e colaboradores, elaborada em 2005.

Subfamília – Chordopoxvirinae (vertebrados)		
Gênero	Protótipo	Espécies patogênicas para o homem
<i>Orthopoxvirus</i>	Vírus vaccinia	Cowpox, monkeypox, varíola, vaccinia (e as subespécies, buffalopox e rabbitpox)
<i>Parapoxvirus</i>	Vírus Orf (dermatite pustular contagiosa ou ectima contagioso)	Orf, paravaccinia (pseudocowpox), e vírus da estomatite papular bovina
<i>Avipoxvirus</i>	Vírus fowlpox	Não há descrição
<i>Capripoxvirus</i>	Vírus sheeppox	Não há descrição
<i>Leporipoxvirus</i>	Vírus myxoma	Não há descrição
<i>SuiPoxvirus</i>	Vírus swinepox	Não há descrição
<i>Molluscipoxvirus</i>	Vírus do molusco contagioso	Vírus do molusco contagioso
<i>Yatapoxvirus</i>	Vírus do tumor de macaco de Yaba	Vírus tanapox e vírus do tumor de macaco de Yaba (em um caso de inoculação acidental)

Quadro 1: Classificação dos vírus da subfamília Chordopoxvirinae

Fonte: SHCHELKUNOV *et al.*, 2005 (modificada)

1.2.2) Morfologia dos Poxvirus

Os *Poxvirus* possuem morfologicamente quatro componentes estruturais já identificados: o cerne, os corpúsculos laterais, a membrana externa e o envelope (FIG. 1).

O cerne estrutura mais interna dos vírus em questão, apresenta-se como um disco ovalado, bicôncavo, envolto por pequenas subunidades protéicas, denominadas paliçada; em seu interior localiza-se o material genético viral. Os corpúsculos laterais se encontram exteriormente às duas concavidades do cerne. A membrana externa e o envelope possuem composição lipoprotéica e circundam o cerne e os corpúsculos laterais. Duas formas infecciosas virais podem ocorrer nos *Poxvirus*, sendo denominadas vírus maduro intracelular (IMV) e vírus envelopado extracelular (EEV). Na primeira forma apresentada (IMV), acredita-se que o cerne e os corpúsculos laterais são circundados por duas membranas lipoprotéicas, sendo esta estrutura denominada de membrana externa. Estudos mais recentes que abordam a morfologia e dinâmica infecciosa do vírus sugerem que a forma IMV seja revestida por apenas uma bicamada de membrana lipoprotéica, sendo esta proposição mais aceita atualmente. Na segunda forma (EEV), acredita-se, atualmente, que duas membranas circundam o cerne e os corpúsculos laterais, sendo a membrana mais externa denominada envelope. Tanto a membrana externa quanto o envelope desempenham um papel importante na interação do vírus com o hospedeiro (BULLER; PALUMBO, 1991; SMITH; VANDERPLASSCHEN, 1998; MOSS, 2006).

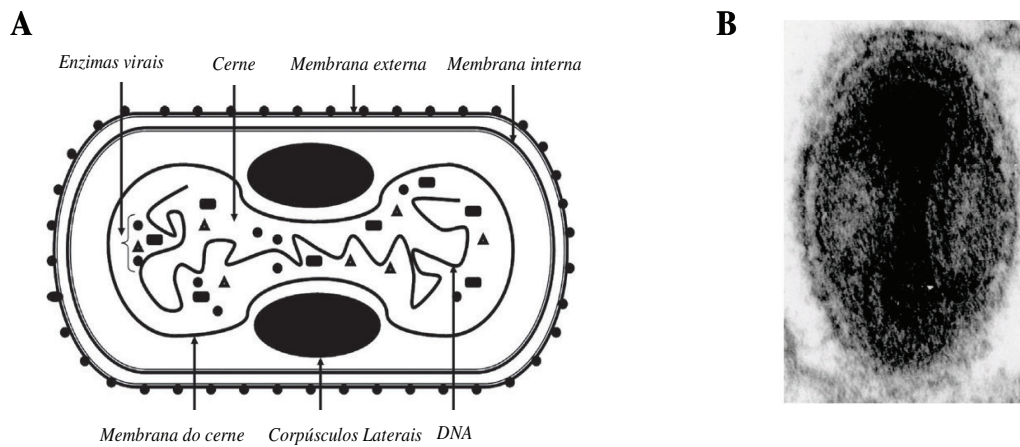


FIGURA 1: Morfologia dos Poxvirus. (A) Representação esquemática da morfologia dos Poxvirus (B) Eletromicrografia do VACV mostrando os corpúsculos laterais.
Fonte: (A) modificado de MEDEIROS-SILVA *et al.*, 2010; (B) HARRISON *et al.*, 2004

1.2.3) Genoma dos Poxvirus

Estes vírus possuem um genoma que tem a capacidade de codificar um grande número de genes (FIG. 2). Estima-se que 75% do genoma dos *Poxvirus* são responsáveis para a produção de progênieis virais, enquanto os 25% restantes compreendam genes não essenciais à replicação dos vírus em cultura de células (PERKUS *et al.*, 1991).

A região central do genoma viral é bastante conservada entre os *Poxvirus* e possui a função de codificar proteínas estruturais e enzimas relacionadas ao ciclo de multiplicação citoplasmático. Já as regiões terminais são variáveis entre os diversos *Poxvirus* e codificam proteínas relacionadas com a interação com o hospedeiro (GOEBEL *et al.*, 1990; JOHNSON; GOEBEL; PAOLETTI, 1993). Terminações invertidas e repetidas (ITRs) são formadas por seqüências iguais com direções opostas, localizadas nas regiões terminais variáveis, possuindo diferentes comprimentos, mesmo em representantes de um mesmo gênero, sendo responsável pela codificação de genes não essenciais à replicação dos vírus em cultura de tecidos, sendo, então, genes responsáveis pela interação vírus-hospedeiro (MOSS, 1996).

Os genes virais possuem uma expressão gênica temporal, sendo caracterizados como: imediatamente precoces, precoces, intermediários e tardios. Em relação à etapa de replicação do DNA viral, os genes imediatamente precoces e precoces são sintetizados antes desta, os genes intermediários são transcritos durante a replicação e os tardios após esta etapa (MOSS, 1996; TRAKTMAN *et al.*, 1990). A transcrição gênica é controlada através de um mecanismo em cascata: fatores de transcrição necessários à ativação dos genes precoces são algumas das proteínas expressas pelos genes imediatamente precoces, fatores de transcrição requeridos para expressão dos genes intermediários são expressos como proteínas precoces, fatores requeridos para genes tardios são proteínas de genes intermediários, fatores requeridos para genes imediatamente precoces são produtos de genes tardios empacotados na formação viral para serem usados em um novo ciclo de infecção, completando o ciclo em cascata (MOSS, 1996).

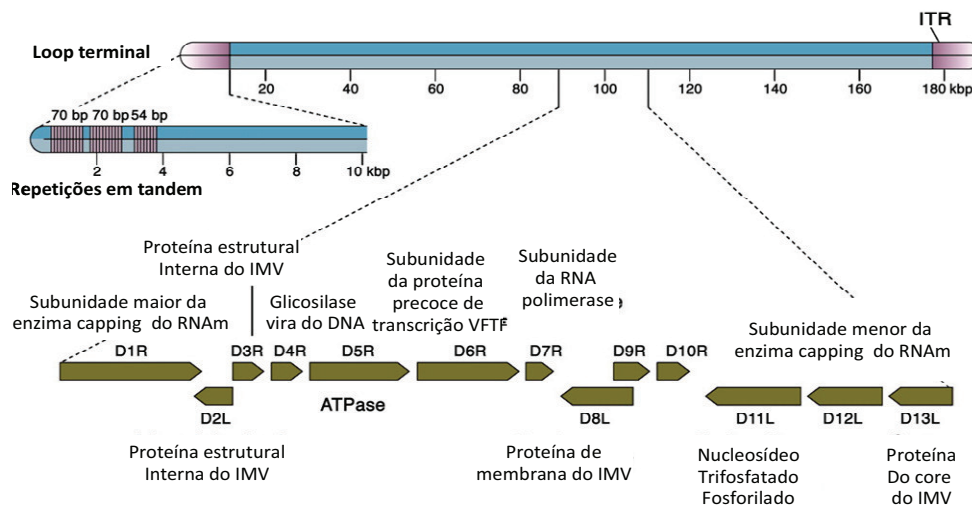


FIGURA 2: Organização do genoma do VACV
 Fontes HARRISON *et al.*, 2004

1.2.4) Ciclo de multiplicação dos Poxvirus

A infecção viral inicia-se com adsorção do vírus (FIG. 3). Um dos aspectos incomuns dos *Poxvirus* é sua capacidade de produzir mais de um tipo de partícula infecciosa, como já mencionado anteriormente (MCKELVEY *et al.*, 2002). Ao contrário de outros tipos de vírus, não se observa, nos *Poxvirus*, a existência de um ligante principal para interação com os receptores

celulares. O amplo espectro de hospedeiros e tipos celulares infectados pelo VACV e outros *Poxvirus* sugerem que estes receptores sejam altamente conservados (MALLARDO *et al.*, 2002). Embora os mecanismos de adsorção e penetração viral sejam pouco compreendidos, é aceito que o final deste processo deve resultar na liberação dos cernes contendo o DNA viral, no citoplasma da célula hospedeira (MOSS, 2006).

No caso da forma IMV, sugere-se que sua entrada na célula ocorra via fusão com a membrana plasmática ou via vesículas endocíticas. Existem evidências que comprovam que algumas proteínas de membrana do IMV se ligam a glicosaminoglicanos na superfície das células, facilitando sua adsorção. Já foi visto que a proteína viral D8 se liga ao condroitin sulfato e as proteínas virais A27 e H3 se ligam ao heparan sulfato. Além disso, foi observado, na forma IMV, que algumas proteínas de membrana viral (A21, A28, H2 e L5) são responsáveis pela penetração do vírus na célula hospedeira. Na ausência destas proteínas de superfície da membrana viral ocorre a adsorção do vírus, porém o mesmo não se torna capaz de penetrar na célula (SENKEVICH; WARD; MOSS, 2004a; SENKEVICH; WARD; MOSS, 2004b; SENKEVICH; MOSS, 2005; TOWNSLEY; SENKEVICH; MOSS, 2005a; TOWNSLEY; SENKEVICH; MOSS, 2005b). Já, no caso da forma EEV tem-se sugerido dois tipos diferentes de entrada na célula; acredita-se que o envelope rompa-se antes da entrada do vírus, sendo assim este entraria da mesma forma que o IMV, ou ainda que, após a entrada do vírus, sua membrana restante é destruída via endossomos (MOSS, 2006).

Apesar de não ter sido encontrado nenhum receptor celular específico para a entrada do vírus, foi observado que a depleção nos níveis de colesterol, na membrana celular, inibia a entrada do vírus, sugerindo a participação dos “rafts” de lipídeos. Além disso, foi observada uma maior penetração do vírus sob baixos valores de pH, indicando que uma possível participação dos endossomos facilitaria o processo infeccioso (MOSS, 2006; CHUNG; HUANG; CHANG, 2005).

Independente do mecanismo de adsorção e penetração de ambas as formas infecciosas, sabe-se que o cerne do vírus é liberado no citoplasma, processo este denominado de desnudamento primário (LOCKER *et al.*, 2000). Em seguida, ocorre a degradação das nucleoproteínas que constituem o cerne, resultando na liberação do DNA viral no citoplasma da célula hospedeira. Este processo, conhecido como desnudamento secundário, pode ser bloqueado por inibidores da transcrição e tradução, o que significa que o mesmo é dependente da síntese de RNAm e proteínas virais. As primeiras estruturas observadas são formas circunscritas crescentes

que são constituídas de proteínas e lipídeos do hospedeiro. Com o processo da morfogênese, os crescentes formam as partículas esféricas chamadas de vírus imaturos (IVs) que contêm, na sua parte central, as proteínas virais do cerne. Ao receber o DNA, o vírus imaturo passa por uma série complexa de alterações morfológicas que termina na formação da forma infectiva denominada de IMV. Acredita-se que IMV permaneça no meio intracelular, sendo somente liberado quando a célula é lisada, processo esse que ocorre em apenas 1% das células infectadas. Cerca de 5 a 20% dos IMVs, dependendo da célula hospedeira, são transportados através de microtúbulos até as cisternas trans-golgi, onde são envolvidos por duas membranas adicionais, resultando na formação do vírus envelopado intracelular (IEV) (LOCKER *et al.*, 2000; SMITH; MURPHY; LAW, 2003; ROBERTS; SMITH, 2008).

O IEV, através do sistema de microtúbulos, desloca-se para a superfície da célula, onde sua membrana mais externa se funde com a membrana plasmática, formando o vírus envelopado associado à célula (CEV). O processo de saída do vírus da célula requer a formação de uma cauda de actina, responsável também pela associação do CEV à superfície celular (WARD; MOSS, 2001; ROBERTS; SMITH, 2008).

A liberação do CEV da célula infectada resulta na formação do vírus envelopado extracelular (EEV). Essa forma, EEV, é menos abundante, no entanto, é responsável pela disseminação do vírus entre hospedeiros e contribui de maneira importante na indução da resposta imunológica, mas mesmo antes dos EEVs serem formados, proteínas apresentadas na superfície da célula infectada já começam a gerar resposta imune. Já a partícula CEV é a principal forma de propagação do vírus entre células adjacentes (SMITH; LAW, 2004; MCFADDEN, 2005; WARD, 2005; ROBERTS; SMITH, 2008). A figura 3 sintetiza as etapas da multiplicação viral.

Recentemente, foi proposta uma nova nomenclatura para as partículas virais, tendo como base os avanços acerca da estrutura e composição das membranas dos *Poxvirus*. Os vírus maduros intracelulares (IMVs) foram classificados como vírus maduros (MV), compostos por uma única membrana formada por bicamada lipídica. Os vírus intracelulares envelopados (IEVs), por adquirirem um envelope composto por duas membranas que circundam o MV, são chamados de vírus envelopados (VE), “wrapped virus” (WV). Por fim, as partículas EEV e CEV, por ocorrerem fora da célula são denominadas vírus extracelulares (EV), e possuem uma membrana a menos que os VE (RESCH *et al.*, 2007).

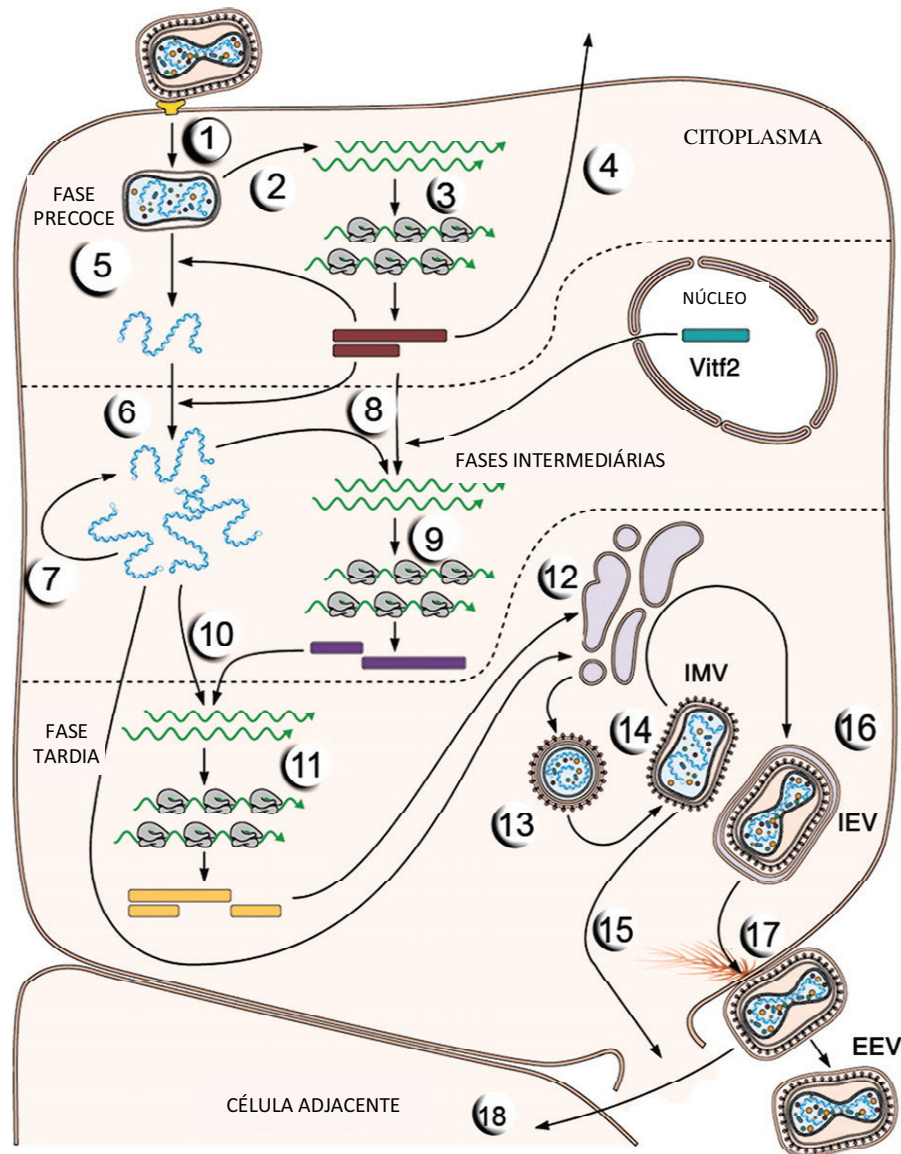


FIGURA 3: Representação esquemática das etapas da replicação do VACV. (1) Entrada do EEV: fusão do vírus com a membrana celular. (2) Síntese dos RNAm precoces. (3) Tradução do RNAm viral. (4) Produção e secreção de proteínas precoces. (5) Liberação do genoma do core. (6) Replicação do DNA viral, (7) Síntese de novas moléculas de DNA. (8) Transcrição de genes intermediários (9) Tradução e síntese de proteínas intermediárias que vão atuar na fase tardia. (10) Transcrição de genes tardios. (11) Tradução dos genes tardios e produção proteínas estruturais, proteínas da fase precoce. (12) Desglicosilação das proteínas de membrana no Complexo de Golgi. (13) Montagem dos vírus imaturos (IV). (14) Formação dos vírus maduros intracelulares (IMV). (15) Liberação dos IMV após lise celular. (16) Aquisição de mais uma membrana celular e formação dos vírus envelopados intracelulares (IEV). (17) IEV movem-se até a superfície celular fundindo com a membrana plasmática e formando os vírus envelopados associados à célula. (18) Polimerização de actina e liberação do vírus envelopados extracelulares (EEV) e propagação para células adjacentes.

Fonte: modificado de HARRISON *et al.*, 2004

1.2.5) Poxvirus Isolados na Atualidade

A varíola, até que fosse considerada erradicada em todo o mundo, era considerada a mais importante doença causada por *Poxvirus*, merecedora de grande atenção por parte das autoridades de saúde. O VARV foi responsável por aproximadamente 50 milhões de óbitos somente no século XIX. A origem do VARV é desconhecida, mas acredita-se que a espécie tenha surgido com os primeiros agrupamentos humanos organizados, quando a prática da agricultura permitiu a ocorrência da primeira expansão demográfica, há cerca de 6000 anos (GEDDES, 2006).

Atualmente, apenas dois institutos mantêm amostras de VARV, sendo legalmente autorizados: um deles localiza-se nos Estados Unidos, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC); e o outro na Rússia, o Centro de Pesquisa do Estado para Virologia e Biotecnologia. No entanto, existe de fato uma preocupação acerca da existência de estoques clandestinos de VARV, que poderiam ser utilizados em ataques terroristas (McFADDEN, 2005).

Sabe-se que as Forças Armadas dos Estados Unidos mantêm um programa de vacinação, mesmo após a suspensão do programa mundial de vacinação contra a varíola. Esta vacinação objetiva a proteção das tropas militares americana contra um possível atentado terrorista no país. Devido a este fato, ainda existem relatos de transmissão intra-familiar do VACV, de familiares dos soldados vacinados, pois estes permanecem por um longo período liberando partículas virais infecciosas a partir das crostas formadas em decorrência da administração da vacina (EGAN, *et al.*, 2004; VORA *et al.*, 2008). Um caso grave de transmissão intra-familiar foi descrito em 2007, onde um soldado recém-vacinado transmitiu VACV para seus familiares, inclusive para uma criança de 2 anos a qual desenvolveu uma forma generalizada da doença, denominada eczema vaccinatum (FIGURA 4) (VORA *et al.*, 2008).

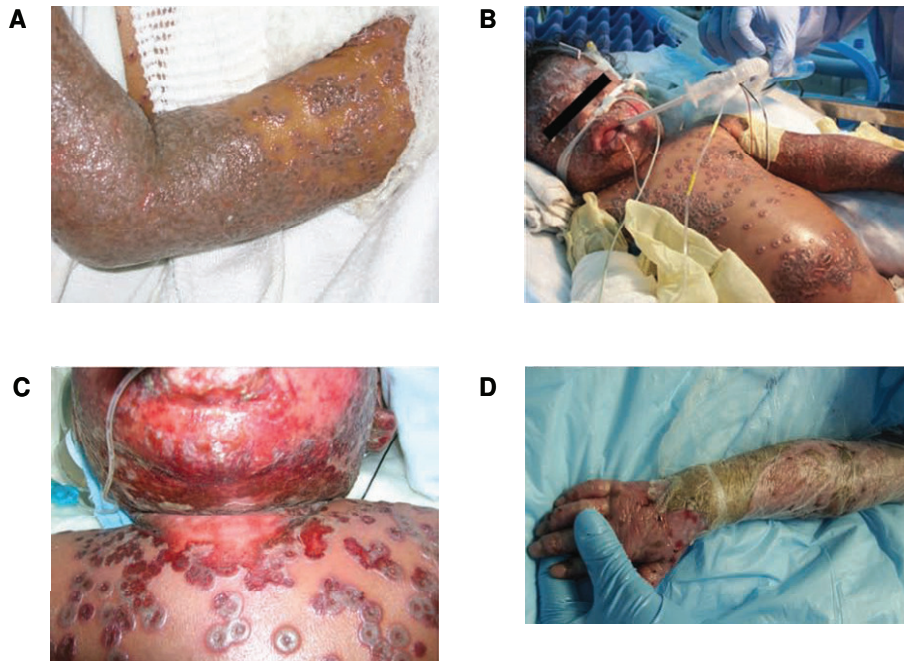


FIGURA 4: Eczema vaccinatum. Fotos de uma criança que desenvolveu eczema vaccinatum, após a transmissão do VAVC intra-familiar. As fotos demonstram a progressão das lesões cutâneas durante os dias de internação hospitalar da criança. (A) Dia 5 (B) Dia 7 (C) Dia 13 (D) Dia 28.

Fonte: modificado de VORA *et al.*, 2008

Atualmente alguns *Poxvirus*, como o *Monkeypox*, *Cowpox*, e o VACV vêm tendo um maior destaque devido ao fato de estarem sendo encontrados envolvidos em infecções em seres humanos (DAMASO *et al.*, 2000; SCHATZMAYR *et al.*, 2000).

O *Monkeypox virus* produz infecções que se assemelham clinicamente à infecção pelo *Variola virus*, com erupções cutâneas em todo o corpo, tanto no ser humano quanto no macaco. Existem relatos de sua transmissão de pessoa para pessoa. Estudos epidemiológicos recentes demonstraram um aumento de aproximadamente 400% no número de casos de MPXV na África nos últimos 20 anos. Crescimento esse provavelmente associado ao aumento do número de pessoas que não foram vacinadas contra a varíola (RIMOIN *et al.*, 2010). Dessa forma, em junho de 2003, foi registrado um surto de MPXV no centro-norte dos Estados Unidos, após uma

importação de roedores africanos (DI GIULIO; ECKBURG, 2004). Durante esse surto, foram detectados 81 casos humanos com sinais clínicos, sendo os principais indivíduos acometidos os veterinários e vendedores de animais. De forma geral, as manifestações clínicas foram mais brandas do que aquelas que acometem os indivíduos no continente africano, provavelmente devido ao truncamento de um gene viral relacionado com o escape do complemento (GUARNER, 2004; FINLAY; McFADDEN, 2006).

Sendo assim, o *Variola virus* (já erradicado) e o *Monkeypox virus* podem ser considerados os principais responsáveis pelas infecções sistêmicas causadas pelo gênero *Orthopoxvirus*, no ser humano e, por conseguinte, de maior mortalidade (BREMAN; HENDERSON, 2002).

O *Cowpox virus* adquiriu este nome por ter sido primeiramente isolado a partir de lesões no rebanho bovino. Apesar de seu nome, acredita-se que seu principal reservatório não seja o gado, mas sim, pequenos roedores. Tal argumentação se apóia na baixa prevalência deste vírus no rebanho bovino (ALCAMI; SMITH, 1995; CROUCH *et al.*, 1995). No Brasil, um caso de varíola bovina causada por CPXV foi relatado por SILVA e colaboradores, em 1986. No entanto, nenhuma caracterização molecular do agente viral foi realizada para a confirmação de que se tratava efetivamente de um CPXV, e não um VACV (TRINDADE *et al.*, 2003).

Usualmente, o *Cowpox virus* e o *Vaccinia virus*, produzem infecções localizadas, principalmente no sítio de inoculação viral, sendo consideradas infecções de baixa mortalidade (BREMAN; HENDERSON, 2002). Em geral, a recuperação completa da infecção por CPXV leva de 6 a 8 semanas, porém, em pessoas imunocomprometidas é possível ocorrer uma infecção grave e generalizada, levando até mesmo ao óbito (EIS-HUBINGER, 1990).

1.2.6) Poxvirus isolados no Brasil

Após a erradicação da varíola, a vacinação foi suspensa (FENNER *et al.*, 1988), e o VACV passou a ser amplamente utilizado na pesquisa, como modelo para o entendimento de estratégias de evasão imune dos vírus em geral (YAO *et al.*, 2007; DOMINGO-GIL *et al.*, 2008), e mais recentemente como potenciais vetores recombinantes para a vacinação contra numerosas doenças humanas e veterinárias (ARAVINDARAM *et al.*, 2008; KREIJTZ *et al.*, 2009).

No Brasil, até 1999 a maioria das infecções por *Poxvirus* documentadas foram causadas pelo *ParaPoxvirus*, um membro do gênero *ParaPoxvirus* (TRINDADE *et al.*, 2003). Esses vírus são capazes de infectar humanos que estão em contato com animais doentes, usualmente vacas e ovelhas, gerando uma doença intermediária caracterizada pelo aparecimento de vesículas nas mãos e nos dedos. Essas vesículas, pequenas em número e tamanho, são usualmente indolores e tendem a se resolver rapidamente. Contudo, a partir de 1963, indicações de que membros do gênero *OrthoPoxvirus* poderiam estar circulando ativamente em regiões selvagens, começaram a ser documentadas (FONSECA *et al.*, 1998; DA FONSECA *et al.*, 2002).

Nas décadas de 50 e 60, um grande número de novos vírus foi isolado de diferentes fontes em todo o mundo. No Brasil, nas décadas de 60 e 70, o governo brasileiro realizou várias campanhas de vigilância epidemiológica em diversas áreas rurais do país com o objetivo de investigar a circulação de agentes virais desconhecidos, bem como proceder ao isolamento desses novos agentes (DA FONSECA *et al.*, 2002).

O vírus Cotia e o vírus BeAn 58058 foram isolados durante essas campanhas. O vírus Cotia foi isolado diversas vezes a partir de camundongos sentinelas, na estação florestal de Cotia, São Paulo, durante períodos chuvosos, em 1961.

A seguir serão descritos vários vírus isolados no Brasil, em diferentes regiões, após surtos de varíola bovina, comumente transmitida também para o ser humano, principalmente aqueles que estabelecem contato direto com os animais infectados, especialmente, os ordenhadores.

1.2.6.1) Vírus BeAn 58058

O vírus BeAN 58058 (BAV) foi isolado em 1963 do sangue de um roedor do gênero *Oryzomys*, numa floresta tropical, na região de Belém-do-Pará. Após análises morfológicas e moleculares incluiu-se o BAV na família *Poxviridae*, sendo esse vírus considerado um membro do gênero *OrthoPoxvirus* e uma variante do *Vaccinia virus*. (DA FONSECA *et al.*, 2002).

Com o objetivo de caracterizar o BAV foram realizadas análises moleculares do gene do corpúsculo de inclusão do tipo A (ATI). Porém, o gene ATI não pôde ser amplificado por PCR, indicando uma provável deleção desse gene. (MARQUES *et al.*, 2001)

1.2.6.2) SPAn232 virus (SPAnv)

O *SPAn232 virus* (SPAnv) foi isolado, inicialmente em 1961, de ratos sentinelas na Floresta da Cotia, em São Paulo (LOPES *et al.*, 1965). O vírus foi re-isolado diversas vezes e sugeriu-se que se tratava de um vírus recombinante entre os *LeporiPoxvirus* e os *OrthoPoxvirus* (UEDA *et al.*, 1978; UEDA; MORIKAWA; WATANABE, 1995; ESPOSITO *et al.*, 1980). Ele foi originalmente agrupado entre os *Cotia virus*, mas após análises genéticas ele foi considerado uma variante do *Vaccinia virus*. Os genes tk, vgf e ati foram amplificados e identificados no genoma do SPAn232 virus (SPAnV), mostrando uma similaridade de 99% com os genes correlatos no VV WR (da FONSECA *et al.*, 2002).

1.2.6.3) Vírus Cantagalo

O vírus Cantagalo (CTGV) foi isolado de vacas e ordenhadores em 1999, durante um surto exantemático, em fazendas do Município de Cantagalo, no sudoeste do estado do Rio de Janeiro. Evidências morfológicas e moleculares confirmaram que o CTGV tratava-se de uma variante do vírus *Vaccinia*. (DAMASO *et al.*, 2000).

Sugere-se que o CTGV tenha se originado de uma amostra vacinal, denominada *Vaccinia virus* IOC (VV-IOC), utilizada pelo Instituto Oswaldo Cruz, durante a campanha de vacinação contra a varíola, ou de alguma outra amostra vacinal do *Vaccinia virus*. Essa amostra teria escapado para a natureza, estabelecendo vários ciclos de transmissão em um ou mais hospedeiros, acumulando polimorfismos e depois reemergindo como *Cantagalo virus* no gado e em ordenhadores. (DAMASO *et al.*, 2000).

1.2.6.4) Vírus Muriaé

Em agosto de 2000, um surto afetando o gado e ordenhadores ocorreu em diversas fazendas de gado leiteiro do Estado de Minas Gerais, o principal produtor de leite do país. Durante esse surto, 4 indivíduos, da mesma área rural, todos do sexo masculino, ordenhadores, apresentaram lesões dolorosas nas mãos e nos dedos, linfadenopatia e febre. Um vírus foi isolado e denominado de *Muriae virus*. Foi realizada a caracterização morfológica, através da inoculação das amostras em membrana corioalantóidea de ovos embrionados de galinha, propagação viral em células *vero* e visualização das partículas virais no microscópio de força atômica. Para a caracterização molecular, os genes timidina cinase (*tk*), fator de crescimento de *Vaccinia virus* (*vgf*), e hemaglutinina (*ha*) foram amplificados (TRINDADE *et al.*, 2007b).

Para os genes *tk* e *vgf* observou-se uma similaridade maior que 99 e 97%, respectivamente, entre o *Muriae virus* e outras amostras de *Vaccinia virus*. Após amplificação do gene *ha*, observou-se que o *Muriae virus* apresentava a mesma assinatura genética, uma deleção de 18 nucleotídeos, que outras amostras VACV brasileiras, como o PSTV (Leite *et al.*, 2005), ARAV (de SOUZA TRINDADE *et al.*, 2003), GP2V (TRINDADE *et al.*, 2006) e CTGV (DAMASO *et al.*, 2000), sendo agrupado entre as amostras de VACV na árvore filogenética. Apesar dessas semelhanças, o *Muriae virus* apresentava características únicas que permitiram diferenciá-lo de outras amostras de VACV (TRINDADE *et al.*, 2007b).

1.2.6.5) Vírus Passatempo

O vírus passatempo foi isolado e identificado após um surto que se iniciou em 2003, na cidade de Passa-Tempo, no Estado de Minas Gerais. Durante esse surto, as vacas apresentaram lesões nas tetas que se assemelhavam às características clínicas observadas durante outros surtos

de *Vaccinia virus*, no Brasil. Muitos ordenhadores relataram lesões nas mãos que devem ter sido transmitidas pelo contato com o animal doente (LEITE *et al.*, 2005).

Foram realizados isolamento e caracterizações morfológicas e moleculares do vírus, podendo-se concluir que se tratava de uma variante do *Vaccinia virus*, denominada *Passatempo virus*. O achado desse vírus reforça a idéia de reemergência e circulação do *Vaccinia virus* no Brasil. (LEITE *et al.*, 2005).

1.2.6.6) Vírus Belo Horizonte

O vírus Belo Horizonte foi isolado de um surto em camundongos nas instalações do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os camundongos foram obtidos da Universidade de Campinas, no estado de São Paulo, e aparentavam estar saudáveis, na chegada à UFMG. Passados uns dias, alguns animais morreram e outros começaram a apresentar lesões características na pele, desenvolvendo um exantema generalizado na pele. Um vírus foi isolado das amostras clínicas, após inoculação em membranas corioalantóideas de ovos embrionados de galinha e foi denominado *Belo Horizonte virus*. Após análises morfológicas e moleculares, detectou-se que se tratava de uma variante do *Vaccinia virus*. (TRINDADE *et al.*, 2004).

Não se sabe a origem do vírus Belo Horizonte. Os camundongos infectados foram obtidos da Universidade de Campinas, onde não havia nenhuma pesquisa com *Vaccinia virus* em andamento ou com qualquer outro *Poxvirus*. A hipótese que os camundongos possam ter sido infectados por uma fonte endógena é improvável. Contudo, o biotério do ICB da UFMG recebe colônias de camundongos de outros locais e é possível que os animais infectados estejam entre essas colônias que vêm de outros lugares. Entretanto, é praticamente impossível descobrir a real origem desse vírus. Todavia, a circulação ubíqua de diferentes cepas de *Vaccinia virus* no Brasil, de origem selvagem ou veterinária, sugere que estudos epidemiológicos são de extrema relevância. (TRINDADE *et al.*, 2004).

1.2.6.7) Vírus Araçatuba

Em 1999, na cidade de Araçatuba, no Estado de São Paulo, foi isolado um vírus após um surto exantemático. Quatro vacas da raça girolanda foram levadas ao Hospital Veterinário com lesões dolorosas nas tetas que afetavam a produção de leite. As lesões inicialmente apareceram em duas vacas e rapidamente se disseminaram para outros 35 animais, assim como para as mãos do ordenhador. Iniciando com uma área focal inflamada, as lesões rapidamente se transformaram em feridas de difícil tratamento. Nenhum episódio semelhante havia ocorrido nessa fazenda anteriormente. Na fazenda, o único ordenhador também estava afetado. Ele apresentava aproximadamente 10 lesões nas duas mãos e nos braços. O contato entre as mãos do ordenhador e as tetas das vacas durante a ordenha, provavelmente promoveu a rápida disseminação do vírus no rebanho, uma vez que para esse procedimento não são adotadas medidas assépticas. Os animais doentes foram isolados do rebanho e amostras das vesículas e crostas foram coletadas e enviadas para o Laboratório de Virose de Bovídeos do Instituto Biológico, em São Paulo. Três meses após o início da infecção, as lesões remanescentes, nas vacas, estavam em processo avançado de cicatrização. Contudo, todos os animais afetados apresentavam menor produção de leite. (TRINDADE *et al.*, 2003).

O material coletado foi processado para o isolamento viral, análise morfológica e molecular. Nesse contexto, foi isolado um novo vírus, denominado *Araçatuba virus* que, segundo as análises moleculares, tratava-se de uma amostra do *Vaccinia virus*. Além disso, identificou-se que esse vírus apresenta uma deleção na sequência nucleotídica do gene HA idêntica à deleção detectada na sequência desse gene, do Vírus Cantagalo. Essa característica, ausente na sequência de HA da maioria das variantes do *Vaccinia virus*, foi utilizada para correlacionar o vírus Araçatuba com a amostra IOC do *Vaccinia virus*, utilizada como vacina pelo Instituto Oswaldo Cruz, durante a campanha de erradicação da varíola. (TRINDADE *et al.*, 2003).

A assinatura genética encontrada no vírus Araçatuba semelhante à do vírus Cantagalo é bastante relevante, gerando especulações acerca da origem desses vírus. É interessante ressaltar que o vírus Cantagalo foi isolado na cidade de Cantagalo, no estado do Rio de Janeiro, a cerca de 850km a leste da cidade de Araçatuba. Além disso, uma característica genética semelhante, na

seqüência do gene HA, foi também detectada em outro vírus isolado na cidade de Muriaé, no estado de Minas Gerais, a 800 Km ao norte de Araçatuba. (TRINDADE *et al.*, 2003).

1.2.6.8) Vírus Guarani

No mês de outubro de 2001, ocorreu um surto dessa doença, na cidade de Guarani, no estado de Minas Gerais, na região sudeste do país. (TRINDADE *et al.*, 2006).

Por conseguinte, foi realizado um estudo epidemiológico, na região afetada pelo surto, que envolveu 72 propriedades visitadas, abarcando uma área de aproximadamente 5700km². O estudo revelou que um total de 1020 vacas leiteiras apresentava lesões nas tetas, caracterizadas pela presença de pápulas que evoluíam para úlceras. Após algum tempo, a maioria dessas lesões progredia naturalmente para a cicatrização e cura. Os casos humanos dessa doença foram identificados em 83% das fazendas e cerca de 110 pessoas estavam infectadas. A maioria dessas pessoas eram ordenhadores que haviam sido contaminados após o contato com as lesões nas tetas dos animais infectados. Os ordenhadores apresentavam lesões pleomórficas nas mãos, principalmente pápulas e úlceras dolorosas, febre, linfadenite com linfonodos aumentados e, eventualmente, infecção bacteriana secundária nas lesões. Em algumas fazendas, os ordenhadores relataram transmissão pessoa a pessoa. O tempo de infecção variou entre 15 a 30 dias e o diagnóstico inicial foi realizado através do exame clínico e de características epidemiológicas. (TRINDADE *et al.*, 2006).

Para o diagnóstico laboratorial e isolamento viral, foram coletadas amostras de crostas secas das lesões de duas vacas. Cada vaca pertencia a uma fazenda diferente, distante cerca de 10 km uma da outra. Dois vírus foram isolados e denominados Guarani P1 virus (GP1V) e Guarani P2 virus (GP2V). Embora isolados no mesmo surto e na mesma época e de fazendas vizinhas, os vírus GP1V e GP2V apresentavam divergências genéticas suficientes para serem alocados em diferentes locais na árvore filogenética. Enquanto o GP2V foi agrupado junto com outras amostras de VACV isoladas em surtos bovinos de *vaccinia* (ARAV, CTGV e PSTV), o GP1V foi agrupado junto com o VACV-WR e o VBH que não estão associados a surtos em bovídeos. (TRINDADE *et al.*, 2006).

As principais diferenças genéticas identificadas entre o GP1V e o GP2V foram no gene do corpúsculo de inclusão do tipo A (A26L) e no gene da hemaglutinina (A56R). Em relação ao gene A26L pôde-se verificar que para o GP1V, assim como para os vírus VBH e BAV, uma grande porção da seqüência nucleotídica desse gene está faltando, indicando uma possível deleção na seqüência. Para o GP2V, o gene A26L foi amplificado gerando um fragmento de DNA de tamanho semelhante aos descritos para os vírus Araçatuba e Passatempo. Em relação ao gene da hemaglutinina, o GP2V apresentou a mesma assinatura genética, deleção de uma porção na seqüência nucleotídica desse gene, detectada nos vírus Araçatuba, Passatempo, Cantagalo e VACV-IOC. No entanto, o GP1V e o vírus Belo Horizonte, não apresentaram essa deleção no gene da hemaglutinina. (TRINDADE *et al.*, 2006).

Esses resultados indicam que existem populações de VACV geneticamente diferentes que estão circulando no país e até no mesmo surto infeccioso. A caracterização de duas amostras diferentes de VACV isoladas num único surto leva à suposição de que esses vírus são provenientes de amostras diferentes, com origens diferentes e que sob circunstâncias diversas, podem ter se estabelecido na natureza (TRINDADE *et al.*, 2006).

1.2.6.9) Outros casos

Além dos surtos de VACV já descritos acima outros casos de já foram relatados em outros estados como: Espírito Santo (DONATELE *et al.*, 2007), Acre (BERNARDES-TERZIAN *et al.*, 2009), Mato Grosso (QUIXABEIRA-SANTOS *et al.*, 2011), Rondônia (QUIXABEIRA-SANTOS *et al.*, 2011), Pará (DE ASSIS *et al.*, 2013), Tocantins (MEDAGLIA *et al.*, 2009), Minas Gerais (ASSIS *et al.*, 2012), Rio de Janeiro (SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009) e São Paulo (MEGID *et al.*, 2008).

Em 2010, foi descrita e isolada a primeira amostra de VACV, detectada em cavalos. Estes eram cavalos crioulos de um haras em Pelotas, RS, acometidos por um surto exantemático de OPV (CAMPOS *et al.*, 2011).

Também já foi descrito por MOTA e colaboradores (2010) a presença de soropositividade para *Orthopoxvirus* em indivíduos residentes em áreas rurais do Acre nas quais não existem

notificações de Vaccinia bovina. Esse estudo observou que a soropositividade está provavelmente associada com atividades de caça e extrativismo vegetal nestas áreas.

1.2.7) Vias de transmissão

O modo de transmissão varia entre os *OrthoPoxvirus*, sendo que para o *CamellPoxvirus* (em camelos), o *Variola virus* (em humanos) e o *MonkeyPoxvirus* (em primatas), a via respiratória é a porta de entrada (FENNER, 1989; DAMON, 2007). Porém, em relação ao Ectromelia virus, *CowPoxvirus* e VACV a infecção é transmitida através de pequenas lesões presentes na pele do hospedeiro. Estas microabrasões permitem a entrada das partículas virais que acometem a camada basal da epiderme, causando a infecção que geralmente apresenta-se como lesões ulcerativas, pustulosas na pele do hospedeiro acometido (BULLER; PALUMBO, 1991)

Outra via de transmissão também conhecida para os *OrthoPoxvirus* é o trato gastrointestinal, sendo que a entrada viral se dá através de lesões na mucosa oral (FENNER *et al.*, 1989). A via oral é a maior fonte de infecção por Cowpovirus em gatos domésticos e em felinos de zoológicos, através da predação de roedores contaminados (MAREKNIKOVA *et al.*, 1977; CORAS, 2005). Outra via também já descrita é a congênita, porém com pouco significado epidemiológico (FENNER *et al.*, 1989)

A infecção da vulva por amostras vacinais foi descrita em diversas oportunidades (HUMPHREY, 1963; MCLAUGHLIN *et al.*, 2007) ao longo das campanhas de vacinação. Um caso publicado recentemente no Brasil (BATISTA *et al.*, 2009) relata infecção vulvar através de contágio intrafamiliar, a partir do marido apresentando lesões nas mãos, após contato com animais, sendo a primeira descrição no país deste quadro clínico relacionado a esta zoonose.

1.2.8) Vias de eliminação

Até o momento estudos demonstrando as vias de eliminação dos OrthoPoxvirus ainda são escassos. No entanto, já foi observado, durante a infecção pelo *Variola virus* que partículas virais podem ser excretadas em secreções orofaríngeas, conjuntivais, e na urina dos pacientes. (BREMAN; HENDERSON, 2002).

Além disso, já foi demonstrado que partículas virais do *Ectromelia virus* podem ser detectadas em fezes, urina e em lesões próximas ao ânus, durante algumas semanas após a infecção (FENNER *et al.*, 1989).

Um outro estudo utilizando camundongos Balb/c inoculados com amostras brasileiras de VACV demonstrou a eliminação de partículas e DNA viral nas fezes dos camundongos por 30 dias pós-infecção, e na urina, no período agudo da doença (7^o-9^o dia pós infecção) (ABRAHÃO, 2008).

Também foi demonstrado que camundongos sentinelas expostos a excreções contaminadas com VACV são susceptíveis à infecção e eliminam partículas e DNA viral nas fezes (FERREIRA *et al.*, 2008).

Estudos prévios revelaram a presença tanto de DNA, quanto de partículas virais infecciosas do VACV, no leite de vacas doentes, em surtos, em Minas Gerais, chamando a atenção para o potencial risco à saúde pública. Em um estudo prévio envolvendo oito vacas mestiças em lactação, soronegativas para o VACV, que foram inoculadas com VACV, amostra GP-2 e que apresentaram lesões típicas da doença, foi possível detectar a presença de DNA viral no leite a partir do terceiro de infecção e, de forma intermitente, até o sexagésimo dia. Esse estudo demonstrou que o vírus pode ser eliminado de forma intermitente no leite durante e após a fase aguda da doença, mesmo após a cicatrização total das lesões, sugerindo uma possível infecção sistêmica e persistente (de OLIVEIRA *et al.*, 2011).

1.2.9) Hospedeiros dos VACV

Em relação aos possíveis hospedeiros naturais do VACV existem poucos dados até o presente momento. No entanto, já foi observado, para o *CowPoxvirus*, membro dos *OrthoPoxvirus*, que estes são capazes de se estabelecerem em alguns roedores silvestres, como *Apodemus sylvaticus*, *Clethrionomys glareolus* e *Microtus agrestis*, e em roedores urbanos, como *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Rattus rattus*, causando infecções persistentes ou agudas (MAIOBORODA, 1982; BENNETT *et al.*, 1996; LAAKONENN *et al.*, 2006).

Em relação ao VACV existem vários potenciais hospedeiros naturais, nos quais, o VACV seria capaz de se estabelecer, causando infecções e mantendo o ciclo de transmissão viral. Dentre os possíveis reservatórios naturais estão algumas espécies de roedores dos gêneros *Oryzomys*, de circulação peridomiciliar, *Mus musculus*, *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus* que são também reservatórios de CPXV (MAIOBORODA, 1982; BENNETT *et al.*, 1996; LAAKONENN *et al.*, 2006).

1.2.10) Patogênese viral e sinais clínicos das infecções por Poxvirus em humanos

Diversos sinais clínicos estão associados às infecções pelos *Poxvirus*, sendo estes lesões pustulares, localizadas, auto-limitadas e até mesmo manifestações sistêmicas. Diferentes espécies da mesma família estão associadas a níveis de patogenidade diferentes o que vai depender do grau de virulência, da via de transmissão, do tipo de hospedeiro e da resposta imune deste (FENNER *et al.*, 1989)

No caso de infecções localizadas como aquelas causadas pelo VACV e CPXV, o vírus penetra por pequenas lesões presentes na pele do hospedeiro, multiplica-se no sítio inicial de infecção na camada basal da epiderme, causando alterações histopatológicas no tecido acometido (BULLER; PALUMBO, 1991). A replicação viral induz a liberação de mediadores inflamatórios pelas células epiteliais o que pode causar sintomas inespecíficos como febre e linfadenopatia local (LEWIS-JONES, 2004; SILVA-FERNANDES; TRAVASSOS *et al.*, 2009). Além disso,

pode ocorrer uma viremia transitória, como já demonstrado pela detecção de DNA viral no sangue de indivíduos acometidos pelo VACV e CPXV (SAVONA; DELA CRUZ *et al.*, 2006; NITSCHKE; KURTH *et al.*, 2007).

Em relação às infecções sistêmicas, o vírus multiplica-se no sítio de entrada, alcança o sistema linfático e posteriormente a corrente sanguínea, causando a viremia primária. Em seguida, os vírus alcançam os órgãos ricamente vascularizados, como o baço e o fígado, multiplicando-se nestes órgãos e novamente retornam à corrente sanguínea, causando uma viremia secundária. Os vírus disseminam-se pela corrente sanguínea tanto como partículas livres ou associadas a células sanguíneas da linhagem monocítica/macrofágica, sendo esta última um possível mecanismo de escape da ação dos anticorpos e das proteínas do complemento. Após a viremia secundária, os vírus alcançam outros órgãos, como rins, intestino, pulmões, ovários ou testículos e pele, onde causa as lesões típicas (FENNER, 1989; ESTEBAN; BULLER, 2005; DAMON, 2007)

As lesões exantemáticas que se desenvolvem na pele do paciente tendem a evoluir da mesma forma, tanto nas infecções localizadas quanto sistêmicas. Os sinais clínicos das infecções de VACV são: o surgimento de lesões focais eritematosas, geralmente localizadas nos dedos das mãos que entraram em contato direto com as lesões presentes nas tetas das vacas infectadas (FIG.5). Associa-se a estas lesões um quadro clínico semelhante a um processo gripal no qual o indivíduo pode apresentar febre, mialgia, dores de cabeça e náuseas. O conjunto desses sinais e sintomas caracteriza os sinais clínicos primários desta infecção. A próxima fase é marcada pelo surgimento de pústulas e lesões ulcerativas margeadas por edema e eritema, principalmente nas mãos e antebraços. Esta pústula se ulcera e, posteriormente, cicatriza formando uma crosta que tende a cair por volta de 21 a 28 dias, após a infecção. Normalmente desenvolve-se uma linfadenopatia local que pode persistir por várias semanas. A cura e cicatrização das lesões ocorrem ao longo de várias semanas e deixa uma cicatriz típica na pele das pessoas e animais acometidos (TRINDADE *et al.*, 2003; LEWIS-JONES, 2004; MEDEIROS-SILVA *et al.*, 2010).

Podem ocorrer ainda infecções bacterianas secundárias nos locais das lesões originais que necessitam de tratamento adequado como o uso de antibióticos (TRINDADE *et al.*, 2007a).

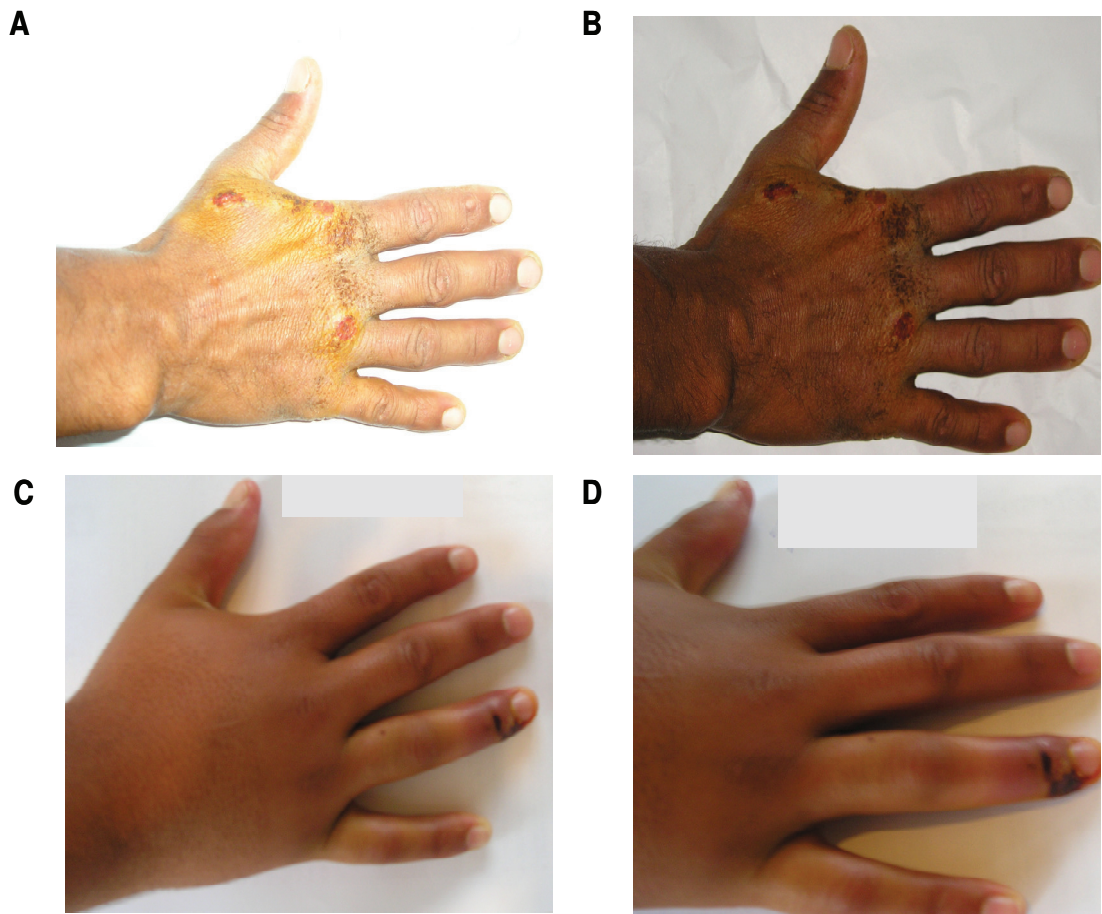


FIGURA 5: Lesões em humanos causadas por amostras de VACV. (A e B) Lesões ulcerativas nas mãos de um ordenhador, (C e D) Lesão cutânea na mão de um adolescente ordenhador, com sinais de inflamação. Notar o eritema e o edema. Essas fotos foram tiradas durante uma infecção pelo VACV que ocorreu em 2009 na cidade de Pium-í - MG (surto foi acompanhado pelos pesquisadores do laboratório de imunologia do CPQRR - FIOCRUZ)

Fonte: dados da pesquisa

1.2.11) Patogênese viral e sinais clínicos das infecções por Poxvirus em bovinos

O quadro clínico nos animais caracteriza-se pela presença de infecção típica por *Orthopoxvirus*, sendo que inicialmente ocorre a formação de vesículas no úbere de bovinos com aproximadamente dois centímetros de diâmetro (FIG.6). Em seguida, essas lesões vesiculosas

evoluem formando lesões pustulosas com exsudato purulento que posteriormente tornam-se crostosas e cicatrizando-se ao final (Fig.6). O quadro clínico do animal evolui por cerca de três semanas e, podendo surgir infecções secundárias, causando mastites que além de extremamente dolorosas para o animal, causam ainda a interrupção da produção de leite, podendo evoluir para a perda definitiva de parte do úbere. Isto gera um grande impacto econômico devido à redução da produção do leite pelas propriedades afetadas pela infecção. (SCHATZMAYR *et al.*, 2005).

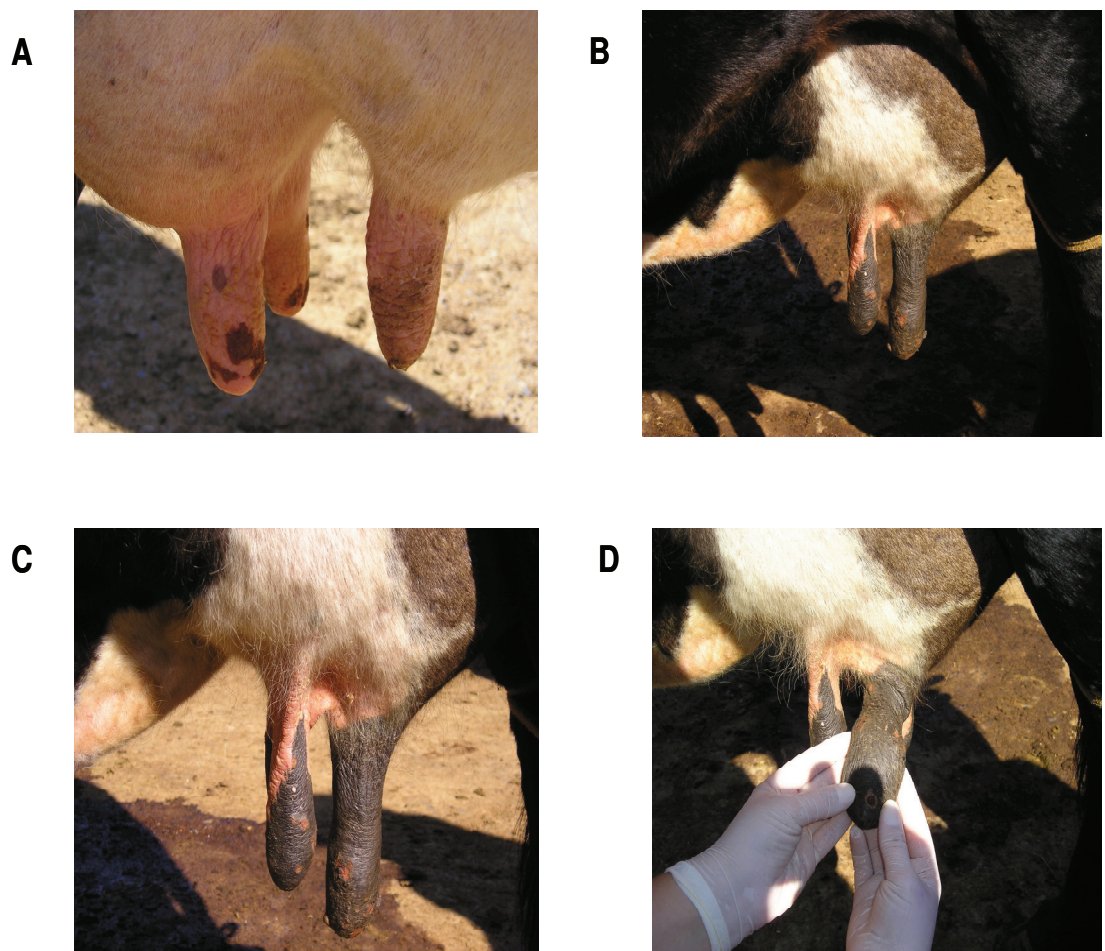


FIGURA 6 : Lesões em bovinos causadas por amostras de VACV. (A, B e C) Lesões ulcerativas, papulosas e com crostas nas tetas de três vacas, (D) Crosta na teta de uma vaca. Essas fotos foram tiradas durante uma infecção pelo VACV que ocorreu em 2009 na cidade de Pium-í - MG (surto foi acompanhado pelos pesquisadores do laboratório de imunologia do CPQRR - FIOCRUZ)

Fonte: dados da pesquisa

1.2.12) Diagnóstico

O diagnóstico dessas infecções é realizado através da coleta de amostras de lesões e crostas provenientes de animais ou pessoas doentes através da utilização de “swabs” (bastonetes de algodão) estéreis. Uma vez isolados estes vírus são geneticamente caracterizados através da amplificação por PCR e análise de genes marcadores tais como timidina kinase (TK), fator de crescimento do *Vaccinia virus* (VGF), e hemaglutinina (HA), conforme descrito anteriormente (DAMASO *et al.*, 2000; DA FONSECA *et al.*, 2002; TRINDADE *et al.*, 2003). Análises filogenéticas adicionais são feitas através da técnica de polimorfismo de perfil de restrição do gene ATI (gene do corpúsculo de inclusão do Tipo A) (MEYER *et al.*, 1997; LEWIS-JONES, 2004).

Como diagnóstico diferencial da infecção por ortho*Poxvirus* podemos citar: para*Poxvirus*, herpes simplex, esporotricose, eventualmente antrax e abscessos por estafilococos. Aspecto a se considerar é a importância da imunidade celular para o controle das infecções por *Poxvirus*. O uso de corticóides sistêmicos, bem como a presença de dermatite atópica no paciente, constituem fatores de risco para o agravamento da infecção, da mesma forma que síndromes de imunodeficiência natural ou adquirida, como as infecções pelo vírus HIV (SCHATZMAYR *et al.*, 2009).

1.2.13) Origem dos Vaccinia virus isolados no Brasil

Apesar do aumento dos relatos acerca dessa zoonose pouco se conhece acerca da origem, epidemiologia e evolução dos *Vaccinia virus* isolados no Brasil. Até o momento a origem desses vírus permanece desconhecida.

Existem, atualmente, duas hipóteses acerca da existência desses vírus: a primeira sugere que ancestrais brasileiros do *Vaccinia virus* existiam antes mesmo da campanha de erradicação da varíola e que esses vírus continuam a circular pelo Brasil (TRINDADE *et al.*, 2007a; DRUMOND *et al.*, 2008); a segunda hipótese é que eles teriam se originado durante a campanha

de erradicação da varíola, após um escape de uma amostra vacinal que se estabeleceu e evoluiu na natureza em um reservatório ainda não identificado (LEITE *et al.*, 2005; DAMASO *et al.*, 2000; DA FONSECA *et al.*, 2002; DRUMOND *et al.*, 2008; TULMAN *et al.*, 2006).

Através de estudos filogenéticos os *Vaccinia virus* brasileiros (BR-VACV) foram agrupados em dois grandes grupos: o primeiro formado pelas variantes que possuem uma deleção de 18bp na janela de leitura (open read frame – ORF) A56R que incluem o ARAV, GP2V e PSTV; e o segundo constituído pelas amostras que não possuem essa deleção, incluindo BAV, SAV, GP1V e BHV (TRINDADE *et al.*, 2007a; DRUMOND *et al.*, 2008).

Foi ainda identificado que cada grupo é ainda dividido em subgrupos. Em um grupo o ARAV e o GP2V estão mais intimamente relacionados um com o outro do que com o PSTV. No outro grupo o BAV, GP1V e BHV estão mais correlacionados entre si do que com o SAV (DRUMOND *et al.*, 2008).

A existência desses subgrupos indica a existência de um grande número de populações virais circulando no Brasil e que possuem origens diferentes. Baseando-se em estudos do gene *attI* verificou-se que dentro do grupo formado pelo BAV, GP1V, VBH e SAV, os três primeiros não possuem o corpo de inclusão tipo A, enquanto o SAV possui. Portanto, acredita-se que existam, até o momento, três diferentes populações virais (DRUMOND *et al.*, 2008; LEITE *et al.*, 2007).

Essa existência de populações virais diferentes já foi demonstrada para outros *Poxvirus* como o *Monkeypox virus* (LIKOS *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2005) e o *Variola virus* (ESPOSITO *et al.*, 2006). Essas diferenças refletem na epidemiologia, virulência, sintomatologia (LIKOS *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2005), origem geográfica e taxa de mortalidade dessas doenças (ESPOSITO *et al.*, 2006). Assim, a divisão dos *Vaccinia virus* brasileiros em diferentes grupos também pode refletir em diferenças na virulência e na distribuição geográfica dessas amostras (DRUMOND *et al.*, 2008).

Além disso, não foi possível estabelecer uma correlação entre os BR-VACV e as amostras vacinais IOC, VACV-LTBUT ou outras derivadas da amostra Lister (DRUMOND *et al.*, 2008; GUEDES; TRINDADE; KROON, 2006). Contudo, não é possível excluir a hipótese de essas amostras brasileiras terem se originado através do escape desses agentes utilizados para a fabricação da vacina contra a varíola. Portanto, são necessários mais estudos para estabelecer a real origem desses vírus.

Os estudos acerca da origem dos BR-VACV são ainda inconclusivos, mas é certo que existem populações virais distintas. Não foram registrados até o momento diferenças nas manifestações clínicas ou na epidemiologia dessas infecções (TRINDADE *et al.*, 2007a). Pode-se sugerir que esses vírus tenham origens diferentes ou que eles tenham se originado de um ancestral comum, mas que devido às diversas pressões seletivas eles tenham evoluído distintamente, estabelecendo-se na natureza em diferentes ambientes e hospedeiros (DRUMOND *et al.*, 2008).

Apesar de ainda não haver nenhum estudo conclusivo acerca da origem desses vírus, a ocorrência desses surtos são uma oportunidade inédita para a realização de estudos acerca da etiologia, epidemiologia, origem e resposta imunológica contra o *Vaccinia virus*. Além disso, o isolamento cada vez mais freqüente desses vírus reforça a hipótese de que o *Vaccinia virus* está circulando no país, no meio selvagem e em áreas rurais, e que esses vírus parecem ser endêmicos.

1.3) Resposta imune contra as infecções por *Poxvirus*

Em relação a estudos de resposta humanas contra os *Poxvirus*, estes dividem-se em duas fases. A primeira, antes da erradicação da varíola, caracterizada pela presença do *Variola virus* e pela exposição ao mesmo. Essa fase foi marcada por estudos realizados em pessoas que foram infectadas pelo vírus e que progrediram para a cura. A segunda, após a erradicação da varíola, caracteriza-se pela ausência de exposição ao vírus e marcada por estudos em pessoas vacinadas (PUISSANT; COMBADIÈRE, 2006).

Outra fonte de informações que se tem acerca da resposta imunológica, em seres humanos, contra os *Poxvirus* deriva, principalmente, de estudos sobre a vacinação com o *Vaccinia virus*, sendo já descrito que tanto a resposta inata quanto a adaptativa são importantes (LEWIS-JONES, 2004; LOUSBERG *et al.*, 2011).

Sabe-se que, embora a imunidade humoral e a imunidade mediada por célula participem da resposta do hospedeiro à infecção pelos *Poxvirus*, a resposta celular é particularmente crítica para o “clearance” das células infectadas (SEET *et al.*, 2003).

A resposta imune do hospedeiro contra a infecção por *Poxvirus* é muito potente e multifacetada, sendo que a patogênese de infecções localizadas e sistêmicas varia dramaticamente, dependendo do hospedeiro e da espécie de *Poxvirus*. A susceptibilidade à infecção viral também depende do tipo de célula. Dessa forma, os monócitos (células CD14⁺) são as células dentro da população de leucócitos, mais susceptíveis à infecção pelo *Vaccinia virus*. Por outro lado, os linfócitos T (células CD3⁺) são infectados com menor eficiência. Uma susceptibilidade intermediária foi detectada nos linfócitos B (células CD19⁺) e nas células Natural Killer (CD56⁺) (SÁNCHEZ-PUIG *et al.*, 2004).

Portanto, a resposta imune contra os *Poxvirus* abrange todos os “braços” do sistema imune e, inicialmente, o sistema imune inato é acionado, utilizando dos sistemas de interferon, do complemento, das células do sistema monocítico-fagocitário e das células Natural Killer (NK) para tentar manter a infecção sob controle até que uma resposta imune adquirida mais potente seja montada. A imunidade humoral e a resposta mediada por células são muito importantes para o “clearance” viral e para a prevenção de reinfecções. Os anticorpos anti-*Poxvirus* desempenham inúmeras funções tais como neutralização viral, opsonização e citotoxicidade celular dependente de anticorpo. Acredita-se que a resposta imune mediada por células, através de linfócitos T citotóxicos específicos para os *Poxvirus* desempenhe o papel mais importante no controle da infecção por *Poxvirus*. (SMITH; KOTWAL, 2002).

1.3.1) Participação do sistema Interferon e outras citocinas na resposta imune contra o Vaccinia virus

Em geral, a resposta imune inicia-se após a penetração dos vírus na camada basal da epiderme que gera a produção de quimiocinas e citocinas, tais como, a interleucina 1 alfa (IL-1a) (TIAN, LIU *et al.*, 2009). Devido ao fato da penetração desses vírus ocorrer através da pele e/ou das mucosas, sendo este o local de contato inicial dos vírus com o hospedeiro, o reconhecimento inicial pode ocorrer pelas células T $\gamma\delta$, que estão estrategicamente localizadas nesses sítios levando também à produção de citocinas pró-inflamatórias (SELIN; SANTOLUCITO *et al.*, 2001). Esses mediadores inflamatórios funcionam como quimioatraentes para leucócitos e quem então migram para o sítio inicial de infecção. Até o quarto dia pós-infecção estes linfócitos são

predominantemente T $\gamma\delta$, mas após o sétimo dia pós-infecção ocorre extensa migração de células T CD4 e CD8 positivas (JACOBS, CHEN *et al.*, 2006).

Após a migração celular para o tecido infectado ocorre o reconhecimento do vírus por células dendríticas e macrófagos através de seus receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRR's – pattern recognition receptors), tais como os receptores do tipo Toll (TLR's – toll like receptors). No caso específico dos *Poxvirus* já foi demonstrado envolvimento do TLR2 (BARBALAT; LAU *et al.*, 2009; QUIGLEY; MARTINEZ *et al.*, 2009), TLR3 (HOWELL; GALLO *et al.*, 2006; HUTCHENS; LUKER *et al.*, 2008a), TLR4 (HUTCHENS; LUKER *et al.*, 2008b), TLR8 (MARTINEZ; HUANG *et al.*, 2010) e TLR9 (SAMUELSON; HAUSMANN *et al.*, 2008). Além dos receptores associados à membrana como os TLR, existem também receptores citoplasmáticos que estão envolvidos no reconhecimento imune inato dos *Poxvirus*. Esses receptores reconhecem moléculas virais tais como DNA genômico (ISHII; COBAN *et al.*, 2006; HORNUNG; ABLASSER *et al.*, 2009) e RNAs de fita dupla produzidos durante a infecção (PICHLMAIR. SCHULZ *et al.*, 2009. VALENTINE; SMITH, 2010).

Em conjunto a ativação desses receptores leva à produção de várias quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 (IL-1), IL-12, IL-23, fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferons do tipo I (IFN-1) (KOHYAMA; OHNO *et al.*, 2007; BARBALAT; LAU *et al.*, 2009).

Várias citocinas participam de mecanismos de resistência anti-viral, sendo que algumas delas têm seu papel reconhecido nas infecções de camundongos por *Poxvirus*. O Interferon constitui uma das mais potentes “ferramentas” de defesa contra infecções virais e podem induzir efeitos anti-virais diretos assim como promover a resposta das células T auxiliares do tipo 1 (Th1). O sistema interferon atua na ativação de genes envolvidos no estabelecimento de um estado anti-viral. Dessa forma, o sistema interferon é estrategicamente um alvo dos *Poxvirus* tanto a nível extracelular quanto intracelular (SEET *et al.*, 2003).

Assim como em outras infecções virais, os interferons (IFN) possuem um papel crítico na resposta imune contra a infecção por *Poxvirus*. Existem três tipos de interferon: interferon alfa (IFN- α) produzido pelos fibroblastos; interferon beta (IFN- β), produzido pelos leucócitos e interferon gamma (IFN- γ) produzido pelos linfócitos e pelas células NK. Todos esses três tipos de interferon controlam efetivamente o crescimento dos *Poxvirus*. (SMITH; KOTWAL, 2002).

Os *Poxvirus* são fortes indutores da produção de IFNs, durante a infecção em animais. Os IFNs atuam de duas formas no controle da infecção por *Poxvirus*. Em primeiro lugar, ocorre a sinalização das células adjacentes da presença de um vírus, resultando na indução de um estado antiviral que consiste na inibição do crescimento celular e na produção de antígenos do MHC. Posteriormente, ocorre a ativação de macrófagos, de células NK e de linfócitos T citotóxicos. A resposta celular que se segue auxilia na eliminação das células infectadas pelos vírus. Embora os IFNs sejam essenciais para o “clearance” da infecção por *Poxvirus*, ele somente não é suficiente para proteger o hospedeiro de uma doença severa (SMITH; KOTWAL, 2002).

Tanto os interferons do tipo I quanto do tipo II são importantes contra as infecções por *Poxvirus* (SCHELLEKENS *et al.* 1981; WERENNE *et al.* 1985; RODRIGUEZ, RODRIGUEZ & ESTEBAN, 1991; HUANG *et al.* 1993; MULLER *et al.* 1994; VAN DEN BROEK *et al.* 1995; RAMSHAW *et al.* 1997; DEONARAIN *et al.* 2000).

Experimentos acerca dos efeitos dos IFNs têm sido realizados com camundongos knockout assim como em camundongos tratados com anticorpos anti-IFNs, infectados com o *Vaccinia virus*. Esses estudos demonstraram que camundongos normais eliminavam normalmente os vírus, porém, os camundongos tratados com anti-IFNs eram incapazes de eliminar a infecção e morriam (LEIST; EPPLER; ZINKERNAGEL, 1989; KARUPIAH *et al.*, 1993). Os estudos com camundongos knockout mostraram os mesmos resultados. (RAMSHAW *et al.*, 1997). Contudo, os altos níveis de IFNs *in vitro* nem sempre estão correlacionados com o “clearance” da infecção. Durante a infecção por *Ectromelia virus*, em camundongos, pode-se detectar altos níveis de IFNs, no entanto, ainda assim existe uma elevada letalidade (SMITH; KOTWAL, 2002).

Estudos em culturas de células mostraram que a adição de IFNs exógenos resultavam na interrupção da infecção por *Poxvirus*. Esse efeito parecia estar relacionado ao bloqueio da tradução precoce do RNA mensageiro viral. Esse bloqueio depende da amostra viral do *Poxvirus* utilizada (SMITH; KOTWAL, 2002). Além disso, já foi demonstrado que a administração de IFN- γ em camundongos infectados por *Ectromelia virus* e *Vaccinia virus* aumenta a resistência e limita a infecção (HARRIS *et al.*, 1995; KARUPIAH *et al.*, 1993b; MELKOVÁ *et al.*, 1994; KARUPIAH *et al.*, 1990; KOHONEN-CORISH *et al.*, 1990).

Também já foi observado que camundongos deficientes para os receptores de IFN são anormalmente susceptíveis à infecção pelo *Vaccinia virus*, demonstrando a importância dessas

moléculas no controle da infecção (VAN DEN BROEK *et al.* 1995). A inibição da óxido nítrico sintase em camundongos, responsável por mediar a ação antiviral do IFN- γ , converte uma infecção branda em uma infecção fulminante (KARUPIAH *et al.*, 1993a).

Outra importante citocina é o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). O TNF-alfa é uma potente citocina pró-inflamatória secretada por macrófagos, células NK e células T ativadas. O TNF- α atua na resposta imune através da promoção de um estado anti-viral e mediando a lise das células infectadas (SEET *et al.*, 2003).

Estas citocinas estimulam a diferenciação das células T CD4⁺ (T auxiliares) que estão quiescentes em células efectoras produtoras de IFN- γ e TNF- α que auxiliam no controle da multiplicação viral (PUISSANT-LUBRANO *et al.*, 2010), em conjunto com as células Natural killer (NK) e células T CD8⁺ (T citotóxicas) (THOMPSON; KOLUMAM *et al.*, 2006; MARTINEZ; HUANG *et al.*, 2008; KAWAKAMI *et al.*, 2009).

1.3.2) Participação do sistema do complemento na resposta imune contra o Vaccinia virus

O sistema de complemento também tem sua participação na atividade inata anti-viral. Ele é composto por mais de 30 proteínas, algumas das quais possuem atividade regulatória. Ele é um importante componente do sistema imune inato e, pode ser considerado a primeira linha de defesa contra as infecções microbianas. Embora três vias de ativação do complemento tenham sido descobertas, apenas duas têm sido extensivamente estudadas pelo seu papel no bloqueio da infecção por *Poxvirus*. A via clássica inicia-se pela fixação de anticorpo e a via alternativa inicia-se através da deposição do terceiro componente sobre uma superfície ativada (BULLER; PALUMBO, 1991).

Após a ativação de qualquer uma das vias, componentes pró-inflamatórios quimiotáticos são liberados, resultando na migração de leucócitos para o sítio da infecção. O resultado final da ativação do complemento é a formação do complexo de ataque à membrana, com a criação de poros na superfície ativada (SMITH; KOTWAL, 2002).

A via clássica de ativação do complemento, iniciada através da ligação de anticorpos, controla a infecção por *Poxvirus* por muitos mecanismos, o primeiro deles é lise viral. Uma vez que anticorpos contra os vírus são gerados, a lise viral ocorre através da formação do complexo de ataque à membrana. Alternativamente, na ausência de lise, a neutralização dos *Poxvirus* se dá através da deposição de componentes do complemento na superfície do vírus, possivelmente bloqueando o ataque à célula. A ativação do complemento resulta na migração de leucócitos e na fixação de C3b à superfície do *Poxvirus*, o que pode levar ao aumento da fagocitose de *Poxvirus* extracelulares, através da ligação do receptor de C3b. Finalmente, a infecção por *Poxvirus* pode ser controlada pelo complemento através da lise das células infectadas (SMITH; KOTWAL, 2002).

A via alternativa do complemento torna-se ativada através da deposição de C3 em uma superfície ativada na ausência de anticorpo. Essa via resulta na produção de componentes quimiotáticos, assim como a formação do complexo de ataque à membrana (SMITH; KOTWAL, 2002).

Estudos em cultura de células desafiadas com *Vaccinia virus* demonstraram que a deposição de C3 estava relacionada com a diminuição da produção de vírus, sugerindo que a via alternativa de ativação do complemento estaria controlando a infecção (SMITH; KOTWAL, 2002).

1.3.3) Participação das células do sistema monocítico-fagocitário na resposta imune contra o *Vaccinia virus*

As células inflamatórias contribuem para a eliminação da infecção por *Poxvirus* por diversos mecanismos, sendo o primeiro deles, a fagocitose. As células inflamatórias são capazes de fagocitar os vírions dos *Poxvirus* que estão revestidos por anticorpos, através da ligação com o receptor de Fc, ou antígenos revestidos por C3, através da ligação com o receptor de C3b. A resposta inflamatória à infecção por *Poxvirus* varia dependendo da espécie e do hospedeiro. Por exemplo, lesões induzidas por *Vaccinia virus* são caracterizadas por infiltração leucocitária, edema e vermelhidão. Contudo, nenhuma resposta inflamatória é observada na infecção pelo

Ectromelia virus. Acredita-se que isso ocorra devido à modulação imune pelo vírus (SMITH; KOTWAL, 2002).

As células inflamatórias também são capazes de limitar uma infecção por *Poxvirus* através da liberação de produtos anti-microbianos dependentes e independentes de oxigênio, como perforinas e granzimas. Finalmente, as células inflamatórias são capazes de liberar interferon e outras citocinas, resultando na indução de um estado antiviral nas células locais, assim como, no recrutamento de novos leucócitos para a área (SMITH; KOTWAL, 2002).

1.3.4 Participação das células Natural Killer na resposta protetora contra o Vaccinia virus

As células Natural Killer (NK) são também importantes na imunidade inata anti-viral. Elas reconhecem as células infectadas através da integração de sinais complexos de uma variedade de receptores, ativadores ou inibidores (ALTER; MALENFANT; ALTFELD, 2004).

As células NK são células efetoras da resposta imune inata que produzem citocinas imunorregulatórias, como o IFN- γ , importantes na defesa contra uma grande variedade de patógenos, incluindo os vírus (ROBERTSON; RITZ, 1990; BIRON *et al.*, 1999; BANCROFT, 1993; SCHARTON-KERSTEN; SHER, 1997). As células NK representam cerca de 10% de todos os linfócitos totais do sangue periférico e são caracterizadas fenotipicamente pela presença de CD56 e pela ausência de CD3 (ROBERTSON; RITZ, 1990).

Existem cinco subpopulações de células NK no sangue periférico definidas baseando-se na expressão dos marcadores CD16 (ou Fc γ RIIIA, receptor de baixa afinidade para a porção Fc da imunoglobulina G) e CD56 (molécula de adesão): (1) CD56^{bright}CD16⁻ (50–70% das CD56^{bright}), (2) CD56^{bright}CD16^{dim} (30–50% das CD56^{bright}), (3) CD56^{dim}CD16⁻, (4) CD56^{dim}CD16⁺, and (5) CD56⁻CD16⁺ (COOPER; FEHNIGER; CALIGIURI, 2001; MAVILIO *et al.*, 2005; CALIGIURI, 2008).

Em indivíduos saudáveis, as populações CD56^{dim}CD16⁻ e CD56⁻CD16⁺ representam pequena parte do total de células NK. Enquanto o papel das células CD56^{dim}CD16⁻ é desconhecido, sabe-se que as células CD56^{dim}CD16⁺ e CD56⁻CD16⁺ são funcionais (COOPER;

FEHNIGER; CALIGIURI, 2001). Cerca de 90% das células NK humanas são CD56^{dim} e expressam altos níveis de FcγRIII (CD16), enquanto apenas 10% são CD56^{Bright} e CD16^{dim/neg} (LANIER *et al.*, 1986; COOPER *et al.*, 2001).

As células Natural killer foram originalmente descritas baseada na sua habilidade funcional de reconhecer e realizar a lise de determinadas células tumorais na ausência de estimulação (TRINCHIERI; 1989). Os mecanismos moleculares que evitam que as células Natural killer lisem outras células normais indiscriminadamente foram recentemente descobertos. As células NK expressam um diverso repertório de receptores inibitórios que reconhecem moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) do tipo I expressas nas células normais. A ausência de expressão de um ou mais alelos do MHC do tipo I ou a expressão insuficiente de moléculas do MHC I leva à lise da célula alvo mediada pelas células NK (LJUNGGREN; KARRE, 1990; MORETTA *et al.*, 1994; MORETTA *et al.*, 1996).

A principal característica das células NK é a eficiente lise de células alvo que são deficientes ou que não possuem moléculas do HLA (MORETTA *et al.*, 1997; MORETTA *et al.*, 1992). Em humanos, diferentes receptores, específicos para os antígenos leucocitários humanos (HLA) dos tipos A, B ou C, foram identificados. Esses receptores pertencem à superfamília das imunoglobulinas (Ig-SF) e são caracterizados por apresentarem dois ou três domínios extracelulares do tipo Ig (MORETTA *et al.*, 1996; LANIER, 1998; LONG, 1999; COLONNA, 1997; VALIANTE *et al.*, 1997). Um segundo tipo de receptor específico para as moléculas de HLA é constituído pela associação de moléculas CD94 com membros da família NKG2 formando heterodímeros NKG2-CD94 (MORETTA *et al.*, 1997; LOPEZ-BOTET *et al.*, 1997).

Seres humanos e camundongos expressam membros da família de receptores NKG2 que formam ligações obrigatórias dissulfídicas heterodiméricas com o CD94. Quando expresso em níveis fisiológicos, as proteínas NKG2 não podem ser estavelmente expressas na superfície celular sem o CD94 (CARRETERO *et al.*, 1997; LAZETIC *et al.*, 1996; PHILLIPS *et al.*, 1996).

Receptores NKG2-CD94 ligam-se a moléculas de MHC Ib, HLA-E em seres humanos e Qa-1 em camundongos (BRAUD *et al.*, 1998; VANCE *et al.*, 1998 ; BORREGO *et al.*, 1998). A família NKG2 é constituída por três membros que compartilham um alto grau de similaridade em seus domínios extracelulares, NKG2A, NKG2C e NKG2 E (VANCE *et al.*, 1998 ; LANIER *et al.*, 1998; VANCE *et al.*, 1999; BERG *et al.*, 1998). O NKG2D é um receptor não correlato que não se liga a CD94 e tem pequena homologia com NKG2A

O receptor CD94-NKG2A tem função inibitória e é o primeiro receptor relacionado ao MHC I expresso durante o desenvolvimento da célula NK. Os receptores CD94-NKG2C e CD94-NKG2E são ativadores, mas seu papel específico no desenvolvimento ainda não foi descrito (ORR *et al.*, 2010).

Um estudo prévio descreveu que a molécula CD94 é essencial para a resistência de camundongos B6 contra o Ectromelia virus, demonstrando a importância dessa molécula contra infecções causadas por *Poxvirus*. Foi demonstrado que células murinas infectadas pelo Ectromelia virus, expressando a molécula Qa-1b (MHC-I), são especificamente reconhecidas pelo receptor ativador formado por CD94 e NKG2E. Acredita-se que, devido ao alto grau de conservação dos receptores e ligantes de murinos e seres humanos, um mecanismo similar deva existir durante infecções humanas com os vírus da varíola e Monkeypox que apresentam um alto grau de homologia com o Ectromelia vírus (FANG *et al.*, 2011).

Contudo, existem receptores das células NK que são responsáveis por induzir a ativação das células NK em uma via independente do HLA. Dessa forma, ativação das células NK é resultado de múltiplas interações entre os receptores das células NK e seus ligantes nas células alvo. Três moléculas de superfície foram identificadas como sendo os receptores responsáveis pela ativação das células nesse processo de citotoxicidade não restrito ao MHC. Essas moléculas representam os primeiros membros de um grupo de receptores que foram denominados receptores citotóxicos naturais (NCRs) (PENDE *et al.*, 1999; SIVORI *et al.*, 1997; VITALE *et al.*, 1998; PESSINO *et al.*, 1998). Após interagirem com a célula alvo, os NCR medeiam a ativação da célula NK, levando à lise da célula alvo e à produção de citocinas (MORETTA *et al.*, 2000). Parece que os ligantes para os NCRs são expressos tanto em células normais quanto nas tumorais e sua expressão pode ser modificada por estresse celular, ativação celular e transformação tumoral. Além disso, parece que algumas células tumorais não apresentam certos ligantes para os receptores citotóxicos. Acredita-se que essa ausência de expressão dos ligantes de NCR seja uma estratégia utilizada pelas células tumorais para evadir da lise mediada pelas células NK (MORETTA *et al.*, 2000).

Todos os NCRs pertencem à superfamília das imunoglobulinas, mas tem pouca homologia com outras moléculas humanas de superfície celular conhecidas e pouca homologia entre si (PESSINO *et al.*, 1998; PENDE *et al.*, 1999; CANTONI *et al.*, 1999). Os três receptores citotóxicos identificados até o momento foram denominados NKp 46, NKp 44 e NKp 30.

O receptor NKp46 é considerado o protótipo do grupo e é expresso por todas as células NK, tanto inativas quanto ativadas, mas está ausente nos outros tipos de células (PENDE *et al.*, 1999; SIVORI *et al.*, 1997; VITALE *et al.*, 1998; PESSINO *et al.*, 1998). O receptor NKp46 parece ser o principal receptor que ativa as células NK e pode induzir a mobilização de Ca^{2+} , a citotoxicidade e a liberação de citocinas (SIVORI *et al.*, 1997). Possui ainda importante papel como receptor na lise de diferentes células alvo normais ou tumorais de origem autóloga, alogênica ou xenogênica (SIVORI *et al.*, 1999). A inativação do receptor NKp46 através da utilização de anticorpos monoclonais demonstrou que a lise da grande maioria das células tumorais de diferentes tecidos (pulmonares, hepáticas, mamárias) era inibida. Além disso, existem evidências diretas que demonstram que o NKp46 é suficiente para mediar a citotoxicidade das células NK, isto é, esse receptor não requer a interação com outros receptores para induzir a ativação das células NK (SIVORI *et al.*, 1999; SIVORI *et al.*, 1997; VITALE *et al.*, 1998; PENDE *et al.*, 1999; PESSINO *et al.*, 1998). Foi ainda demonstrado que esse receptor é bastante conservado entre humanos e murinos (SIVORI *et al.*, 1999; SIVORI *et al.*, 1997; VITALE *et al.*, 1998; PENDE *et al.*, 1999; PESSINO *et al.*, 1998).

O NKp44 é um NCR expresso seletivamente pelas células NK ativadas. Além disso, foi demonstrado que a inativação desse receptor por anticorpos monoclonais bloqueia apenas parcialmente a atividade citotóxica da célula NK. Essa inibição de NK aumenta progressivamente com a co-inativação do NKp46. Assim, o NKp44 é um NCR expresso somente nas células NK ativadas e que parece cooperar com outros receptores na lise mediada pelas células NK (VITALE *et al.*, 1998).

O receptor NKp30, assim como o NKp46 é expresso por todas as células NK, tanto inativas como ativadas. Ele atua em cooperação com os receptores NKp46 e NKp44 na indução de citotoxicidade contra uma grande variedade de células alvo. Além disso, NKp30 é o principal receptor responsável pela lise de algumas células alvo tumorais em que os receptores NKp44 e NKp46 parecem não ter papel significante (PENDE *et al.*, 1999).

Outras moléculas expressas pela célula NK são também importantes durante o processo de ativação/ inibição das células NK. Dentre elas, a molécula CD161, um dos marcadores mais precoces das células NK, é codificada por um único gene não polimórfico, e não possui descrita até o momento uma via precisa de sinalização em seres humanos (DI SANTO, 2006). Foi inicialmente considerada como um receptor ativador das células NK (Lanier 1998; Azzoni *et al.*,

1998). Entretanto, atualmente existem fortes evidências de sua atividade inibitória sobre as células NK (Rosen *et al.*, 2005; Aldemir *et al.*, 2005; Germain *et al.*, 2011).

Uma outra importante molécula utilizada para determinação da funcionalidade das células NK é o marcador de superfície, CD107a. Este é um marcador da atividade funcional e sua expressão está aumentada em células NK após estimulação com células que não possuem MHC. A expressão de CD107a está correlacionada com a secreção de citocinas e a lise de células alvo (ALTER; MALENFANT; ALTFELD, 2004).

Diante do exposto, pode-se notar que as subpopulações de células NK possuem diferentes repertórios de receptores. Já foi descrito que todas as células NK CD56^{Bright} inativas têm alta expressão dos receptores de lectina C, CD94/NKG2 (VOSS *et al.*, 1998). Uma pequena porcentagem (menos de 10%) expressa receptores citotóxicos do tipo KIR (ANDRE *et al.*, 2000), enquanto a maioria das células inativas CD56^{dim} (mais de 85%) expressa KIR1 e têm baixa expressão de C94/NKG2 (COOPER *et al.*, 2001).

Em relação à infecção pelo *Vaccinia virus* já foi demonstrado que este vírus induz a ativação, proliferação e acumulação de células natural killer no sítio de infecção e sabe-se que essas células NK são um elemento importante na resposta protetora contra os *Poxivirus* especialmente em casos de deficiências das células T (CHISHOLM; REYBURN, 2006).

Após uma infecção pelo *Vaccinia virus* em camundongos, as células NK rapidamente migram para o sítio de infecção e após 6 horas de infecção já é possível detectar células NK no sítio de infecção (PRLIC *et al.*, 2005). As células NK também proliferam em resposta à infecção pelo *Vaccinia virus*, embora a proliferação ocorra em locais distantes do sítio de infecção (PRLIC *et al.*, 2005).

Os receptores citotóxicos naturais (NCR), NKp30, NKp44 e NKp46 parecem ser os mais importantes no reconhecimento das células alvo infectadas pelo *Vaccinia virus*. A inativação desses três receptores, por anticorpos monoclonais, bloqueia completamente o reconhecimento e a lise pelas células NK das células infectadas pelo *Vaccinia virus* (CHISHOLM; REYBURN, 2006).

Quando ativadas, as células NK expressam glicoproteínas de superfície específicas, como por exemplo o CD107a, que revela a ocorrência de degranulação celular. Várias enzimas lisossomais já foram caracterizadas como importantes no papel lítico dessas células, dentre elas as perforinas e as granzimas. Além disso, as células NK são importantes na ligação entra a

resposta imune inata e adaptativa. Elas são importantes produtoras de citocinas e quimiocinas, como IFN- γ , IL12, IL18, GM-CSF, TNF- α , RANTES e MIP-1-alfa (ALTER; MALENFANT; ALTFELD, 2004).

Em infecções de camundongos por *OrthoPoxvirus*, as células NK são importantes, principalmente nos 3 primeiros dias, apesar de não serem capazes de sozinhas controlar a disseminação e o desenvolvimento da infecção (SMITH; KOTWAL, 2002). Não há na literatura nenhum relato sobre o papel das células NK na infecção natural humana por *Poxvirus*.

1.3.5) Participação das células do sistema imune adaptativo e a manutenção da memória imunológica contra o VACV

Sabe-se que tanto a resposta humoral quanto a mediada por células são importantes no combate aos *Poxvirus* e que células B e T de memória podem ser detectadas em indivíduos vacinados contra a varíola, assim como anticorpos vírus-específicos. (SETTE *et al.*, 2009).

Em relação à resposta humoral, uma forte resposta anti-*Poxvirus* mediada por anticorpos é induzida em indivíduos que receberam a vacina contra a varíola (MOSS, 2011). São produzidos anticorpos neutralizantes tanto contra as formas infecciosas VM (vírus maduro) quanto contra as formas VE (vírus envelopados) do *Vaccinia virus*. Porém, essa resposta por anticorpos só pode ser detectada a partir do décimo quarto (14^o) dia após a imunização, sendo observado um pico no nível de anticorpos em aproximadamente um mês após a vacinação (PÜTZ *et al.*, 2005; AMANNA; SLIFKA; CROTTY, 2006). Anticorpos neutralizantes conferem proteção principalmente pelo reconhecimento de estruturas nas superfícies das partículas virais e, portanto, anticorpos direcionados contra a superfície dos vírions são os primeiros de interesse (PÜTZ *et al.*, 2005). O *Vaccinia virus* tem mais de 20 proteínas de superfície conhecidas. Além disso, o *Vaccinia virus* possui duas formas infecciosas, cada uma delas expressando diferentes proteínas de superfície. Dessa forma, é necessário um bom entendimento das estruturas virais para desenvolver conhecimentos acerca dos alvos dos anticorpos de proteção. A partícula mais abundante é a VM, que se acumula nas células e é liberada após a lise das mesmas. As formas VM são estáveis no ambiente e representam a principal partícula envolvida na transmissão entre

diferentes hospedeiros. A partícula infecciosa VE é mais frágil e menos abundante que a forma VM e estão mais relacionadas com a disseminação dos vírus no mesmo hospedeiro do que com a transmissão entre hospedeiros diferentes. Estudos têm demonstrado que anticorpos contra ambas as formas, VM ou VE, podem ser protetores. Assim, para a prevenção da transmissão viral entre diferentes hospedeiros, os anticorpos contra os antígenos da superfície das formas VM, provavelmente desempenham um papel principal na proteção. De modo geral, anticorpos anti-VM atuam principalmente na neutralização da inoculação viral, e os anticorpos anti-VE atuam principalmente limitando a disseminação viral após a infecção, embora ainda haja controvérsias acerca da contribuição *in vivo* dos anticorpos contra as formas VM *versus* VE dos vírions. (AMANNA; SLIFKA; CROTTY, 2006).

Assim como em camundongos, os seres humanos produzem inúmeros anticorpos contra as proteínas do *Vaccinia virus*, após a imunização. Várias proteínas virais são reconhecidas, como por exemplo, as proteínas de superfície das formas VM e VE, proteínas do core do vírion e proteínas solúveis, demonstrando que a resposta de anticorpos anti-*vaccinia* em seres humanos é bastante ampla. (AMANNA; SLIFKA; CROTTY, 2006).

Já foram identificados importantes epitopos antigênicos, envolvidos na proteção contra o *Vaccinia virus*, tanto na partícula infecciosa VM quanto na VE, que são reconhecidos por anticorpos em pessoas imunizadas. Como exemplo, podemos citar a proteína H3L, um receptor viral relacionado à adesão celular, identificado como um alvo dos anticorpos neutralizantes anti-VM, em seres humanos. Da mesma forma, a proteína B5R foi identificada na partícula VE e os anticorpos anti-B5R parecem ser os principais responsáveis pela neutralização das formas VE, em humanos. No entanto, os epítomos antigênicos específicos para o *Vaccinia virus* que são reconhecidos pelas células B de memória ainda não foram identificados. (SETTE *et al.*, 2009; AMANNA; SLIFKA; CROTTY, 2006).

Os anticorpos anti-*Poxvirus* desempenham inúmeras funções tais como neutralização viral, opsonização e citotoxicidade celular dependente de anticorpo. Acredita-se que a resposta imune mediada por células, através de linfócitos T citotóxicos específicos para os *Poxvirus* desempenhe o papel mais importante no controle da infecção por *Poxvirus* (SMITH; KOTWAL, 2002).

Os linfócitos T citotóxicos CD8⁺ são um importante componente do sistema imune adquirido. Os linfócitos T citotóxicos são restritos ao MHC da classe I e têm a função de

reconhecer especificamente as células infectadas, destruindo-as antes da maturação viral, com vistas a reduzir a disseminação da infecção. As CTLs não estão presentes na fase precoce da infecção primária, sendo importantes nas fases mais tardias da infecção para eliminação das células infectadas. As CTLs têm função fundamental na resposta imune nos casos de re-infecção, sendo essa resposta oito vezes maior e observada precocemente por volta do quarto dia de infecção. A importância das CTLs no “clearance” viral foi demonstrada através de estudos com *Ectromelia virus*. Devido à correlação entre o aumento da atividade das CTLs e a maior eliminação viral, pôde-se concluir que as CTLs são responsáveis pela proteção imune. (SMITH; KOTWAL, 2002).

Células T CD4⁺ também são importantes para o clearance viral e o pico dessas células ocorre aproximadamente 1 semana após a infecção pelo *Vaccinia virus*. As células T CD4⁺ efetoras constituem cerca de 4-5% do total de células T CD4⁺ esplênicas. A maioria das células T CD4⁺ produzem IFN- γ , mas há uma heterogeneidade entre as subpopulações de células, com algumas produzindo fator de necrose tumoral (TNF) e/ou interleucina 2 (IL-2). As frequências de células que produzem duas ou três citocinas ao mesmo tempo aumenta no compartimento das células T CD4⁺ de memória. (AMANNA, SLIFTY, CROTTY, 2006)

Vários estudos mostraram que a polarização da resposta Th1 em detrimento a uma resposta Th2 é essencial na eliminação dos *Poxvirus* (SEET *et al.*, 2003). As citocinas IL4 e IL-10, ambas importantes na geração da resposta Th2 podem inibir a eliminação do VACV em camundongos (VAN DEN BROEK *et al.*, 2000).

Desde a década passada, muitos estudos têm se dedicado a elucidar os mecanismos envolvidos na manutenção da memória imunológica independente de antígeno. É certo que tanto as células TCD4⁺ quanto as células TCD8⁺, de memória, podem persistir na ausência de exposição ao antígeno (SLIFKA, 2004; CROTTY; AHMED, 2004; TOUGH; SPRENT, 2003).

Estudos prévios já demonstraram que a memória celular contra o *Vaccinia virus* é composta, predominantemente, por células T CD4⁺ do tipo Th1 (PUISSANT-LUBRANO, 2010; COMBADIÈRE *et al.*, 2004; AMARA *et al.*, 2004). As células Th1 produzem predominantemente citocinas efetoras como o IFN- γ e o TNF- α que são necessárias para o clearance de vírus e bactérias intracelulares (MACLEOD *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2005). Em relação à memória imune após a vacinação contra a varíola, estudos prévios demonstraram que células T CD4⁺ de memória efetora, ou seja, produtoras de IFN- γ e/ou TNF- α foram detectadas

até 30 anos depois da vacinação (PUISSANT-LUBRANO, 2010; COMBADIÈRE *et al.*, 2004; AMARA *et al.*, 2004).

Em relação à duração da memória imunológica contra o *Vaccinia virus*, estudos prévios demonstraram que a resposta de células T de memória é duradoura, porém vai sofrendo um declínio, com uma meia vida de 8 a 15 anos. A memória de células T CD4⁺ é mais prolongada que a das células T CD8⁺, sendo observado que alguns indivíduos perdem preferencialmente, as células de memória T CD8⁺, enquanto o compartimento de células T CD4⁺ permanece intacto. Em raros casos, as células T CD8⁺ mantêm-se em níveis elevados enquanto as células T CD4⁺ têm seu número bastante reduzido (HAMMARLUND *et al.*, 2003).

Hammarlund e colaboradores (2003) demonstraram que as células de memória T CD8⁺ se mantinham em apenas 50% dos indivíduos, 20 anos após a vacinação, independentemente de quantas doses de vacina os indivíduos receberam. Isso implica que as células de memória T CD8⁺ não são absolutamente necessárias para a proteção e que as células de memória T CD4⁺ ou a resposta por anticorpos neutralizantes (ou ambas) devem constituir os principais componentes da imunidade em longo prazo, após as células de memória T CD8⁺ terem desaparecido.

1.3.4) Evasão imune dos Poxvirus

Uma resposta imunológica efetiva requer a participação de células efetoras do sistema inato, como as “Natural Killers” (NK), e de células efetoras do sistema adaptativo, como os linfócitos T citotóxicos (CTL's), para rapidamente identificar e eliminar as células infectadas antes que o vírus possa se replicar e disseminar-se. Conseqüentemente, os vírus desenvolveram mecanismos que reduzem a eficiência da resposta imune mediada por células. (SEET *et al.*, 2003).

Dessa forma, os *Poxvirus* parecem ter desenvolvido mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro, através da codificação de imunomoduladores (FIG.7). Os imunomoduladores do *Vaccinia virus* podem agir tanto dentro quanto fora das células infectadas. Os imunomoduladores intracelulares regulam a apoptose, a atividade antiviral dos IFNs, a sinalização do sistema imune inato e a transcrição gênica do hospedeiro. Os moduladores

extracelulares inibem a ação do complemento, IFNs, citocinas e quimiocinas (LUBINSKI *et al.*, 1998; ALCAMI; KOSZINOWSKI 2000; KOTWAL, 2000; MOSS; SHISLER 2001; ALCAMI, 2003; SEET *et al.*, 2003; HAGA; BOWIE, 2005; FINLAY; MCFADDEN, 2006; TAYLOR; BARRY, 2006; PERDIGUERO; ESTEBAN, 2009).

Deste modo, os imunomoduladores dos *Poxvirus* são importantes fatores de virulência que contribuem significativamente para a manutenção de infecções virais (READING; SMITH, 2003, JOHNSTON; MCFADDEN, 2003, BOOMKER *et al.*, 2005; FREBEL *et al.*, 2010). As proteínas imunomodulatórias dos *Poxvirus* podem ser divididas em três classes principais: proteínas de viromimetismo (virocinas e viroreceptores), proteínas de virocamuflagem e virotransdutores (ESPOSITO; FENNER, 2001).

Um dos mecanismos de evasão está relacionado com a diminuição da expressão de receptores de superfície celulares que participam na apresentação do antígeno e no reconhecimento imune celular, como as moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) (SEET *et al.*, 2003). Após uma infecção severa por *Poxvirus* parece haver uma diminuição da expressão de moléculas do MHC de classe I que apresentam antígenos endógenos para os linfócitos T citotóxicos CD8 circulantes. Além disso, os *Poxvirus* são capazes de inibir citocinas pró-inflamatórias, como o TNF α e os IFNs, que participam da regulação da expressão do MHC. Além disso, os *Poxvirus* utilizam diversas estratégias para bloquear a cascata de sinalização intracelular, modulando a resposta imunológica do hospedeiro (SEET *et al.*, 2003).

As proteínas de virocamuflagem subvertem as vias de apresentação de antígenos não-próprios das células infectadas fazendo com que estas células não sejam reconhecidas pelo sistema imune (JOHNSON e MCFADDEN, 2003; JOHNSON e MCFADDEN, 2004).

Os viroreceptores são receptores celulares alterados que perderam seus domínios transmembrana e conseqüentemente são secretados pelas células infectadas seqüestrando seus 20 ligantes (DÉNNES *et al.*, 2006; DAY *et al.*, 2008). O primeiro receptor viral de citocina a ser identificado foi o receptor viral solúvel de TNF (vTNFR) (Smith *et al.* 1991), seguido pela identificação dos receptores virais solúveis para IL-1 β (vIL-1 β R) (Alcami & Smith, 1992) e IFN- γ (vIFN- γ R) (Upton, Mossman & McFadden, 1992). Esses genes virais codificam proteínas com seqüências semelhantes aos domínios extracelulares de ligação dos receptores de citocinas do hospedeiro, porém eles não possuem os domínios transmembrana e de sinalização. Já foi

demonstrado que esses receptores virais se ligam às citocinas com alta afinidade e neutralizam sua atividade (Smith, 2000).

Muitos *Poxvirus* codificam receptores virais para IFN- γ (vIFN- γ R). Todos os receptores virais para IFN- γ atuam como antagonistas competitivos de IFN- γ , embora existam uma especificidade de ligantes de acordo com a espécie de *Poxvirus* (UPTON; MOSSMAN; MCFADDEN, 1992; MOSSMAN *et al.*, 1995; ALCAMI, SMITH, 1995).

As viroquinas são secretadas pelas células infectadas e são semelhantes às citocinas do hospedeiro (DÉNNES *et al.*, 2006; DAY *et al.*, 2008). A estratégia mais bem caracterizada empregada pelos *Poxvirus* para interferir na via do TNF envolve a codificação de homólogos do receptor de TNF α (TNFR), denominado vTNFR que se liga e seqüestra o TNF extracelular, impedindo a ligação deste ao TNFR celular (SEET *et al.*, 2003).

Os virotransdutores são proteínas intracelulares que interferem com as vias sinalizadoras ou efetoras (DÉNNES *et al.*, 2006; DAY *et al.*, 2008). Na figura 7 encontra-se representadas as principais estratégias de evasão do sistema imune dos *Poxvirus*

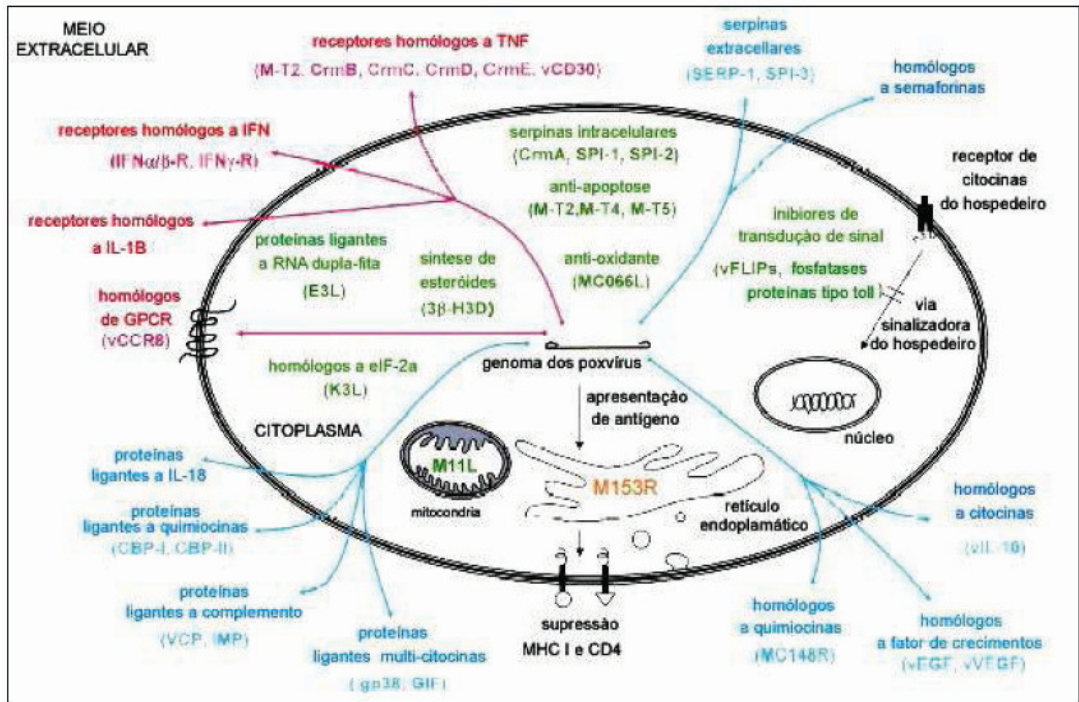


FIGURA 7: Representação esquemática de algumas proteínas imunomodulatórias codificadas por poxvírus. Em laranja, estão representadas as proteínas de virocamuflagem, em verde as de virotransdução, em vermelho os viroreceptores em vermelho e em azul as virocinas estão indicadas.

Fonte: modificado de JOHNSTON; MCFADDEN, 2003

1.4) Problema

A imunização com a vacina contra a varíola gera uma resposta de células Natural Killer mais robusta contra uma subsequente exposição ao *Vaccinia virus*?

Em uma re-exposição viral *in vitro* o perfil fenotípico das células Natural Killer de indivíduos que foram previamente infectados pelo *Vaccinia virus* é diferente do perfil fenotípico de indivíduos não infectados, mas que foram vacinados contra a varíola,?

Existe uma maior expressão de receptores citotóxicos naturais entre os indivíduos previamente expostos ao VACV quando comparados com os indivíduos não vacinados não infectados?

A expressão das citocinas e granzimas pelas células Natural Killer é maior naqueles indivíduos que já foram previamente expostos ao VACV?

1.5) Hipótese

Acredita-se que além da participação das células T de memória exista também uma co-participação importante das células do sistema imune inato, inclusive das células NK que devem ajudar na modulação da resposta imune contra o VACV. Acredita-se que as células NK desempenhem papel fundamental no *clearance* viral, como já descrito em outros trabalhos. Acredita-se que a resposta a uma re-exposição *in vitro* ao VACV seja mais robusta em indivíduos que infectados do que em indivíduos somente vacinados.

1.6) Justificativa

A maioria dos estudos com o *Vaccinia virus* foram realizados em pacientes vacinados contra a varíola, em condições controladas, para avaliar o perfil de resposta das células de memória (T CD4⁺ e CD8⁺). A maioria desses estudos visa identificar o perfil da memória imunológica contra esse vírus, existindo poucos estudos voltados para o estudo da participação resposta imune das células Natural Killer. Portanto, os surtos de *Vaccinia virus* que vêm ocorrendo no Brasil representam uma oportunidade única de se estudar a resposta imune contra esse vírus, não somente a resposta imune adaptativa, mas também a resposta imune inata.

Considerando a erradicação da varíola, deve-se ressaltar que uma parcela significativa da população nunca foi vacinada contra a varíola e o nível de imunidade é bastante variável nos indivíduos que já foram vacinados (PUISSANT-LUBRANO *et al.*, 2010) Esse fato pode levar à

disseminação do *Vaccinia virus* naqueles indivíduos que não foram expostos a eles; fato que já é observado nos casos de surto desse vírus que acometeram diversas regiões do Brasil.

Em relação ao desenvolvimento desse trabalho é importante ressaltar que o grupo de pesquisa do Laboratório de Vírus, do Departamento de Microbiologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, tem acompanhado a ocorrência de surtos causados pelo *Vaccinia virus*, em regiões rurais e silvícolas do Brasil. Os surtos já alcançaram todos os 4 estados da região Sudeste e mais de mil animais, assim como dezenas de pessoas, já foram comprovadamente afetadas pela virose. O quadro preciso do número de pessoas e animais doentes, entretanto, não é conhecido, uma vez que a maioria dos casos não é notificada. A situação já colocou em estado de alerta as autoridades de saúde pública em todos os estados da região. Estes surtos são atípicos por indicarem a existência de um reservatório animal para o *Vaccinia virus*, fato não conhecido até o momento, e também por apontar para o possível estabelecimento e circulação do *Vaccinia virus* na natureza.

Além de representarem enorme problema econômico e de saúde pública, estes surtos também oferecem uma oportunidade única para se compreender a epidemiologia de infecções naturais causadas por *Poxvirus*. Além disso, o estudo dos surtos possibilitará uma melhor compreensão da resposta imunológica de indivíduos infectados por um vírus geneticamente semelhante à varíola, em condições naturais. Por fim, o estudo representa a possibilidade de se analisar e modelar o possível impacto de vacinação em massa contra *OrthoPoxvirus* numa era em que doenças causadas por estes vírus são novamente consideradas uma ameaça global devido à ameaças de bio-terrorismo.

Até o momento já foram encontrados muitos vírus morfológica e geneticamente relacionados ao VACV, em diversas regiões de nosso país. Pode-se dizer que o VACV e suas variantes estão distribuídos em reservatórios na natureza, porém algumas vezes se estabelecem como zoonoses, atingindo preferencialmente a zona rural, haja vista que muitas destas infecções acometem animais, tanto domésticos (rebanho bovino) quanto selvagens (roedores) e, ainda pior, estão infectando também o homem. Sendo assim, torna-se de elevada relevância a procura e captura dos reservatórios naturais do VACV e suas variantes, estudos acerca da caracterização genética de novos *Poxvirus* emergentes, da resposta imunológica destas infecções; visando prevenir surtos e conhecer formas de controle da doença, ou seja, um maior controle destas infecções.

Como exposto anteriormente, apesar de já se conhecer um pouco acerca do papel da imunidade inata na infecção de camundongos por *Poxvirus*, pouco se sabe sobre sua participação na infecção natural humana. Diante do aparecimento de surtos de infecção pelo *Vaccinia virus*, em várias regiões do Brasil, o estudo da imunidade inata em moradores dessas áreas torna-se de extrema importância, não apenas para o entendimento básico da interação vírus – sistema imune, como também para o estabelecimento de abordagens epidemiológicas para o controle da infecção.

A importância das células Natural Killer no controle da infecção pelo *Vaccinia virus* já foi descrita (CHISHOLM; REYBURN, 2006), porém, o fenótipo dessas células não foi bem descrito, até o momento. No presente estudo, avaliamos o perfil fenotípico das células NK expressando os marcadores de citotoxicidade celular (NCR's: Nkp30, 44 e 46); as subpopulações apresentando as moléculas CD161 e CD94; a produção de citocinas efetoras (IFN- γ e TNF- α) e granzimas (A e B) pelas células NK, antes após estimulação *in vitro* com o VACV inativado por luz UV. Portanto, diante do exposto, o principal objetivo do trabalho foi avaliar o fenótipo das células NK de indivíduos previamente infectados ou não pelo *Vaccinia virus*, vacinados ou não contra a varíola após esse estímulo.

2) OBJETIVOS

2) OBJETIVOS:

2.1) Objetivo Geral

- Analisar a resposta imune inata mediada pelas células NK em indivíduos previamente infectados ou não pelo *Vaccinia virus*, vacinados ou não contra a varíola

2.2) Objetivos específicos:

- Analisar as sub-populações de células NK, através da análise da presença ou ausência dos marcadores de superfície: CD3, CD56, CD16, CD94, CD161, NKp30, NKp44, NKp46, após estimulação *in vitro* pelo *Vaccinia virus* inativado;

- Avaliar a atividade funcional das células NK através da análise da expressão de CD107a (marcador de exocitose), e da expressão de Perforina, Granzima A e Granzima B, após estimulação *in vitro* pelo *Vaccinia virus* inativado;

- Analisar a expressão de citocinas intra-citoplasmáticas (IFN- γ , TNF- α), após estimulação *in vitro* pelo *Vaccinia virus* inativado.

3) METODOLOGIA

3) METODOLOGIA

3.1) População estudada

A amostra foi constituída por um total de 42 indivíduos, sendo selecionados 22 pacientes de áreas rurais as quais foram acometidas pelo surto de *Vaccinia virus*, no ano de 2005; e 20 indivíduos não infectados previamente. Desses 22 indivíduos previamente infectados, 12 haviam sido previamente vacinados contra a varíola e 10 não tinham história vacinal positiva. Dos 20 indivíduos não infectados, 10 eram vacinados contra a varíola e 10 não vacinados.

A amostragem de previamente infectados (n = 22) foi constituída por indivíduos residentes em propriedades rurais que foram afetadas pelo surto de *Vaccinia virus* que ocorreu no ano de 2005, sendo 10 não vacinados e 12 previamente vacinados contra a varíola. Durante esse ano de 2005 foi realizado um estudo do perfil fenotípico das células do sistema imune dos indivíduos infectados pelo *Vaccinia virus*. Naquele estudo foram coletadas amostras de sangue de indivíduos infectados residentes em propriedades rurais nas regiões central, centro-oeste e na zona da mata. Além disso, foi aplicado um questionário sócio-econômico contendo também a descrição do número e local das lesões, além dos sintomas apresentados (APÊNDICE A). Naquele estudo pôde-se verificar que alguns indivíduos infectados haviam sido vacinados contra a varíola, durante a campanha de vacinação da OMS e, no entanto, haviam contraído a infecção pelo *Vaccinia virus*, como confirmado pelo exame clínico e laboratorial realizado pelo Laboratório de pesquisa de Vírus do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (GOMES *et al.*, 2012). O fato de terem sido infectados pelo *Vaccinia virus*, a despeito da vacinação prévia gerou interesse do grupo de pesquisa em avaliar a resposta imune desses indivíduos, principalmente aspectos da resposta imune inata que não haviam sido avaliados na pesquisa inicial.

Desse modo, foram encontrados e selecionados 22 indivíduos que ainda residiam nos locais afetados. Estes residiam em propriedades afetadas pelo surto de 2005, nas regiões central (município de Mariana), centro-oeste (municípios de Piumhi, Bambuí e São Roque de Minas) e

na zona da mata (municípios de Acaiaca, Barra Longa e Jequeri) que fizeram parte desse estudo, como especificado na figura 8. Tais indivíduos foram selecionados e contactados através de busca ativa e entrevistados para obtenção de dados envolvendo suas atividades, comportamento e ocorrência de infecções anteriores, através de um questionário sócio-econômico (APÊNDICE B) que foi aplicado a estes voluntários. Além disso, amostras do sangue periférico dos indivíduos uma vez infectados pelo *Vaccinia virus* foram coletadas com o objetivo de se avaliar o perfil da resposta imune inata desses pacientes. Como critérios de inclusão selecionamos indivíduos saudáveis, sem sinais de doença aguda em atividade, sem história prévia de doenças auto-imune prévias, que não faziam uso de medicações imunomoduladoras (ex: corticóides, quimioterápicos).

Vale ressaltar que durante o surto de 2005, foram isolados dois vírus obtidos de amostras de seres humanos, denominados VACV-Br-Hu-1, VACV-Br-Hu-2. Foram também isolados três vírus isolados de amostras de gado, denominados VACV-Br-An-1, VACV-Br-An-2, and VACV-Br-An-3. Todos os vírus foram filogeneticamente caracterizados como amostras de VACV brasileiros.



Figura 8: Representação das regiões do estado de Minas Gerais que foram afetadas pelos surtos de *Vaccinia virus*, em 2005. Indivíduos residentes em propriedades rurais destas regiões e que foram acometidos pelo *Vaccinia virus* em 2005 foram selecionados como amostragem do estudo.

A amostragem de não infectados ($n = 20$) foi constituída por indivíduos não residentes nas áreas de surtos de *Vaccinia virus*, sendo 10 previamente vacinados, 10 não vacinados. A inclusão desses dez indivíduos que não haviam sido infectados pelo *Vaccinia virus*, mas que haviam sido vacinados contra a varíola foi de extrema importância para comparação da eficácia da vacinação em exposições subseqüentes ao vírus, visto que já foi demonstrado em alguns trabalhos que a vacinação contra a varíola, em determinados indivíduos, não foi capaz de prevenir contra uma infecção posterior pelo *Vaccinia virus*. Por outro lado, os sintomas apresentados pelos indivíduos foram mais brandos quando comparados com indivíduos que nunca haviam sido vacinados (HEYMANN; SZCZENIOWSKI; ESTEVES, 1998). Esses indivíduos apresentavam a marca da vacinação em braço esquerdo e cartão de vacinação confirmando a vacina prévia contra a varíola. Além desses indivíduos, foram recrutados 10 indivíduos que não haviam sido infectados pelo *Vaccinia virus*, e que não haviam sido vacinados contra a varíola, sendo considerados como controles negativos. Os critérios de inclusão para esses dois grupos foram: indivíduos hígidos, não portadores de comorbidades crônicas, não portadores de doenças auto-imunes, não usuários de drogas imunossupressoras (como corticóides, quimioterápicos).

Ensaio de soroneutralização e Elisa foram realizados para confirmar ou não a soropositividade para o *Vaccinia virus* nos grupos de indivíduos, como descrito na metodologia adiante.

A todos os indivíduos foi apresentado um termo de consentimento pós-informado, oralmente e por escrito, o qual continha informações sobre o estudo, seus propósitos, procedimentos e riscos envolvidos (APÊNDICE C). Vale ressaltar que o trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o número CAAE - 0062.0.203.000-08 (ANEXO A).

3. 2) Coleta das amostras

Amostras de sangue foram colhidas através da utilização de técnicas plenamente estabelecidas em bancos de sangue. Nestas, a agulha do dispositivo de coleta foi inserida na

veia ante-cubital, no antebraço do voluntário e 30 a 40 ml de sangue foram coletados. A coleta foi realizada por pessoal qualificado. Todas as amostras foram codificadas e as identidades dos doadores não foram reveladas. Os doadores foram informados de que este tipo de coleta de sangue é realizada rotineiramente em clínicas e hospitais e que praticamente não há risco da ocorrência de grande desconforto ou lesão. As coletas foram realizadas entre os dias 01/07/2009 a 26/01/2010. As amostras de sangue foram armazenadas em caixas térmicas do local de coleta até o laboratório sendo realizados os experimentos no mesmo dia em que o sangue foi coletado.

As análises imunológicas dos pacientes aconteceram concomitantemente à obtenção dos materiais clínicos em campo, uma vez que, por razões metodológicas, estas amostras precisavam ser processadas e analisadas por citometria de fluxo imediatamente após sua coleta.

3.3) Avaliação hematológica

A avaliação hematológica consistiu na realização do hemograma para contagem global e diferencial de leucócitos. Para realização do procedimento, amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos de 5 mL contendo anticoagulante EDTA (BD Vacutainer) e os parâmetros hematológicos avaliados em contador hematológico eletrônico de células (Coulter MD18, E.U.A.). Os hemogramas foram realizados pelos próprios pesquisadores no Laboratório de Imunologia do Instituto René Rachou.

3.4) Células e vírus

Células *vero* foram utilizadas para multiplicação viral, titulação, teste de soroneutralização e testes de inativação viral pela luz ultravioleta (CAMPOS; KROON, 1993). A amostra do VACV Western Reserve (WR), gentilmente cedida pelo Dr. C. Jungwirth

(Universität Würzburg, Germany), foi utilizada como protótipo viral e purificada em gradiente de sucrose (JOKLIK, 1962). Para realização da inativação do vírus, uma fina camada de solução viral foi exposta durante 5 a 10 minutos à radiação UV de comprimento de onda de 280 nm, a uma distância de 15 cm entre a placa e a luz UV. A solução irradiada foi testada quanto à infectividade viral e a incapacidade de formar placas demonstrou a eficácia da inativação viral.

O uso da luz ultravioleta resulta na inativação da replicação viral sem abolir a transcrição de genes virais precoces, mas não a de genes tardios. Além disso, comparando-se o vírus inativado por luz UV, com vírus com capacidade de se replicar, foi observado que a transcrição viral de genes precoces no vírus inativado está aumentada tanto em nível quanto na duração. Ademais, o tratamento adequado com luz UV gera vírus que não se replicam e não possuem efeito citopático, mas que são capazes de expressar genes inseridos. Também já foi observado que a antigenicidade do vírus inativado por luz é indistinguível daquela dos vírus que se replicam, na sua capacidade de estimular linfócitos T (TSUNG *et al.*, 1996).

3.5) Ensaio de soroneutralização

Ensaio de soroneutralização foi utilizado para avaliar a soropositividade dos indivíduos infectados, durante o surto de 2005, assim como descrito por Gomes e colaboradores (2012). Dessa forma, o soro dos 20 indivíduos não infectados foi aquecido a 56°C por 30 minutos e utilizado para os ensaios de neutralização (FERRIER-REMBERT *et al.*, 2007). O título foi expresso como a máxima diluição na qual foi detectada 50% de inibição da formação de placas quando comparadas às células infectadas com VACV-WR e o soro negativo.

3.6) Ensaios de ELISA IgG

Os ensaios de ELISA IgG foram realizados para confirmar a soropositividade dos indivíduos previamente infectados, durante o surto de 2005. Para isso, amostras de VACV-WR purificadas e inativadas por luz UV, foram diluídas em solução de carbonato 0,01M (pH 9,6) para otimizar a concentração e foram adicionadas em placas de Elisa 96-well (Apogent, USA). As placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 e bloqueadas com BSA a 1% (Sigma) em PBS por 2 horas a 37°C. Após os procedimentos de lavagem, as amostras de soro foram utilizadas em uma diluição de 1:100 e as placas foram incubadas a 37°C por 30 minutos e então lavadas três vezes. As reações foram realizadas utilizando anticorpos IgG de coelho anti-humana conjugada com peroxidase horseradish (Sigma-Aldrich, Germany), diluída nas concentrações 1:5000 e 1:4000, respectivamente.

Após incubação a 37°C durante 30 min, as placas foram lavadas quatro vezes e o substrato dicloridrato de o-fenilenodiamina (Sigma-Aldrich, EUA) e peróxido de hidrogênio 0,03% foram adicionados. A reação foi terminada pela adição de ácido sulfúrico 2M em cada poço e a medida lida em absorvância de 492 nm num leitor automático de placas. (SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009).

3.7) Análise de marcadores de superfície e citocinas intracitoplasmáticas em células NK do sangue periférico após estimulação *in vitro*

O sangue dos pacientes que participaram deste estudo foi coletado em tubo Vacuntainer estéril contendo heparina. Após a coleta e realização do hemograma, o número de células utilizadas para realização dos ensaios foi ajustado para que cada tubo possuísse um total de 1×10^6 células. Após ajuste do número de células por tubo, estas foram incubadas na presença de meio de cultura RPMI, recebendo a denominação de cultura controle (C) ou na presença do *Vaccinia virus* inativado, por luz Ultravioleta (UV), apresentando uma concentração final de 0,01 vírus por célula, recebendo a denominação de cultura com estímulo

específico (E). Os tubos foram previamente incubados durante 6 horas em estufa de CO₂ com 5% de umidade a 37°C (Forma Scientific E.U.A). Em seguida, foi adicionado a todos os tubos de cultura Brefeldina A (SIGMA, E.U.A), na concentração de 10µg/ml. As amostras foram incubadas por mais quatro horas em estufa de CO₂ com 5% de umidade a 37°C. A utilização da Brefeldina A assegura a retenção da citocina no interior da célula, uma vez que essa substância mantém a mesma no complexo de Golgi. Após a incubação, 220µl de EDTA (SIGMA, E.U.A) 20mM, obtidos de uma solução estoque de 200mM, diluída 1/10 (concentração final de 2mM) foram adicionados diretamente às culturas. Os tubos contendo as amostras foram incubados por 15 minutos em estufa de CO₂ com 5% de umidade a 37°C. Esse procedimento bloqueia o processo de ativação posterior das células e garante a obtenção de resultados padronizados e comparáveis. Posteriormente, foi adicionado às amostras de sangue 3ml de PBS-W e estas foram centrifugadas a 800g por 10 minutos a 18°C. O sobrenadante foi aspirado deixando somente o precipitado de células. Posteriormente, o precipitado foi ressuspenso e transferido para tubos de poliestireno de 5ml (FALCON, E.U.A) previamente identificados e com os anticorpos correspondentes, como mostrado na Quadro 2 e em seguida, estes tubos foram incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 2ml de solução de lise comercial (FLS - BD, E.U.A) por 10 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. As células foram lavadas com 1ml de PBS-W e centrifugadas a 400g, por 10 minutos à 18°C.

Para a detecção de citocinas intracitoplasmáticas foi acrescentado aos tubos 2,5ml de PBS-P (PBS, pH 7,4 contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina) por 10 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados 20µl do anticorpo anti-citocina marcado com PE, diluídos 1:10 em PBS-P nos respectivos tubos, e posteriormente incubados por 30 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. Após a incubação, as células foram primeiramente lavadas com 1ml de PBS-P e em seguida, com 1ml de PBS-W. No final, foram adicionados 300µl de solução fixadora MFF. As amostras contendo a suspensão celular foram utilizadas para aquisição de dados em citômetro de fluxo (FAScalibur - BD, E.U.A). Foram analisados 100.000 eventos dentro da população de linfócitos totais.

Nome	Função	Fluorescência	Clone	Fabricante
IFN- γ	Ativa macrófagos e exerce funções críticas na imunidade inata e adquirida	PE	4S.B3	BD Pharmlingen
TNF- α	Principal mediador da resposta inflamatória aguda por microrganismos infecciosos	PE	6401.1111	BD Pharmlingen
CD3	Molécula sinalizadora de linfócitos T	FITC	HIT3a	BD Pharmlingen
CD16	Receptor para Fc de IgG, induz a ativação de células NK dependente de anticorpo.	PerCp	LNK16	EXBIO
CD56	Molécula de adesão, importante na caracterização de células NK	APC	B159	BD Pharmlingen
CD94	Receptor regulatório de atividade citotóxica da célula NK, liga-se a moléculas HLA-E da classe I de MHC	PE	HP-3D9	BD Pharmlingen
CD107a	Marcador de exocitose de células NK	PE	H4A3	BD Pharmlingen
CD161	Molécula regulatória de células NK	PE	DX12	BD Pharmlingen
NKp30	Receptor citotóxico das células NK	PE	P30-15	BD Pharmlingen
NKp44	Receptor citotóxico das células NK	PE	P44-8.1	BD Pharmlingen

NKp46	Receptor citotóxico das células NK	PE	9E2/Nkp46	BD Pharmingen
Granzima A	Induz apoptose das células alvo, presente nos grânulos das CTL e das NK	PE	CB9	BD Pharmingen
Perforina	Proteína formadora de poros presente nos grânulos dos CTL e das NK.	PE	δG9	BD Pharmingen
Granzima B	Induz apoptose das células alvo, presente nos grânulos das CTL e das NK	PE	GB11	BD Pharmingen

Quadro 2: Relação dos anticorpos usados para caracterização das células NK.**Fonte: (ABBAS *et al.*, 2008; COOPER. FEHNIGER; CALIGIURI, 2001; KONJEVIC *et al.*, 2009)**

3.8) Obtenção e análise dos dados no citômetro de fluxo

O citômetro de fluxo (FACScalibur- BD, E.U.A) utilizado neste trabalho é equipado com lâmpada de argônio que permite a avaliação básica de 5 parâmetros: tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), fluorescência do tipo 1 (FL1), fluorescência do tipo 2 (FL2), fluorescência do tipo 3 (FL3) e fluorescência do tipo 4 (FL4). FL1, FL2, FL3 e FL4 correspondem respectivamente a sinais luminosos emitidos pela excitação de FITC, PE, PerCP e APC. A aquisição dos dados foi realizada através de um sistema de computador e o "software, Cell Quest", acoplado ao citômetro. O "Cell Quest" fornece um perfil de células de acordo com o tamanho e granulosidade.

A análise dos dados adquiridos pelo citômetro de fluxo para identificação de populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual destas populações e sub-populações, foi feita através de um sistema de computador e o "software, Flow Jo".

Através de um gráfico de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) seleciona-se a população celular que se deseja analisar, população linfocitária (R1) (FIG 9A). A análise leva em consideração a população de células selecionadas, avaliando o perfil fenotípico por emissão de fluorocromo. Após a seleção da janela de interesse, analisa-se a intensidade de fluorescência apresentada pelas células presentes nesta janela, utilizando-se de gráficos de fluorescência 1 (FL1) versus FSC.

Para garantirmos uma seleção segura para a população de células NK foi construído um gráfico de FL1 para o marcador CD3 em função da granulosidade (FSC). A população analisada apresenta granulosidade negativa para este fenótipo celular (CD3-), sendo delimitada por um marcador (R2). Através desta abordagem pode-se obter uma população homogênea e bem definida das demais, não só facilitando a seleção da população de interesse, como também garantindo a sua identificação de forma segura e padronizada (FIG 9B). Após a seleção da janela de interesse (R2) analisou-se a intensidade de fluorescência apresentada pelas células presentes nesta janela, utilizando-se de gráficos de FL3 versus FL4. Esta metodologia permite investigar o percentual de células NK. A população de interesse foi caracterizada por todas as células CD56⁺ (Bright e Dim) e/ou CD56⁻ e por todas as células

CD16 (positivas, dim ou negativas), sendo necessariamente positiva para pelo menos um desses marcadores, delimitadas por um marcador (R3) (FIG 9C). Dentro das subpopulações de células delimitadas pelo marcador R3 foi construído um gráfico de FL2 para as citocinas (IFN- γ , TNF- α), Perforina, Granzima A e Granzima B, em função da granulosidade. Da mesma forma, foram construídos gráficos para os marcadores de superfície, CD94, CD161, NKp30, NKp44, NKp46, CD107a (FIG.9D).

Já, para delimitar as sub-populações de células NK, conforme descrito anteriormente, após a seleção da janela de interesse (R2) analisou-se a intensidade de fluorescência apresentada pelas células presentes nesta janela, utilizando-se de gráficos de FL3 versus FL4. As seguintes sub-populações foram determinadas pelos seguintes marcadores: R5 (CD56^{bright}CD16⁻), R6 (CD56^{bright}CD16^{dim}), R7 (CD56^{dim}CD16⁻), R8 (CD56^{dim}CD16⁺) e, R9 (CD56⁻CD16⁺) (FIG.9E).

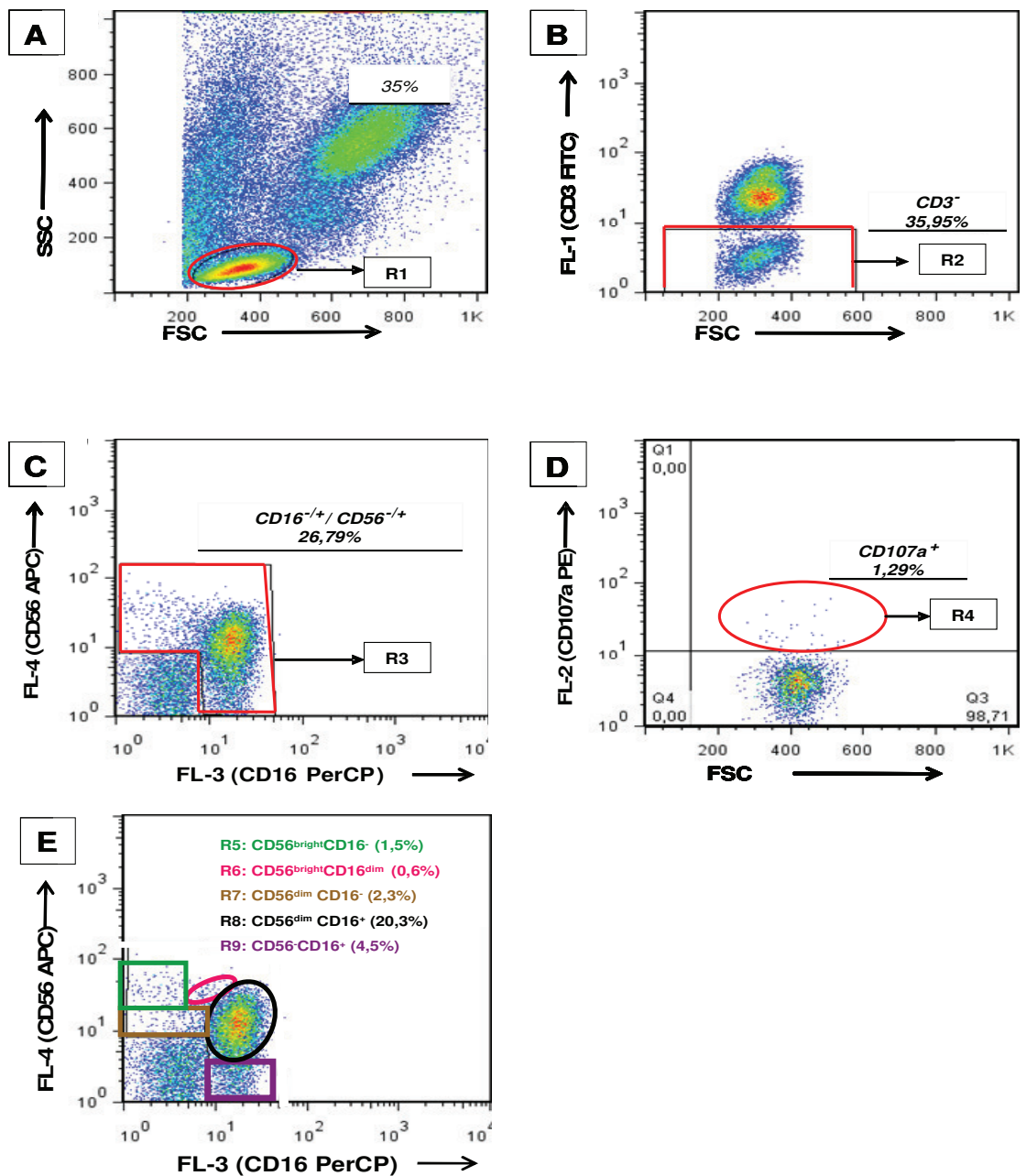


FIGURA 9: Seleção de células NK, co-expressando marcadores celulares. (A) Inicialmente foram selecionadas as populações de linfócitos do sangue periférico em gráficos de FSC×SSC e essa população denominada (R1). (B) Dentro dessa população de linfócitos selecionamos as células CD3- (R2). (C) Dentro as células CD3-, selecionamos as subpopulações CD3-CD16-/+/CD56+/- (R3). (D) Finalmente, dentre as células CD3-CD16-/+/CD56+/- selecionamos aquelas co-expressando os marcadores avaliados na pesquisa, no caso da figura o marcador CD107a (R4). A mesma estratégia foi utilizada para selecionar as células CD3-CD16-/+/CD56+/-, co-expressando NKp30, NKp44, NKp46, CD161, CD94, IFN-g, TNF-a, Granzima A, Granzima B e Perforina (R4). (E) Dentro as células CD3-, selecionamos as subpopulações de células NK, delimitadas pelos seguintes marcadores: R5 (CD56^{bright}CD16⁻ (1,5%), R6 (CD56^{bright}CD16^{dim} (0,6%), R7 (CD56^{dim} CD16⁻ (2,3%), R8 (CD56^{dim} CD16⁺ (20,3%) e R9 (CD56⁻CD16⁺ (4,5%).

3.9) Análise Estatística

A análise estatística foi realizada a partir do teste não paramétrico Kruskal Wallis test seguido de Dunns, com o objetivo de detectar diferenças entre os grupos estudados, e do teste de Wilcoxon, no intuito de realizar análises pareadas, verificando diferenças entre culturas estimuladas ou não com antígenos. O nível de significância definido foi de $p < 0.05$ e todas as análises foram realizadas utilizando o Software GraphPad Prim 4.0 (San Diego, CA). Um fluxograma de todo o trabalho pode ser visto na figura 10.

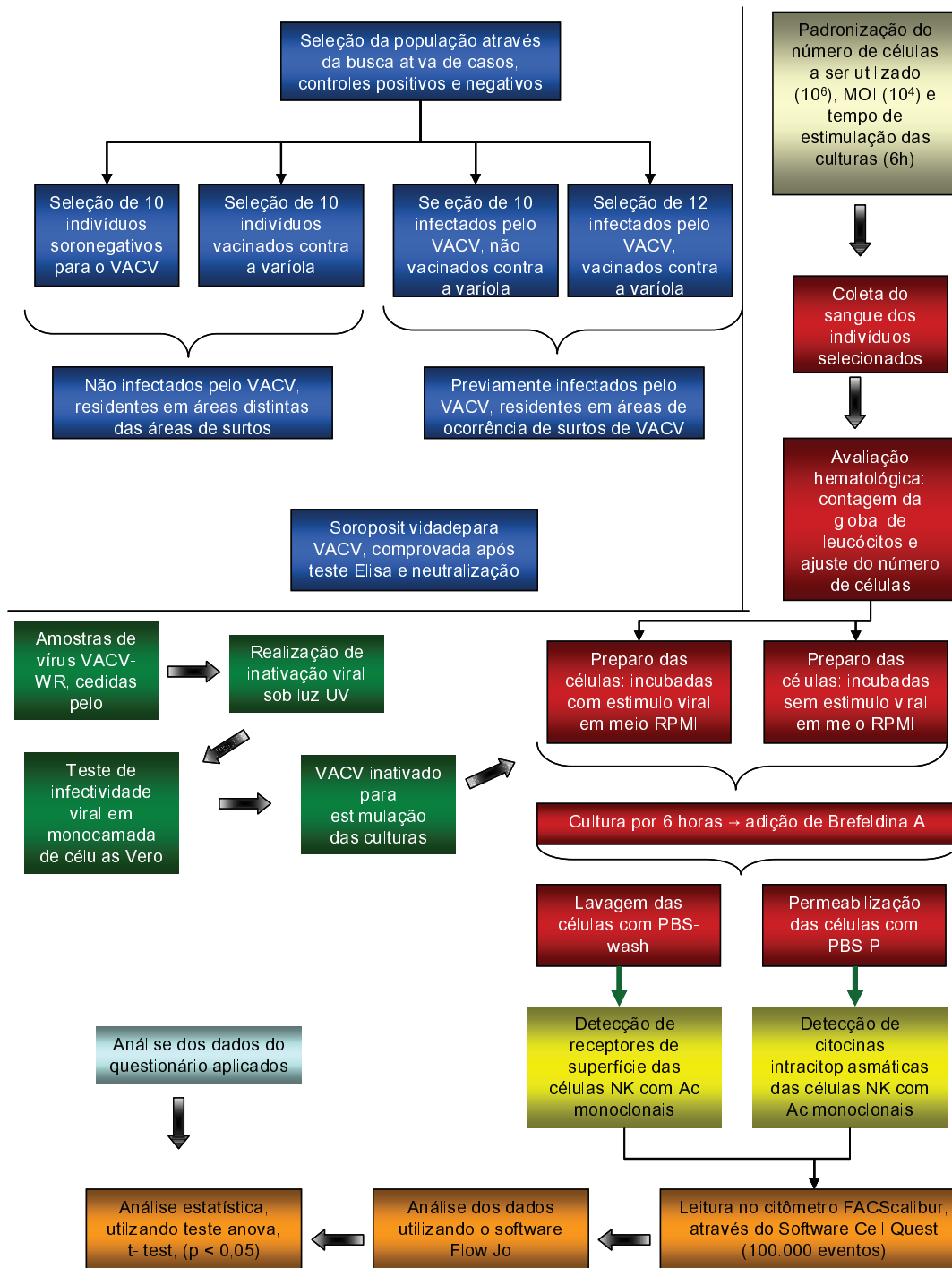


FIGURA 10: Fluxograma de trabalho

4) RESULTADOS

4) RESULTADOS

4.1) Análise clínica epidemiológica

Além de avaliarmos o perfil fenotípico das células NK de todos os indivíduos envolvidos nesse estudo, foi realizada, ainda, uma análise clínica epidemiológica dos pacientes previamente infectadas. Essa análise foi importante visto que percebemos que dentre os indivíduos que foram infectados pelo *Vaccinia virus*, havia algumas pessoas que eram previamente vacinadas contra a varíola. Porém, a despeito da vacinação adquiriram a infecção pelo vírus. Portanto, através de um questionário contendo questões abertas e fechadas aplicado pelos próprios pesquisadores durante o surto que ocorreu em 2005. O questionário continha questões acerca da idade, sexo, estado civil, cor, profissão, renda familiar, escolaridade, hábitos de vida, sintomas apresentados durante a infecção, número e localização das lesões, necessidade de afastamento do trabalho, presença de familiares apresentando a doença e tipo de contato com o gado contaminado. A Tabela 1 apresenta a distribuição da população estudada em relação a estado vacinal, idade e gênero.

TABELA 1
Caracterização e Distribuição absoluta da amostragem estudada

<i>Grupos</i>	<i>Estado Vacinal</i>	<i>Número de indivíduos</i>	<i>Média de idade (Min-Max)</i>	<i>Gênero (n)</i>	
				<i>Masculino</i>	<i>Feminino</i>
Previamente infectados*	Vacinados**	12	56 (42-68)	12	0
	Não vacinados	10	24.5 (18-34)	10	0
Não infectados	Vacinados***	10	46.4 (39-62)	7	3
	Não vacinados	10	29.2 (28-31)	6	4

Fonte: Dados da pesquisa

* Esses indivíduos foram infectados pelo *Vaccinia virus* durante um surto que ocorreu em 2005, em diferentes fazendas do estado de Minas Gerais, no Brasil.

** Importante, dos 22 indivíduos previamente infectados, 12 eram previamente vacinados contra a varíola, como confirmado pela marca típica da vacinação no braço esquerdo.

*** Dos 20 indivíduos não infectados, 10 eram vacinados contra a varíola como confirmado pela visualização da marca típica de vacinação contra a varíola no braço esquerdo e todos apresentavam cartão de vacinação contra a varíola.

Em relação à idade dos pacientes observamos diferenças importantes entre os indivíduos que eram previamente vacinados e os indivíduos não vacinados que adquiriram a infecção pelo *Vaccinia virus*. Dessa forma, dentre os indivíduos não vacinados a média de idade foi de 24,5 anos com um mínimo de 18 anos e máximo de 34 anos. Já em relação aos pacientes previamente vacinados a média de idade foi mais alta sendo de 56 anos, com um mínimo de 42 anos e um máximo de 68 anos. Em relação ao sexo dos indivíduos analisados, houve uma totalidade de indivíduos do sexo masculino em ambos os grupos. Já ao analisarmos a cor dos indivíduos, dentre os indivíduos vacinados 8 (66,68%) declararam-se como leucodérmicos e 4 como faiodérmicos. Já entre os indivíduos não vacinados 8 declararam-se como leucodérmicos (80%) e 2 como faiodérmicos (20%).

Em relação ao estado civil observamos que entre os indivíduos não vacinados, 7 eram solteiros (70%) e 3 eram casados (30%). Dentre os indivíduos vacinados 8 eram casados (66,68%), 2 eram solteiros (16,66%) e 2 eram divorciados (16,66%). Dentre as funções desempenhadas na fazenda na qual trabalhavam, os indivíduos eram ordenhadores (100%) e

alguns eram também agricultores, tanto entre os indivíduos não vacinados quanto os vacinados. Quando avaliamos o total de anos que os indivíduos trabalhavam com a função de ordenhador, detectamos que dentre os indivíduos não vacinados, a média de tempo trabalhado foi de 18,4 anos com um mínimo de 12 e máximo de 26 anos. Já entre os indivíduos vacinados a média foi de 32,09 anos, variando de 1 a 61 anos de tempo de serviço como ordenhador.

Em relação à renda familiar dos indivíduos não vacinados, 1 não informou (10%), 2 apresentavam renda entre 1 e 2 salários mínimos (20%), 3 tinham renda entre 2 e 5 salários mínimos (30%) e 4 ganhavam mais de cinco salários mínimos (40%). Já entre os indivíduos vacinados 1 não informou (8,33%), 2 ganhavam menos de um salário mínimo (16,66%), 4 ganhavam um salário mínimo (33,32%), 3 entre 1 e 2 salários mínimos (25%) e 2 ganhavam mais de cinco salários mínimos (16,66%).

Além disso, quando analisamos o grau de escolaridade entre os indivíduos não vacinados 1 (10%) não estudou, 1 (10%) possuía ensino fundamental incompleto (até a 4ª série), 2 (20%) possuíam ensino fundamental completo (da 1ª a 8ª série), 4 (40%) possuíam ensino médio incompleto (entre o 1º e o 3º ano) e 2 (20%) possuíam ensino superior incompleto. Já entre os vacinados encontramos que 3 (25%) não estudaram, 6 (50%) tinham o ensino fundamental incompleto (até a 4ª série), 2 (16,66%) tinham o ensino fundamental incompleto entre 4ª e 8ª série, e 1 (8,33%) tinha ensino superior incompleto.

Em relação aos hábitos de vida observamos que dentre os indivíduos não vacinados 7 (70%) eram não tabagistas e 3 (30%) eram tabagistas. Entre os vacinados, 11 (91,66%) eram tabagista e apenas 1 (8,34%) não fumava.

Quando questionamos acerca do consumo de bebida alcoólica observamos que entre os não vacinados: 3 (30%) não faziam uso de bebida alcoólica, 1 (10%) não informou e 6 (60%) faziam uso apenas ocasionalmente. Entre os vacinados 2 (16,66%) não faziam uso de bebida alcoólica, 2 (16,66%) não informaram, 5 (41,66%) relataram que faziam uso apenas ocasionalmente e 3 (25%) faziam uso regular de bebida alcoólica.

Quando analisamos o número e tipo de sintomas apresentados pelos indivíduos não vacinados e vacinados, observamos que houve uma diferença significativa na quantidade de sintomas apresentados entre os dois grupos. Assim, dentre os indivíduos não vacinados a média de 6 sintomas apresentados foi de , variando de 4 a 7 sintomas diferentes apresentados. Já entre os indivíduos vacinados a média foi de 2,5 sintomas, variando de 1 a 7 sintomas.

Além de apresentarem menos sintomas relacionadas à infecção pelo *Vaccinia virus*, os sintomas apresentados foram mais brandos (TAB. 2).

TABELA 2
Frequência dos sintomas apresentados pelos indivíduos infectados
vacinados e não vacinados

Tipo de sintoma	Não Vacinados (n/%)	Vacinados (n/%)
Febre	10 (100%)	7 (58,33%)
Dor generalizada	10 (100%)	4 (33,33%)
Linfoadenopatia	6 (60%)	5 (41,66%)
Vômitos	-	1 (8,33%)
Conjuntivite	-	1 (8,33%)
Cefaléia	10 (10%)	4 (33,33%)
Edema Local	8 (80%)	9 (75,00%)
Mal Estar	10 (100%)	4 (33,33%)
Calafrios	3 (30%)	1 (8,33%)
Náuseas	-	1 (8,33%)

Fonte: Dados da pesquisa

Quando se avaliou o quesito número de lesões foi observado que os indivíduos vacinados apresentaram uma média de 4,5 lesões e os indivíduos não-vacinados apresentaram uma média de 8 lesões. Já em relação ao local de ocorrência destas lesões naqueles vacinados elas se concentram em grande parte nas mãos (100%) e pequenas ocorrências em outras regiões (17%) como o nariz, a nuca e a perna; naqueles não-vacinados o principal local de acometimento também são as mãos (100%), porém a ocorrência em outras regiões foi mais significativa (40%).

Ao se avaliar o quesito afastamento médico das atividades profissionais foi observado que 25% dos indivíduos vacinados tiveram que se afastar, com uma média de 10 dias de afastamento, não houve internações dentro desse grupo; porém, dentro do grupo dos não-vacinados a proporção afastada foi de 60%, com uma média de 15 dias de afastamento, houve 2 internações para alívio sintomático. Não houve casos nenhum caso letal. Apesar de termos tido relatos em ambos os grupos de que familiares também haviam contraído a infecção pelo VACV, não pudemos fazer nenhuma inferência de mudança no perfil de contágio desta zoonose, pois os familiares também eram ordenhadores.

4.2) Estudo do perfil imunofenotípico de leucócitos do sangue periférico: porcentagem de células NK na população total de células do sangue periférico

Com o objetivo de avaliar a resposta imune inata de indivíduos uma vez infectados pelo *Vaccinia virus*, as células do sangue periférico foram estimuladas pelo VACV inativado durante seis horas de cultura. Após esse período o fenótipo das células NK e a produção de citocinas intracitoplasmáticas foram avaliados, através da técnica de citometria de fluxo na qual foram realizados ensaios de tripla marcação de superfície com anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD16 e anti-CD56.

Ao avaliarmos os resultados do percentual de Células NK nas culturas de células com estímulo antigênico, podemos observar que não houve diferença significativa entre o percentual de células NK, em todas as culturas estimuladas pelo *Vaccinia virus* (vírus) quando comparadas às culturas sem estímulo (meio), culturas controle, ou seja o fato de ser ou não previamente vacinado, não influenciou no aumento do percentual de células NK detectado após o estímulo com o VACV (TAB.3).

TABELA 3

Distribuição relativa média das populações de células NK no sangue total de indivíduos previamente infectados ou não submetidos ou não à vacinação contra a varíola, após a estimulação *in vitro* com o VACV inativado por luz UV

Grupos	Culturas	NK Total (%)	CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁻	CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ^{dim}	CD3 ⁺ CD16 ⁻ CD56 ^{bright}	CD3 ⁺ CD16 ⁻ CD56 ^{dim}	CD3 ⁺ CD16 ^{dim} CD56 ^{bright}	
			(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
Não- infectados	Não vacinados	Meio	27,35±3,5	5,29±2,1	21,13±8,5	1,33±0,8	3,34±1,1	0,81±0,2
		Vírus	30,52±4,9	4,86±1,9	25,42±10,3	1,11±0,5	3,30±0,8	0,69±0,3
	Vacina- dos	Meio	35,74±7,2	5,04±2,3	26,59±9,2	0,9±0,4	2,00±0,6	0,59±0,3
		Vírus	35,26±8,9	4,80±1,2	26,34±8,1	1,02±0,3	2,25±0,6	0,58±0,2
Infectados	Não vacinados	Meio	27,63±8,3	5,46±2,1	21,45±11,4	1,31±0,6	2,21±0,7	0,71±0,4
		Vírus	26,72±7,9	4,55±1,6	20,35±10,3	1,50±0,7	2,34±0,5	0,67±0,4
	Vacina- dos	Meio	28,52±7,5	4,90±1,7	21,55±13,1	1,20±0,5	3,29±1	0,7±0,2
		Vírus	30,79±8,1	5,28±2,2	23,46±13,4	1,33±0,6	3,06±1,2	0,63±0,3

Fonte: Dados da pesquisa

* Não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem média das subpopulações de células NK quando os quatro grupos foram comparados.

4.3) Estudo do perfil imunofenotípico de leucócitos do sangue periférico: frequência de subpopulações de células NK

Para avaliação das subpopulações de Células NK envolvidas na resposta imune inata foram realizados ensaios de quádrupla marcação e as células NK, co-expressando os marcadores CD94, CD161, NKp30, NKp44, NKp46, CD107a, Perforina, Granzima A, Granzima B, IFN- γ e TNF- α , foram analisadas.

4.3.1) Análise de Células NK co-expressando NKp30, NKp44 e NKp46 e CD161

O Gráfico 1 mostra a porcentagem de células NK co-expressando os NCRs e a molécula CD161, antes e após estimulação *in vitro* com o VACV inativado por luz UV. Quando analisamos a expressão de NKp30 (GRAF 1– A e B) nas culturas de células com estímulo antigênico (E) de pacientes que nunca haviam sido expostos ao VACV, ou seja, não infectados não vacinados, podemos observar que não houve diferença significativa ($p = 0,0892$) na expressão desse marcador em relação às culturas controle (C). Porém, observou-se que houve aumento significativo da expressão desse marcador quando analisamos as culturas de células com estímulo antigênico (E) de pacientes que já haviam sido expostos ao VACV seja por vacinação ou infecção prévia, ou seja, nos indivíduos não infectados previamente vacinados contra a varíola ($0,0002$), nos indivíduos previamente infectados não vacinados ($p=0,0002$) e vacinados ($p=0,0004$), em relação às culturas controle (C).

Ao avaliarmos a expressão de NKp44 (GRAF 1– C e D)) nas culturas de células com estímulo antigênico (E) de pacientes que nunca foram expostos ao VACV (não infectados não vacinados) podemos observar que houve diminuição significativa ($p = 0,0005$) na expressão desse marcador em relação às culturas controle (C). Contudo, observamos que houve aumento significativo da expressão de NKp44, quando analisamos a expressão deste nas culturas de células com estímulo antigênico (E) de pacientes com exposição prévia ao VACV, ou seja, nos indivíduos não infectados vacinados ($0,0288$), nos indivíduos previamente infectados não vacinados ($p=0,0001$) e vacinados ($p=0,0004$), em relação às culturas sem estímulo (C).

Em relação à expressão de NKp46 (GRAF 1– E e F) só houve aumento do percentual de células NK co-expressando esse marcador nos indivíduos que já foram infectados pelo vírus, ou seja, nos indivíduos previamente infectados vacinados ou não ($p=0,0002$ e $p<0,0001$, respectivamente).

Por fim, ao avaliarmos a expressão de CD161 (GRAF 1– G e H) podemos observar que houve aumento na expressão desse marcador em todas as culturas, após estímulo antigênico, de indivíduos que já haviam tido contato com o VACV, ou seja, pacientes não infectados vacinados ($p=0,0379$) e pacientes previamente infectados vacinados ou não ($p=0,0002$ e $p=0,0002$, respectivamente).

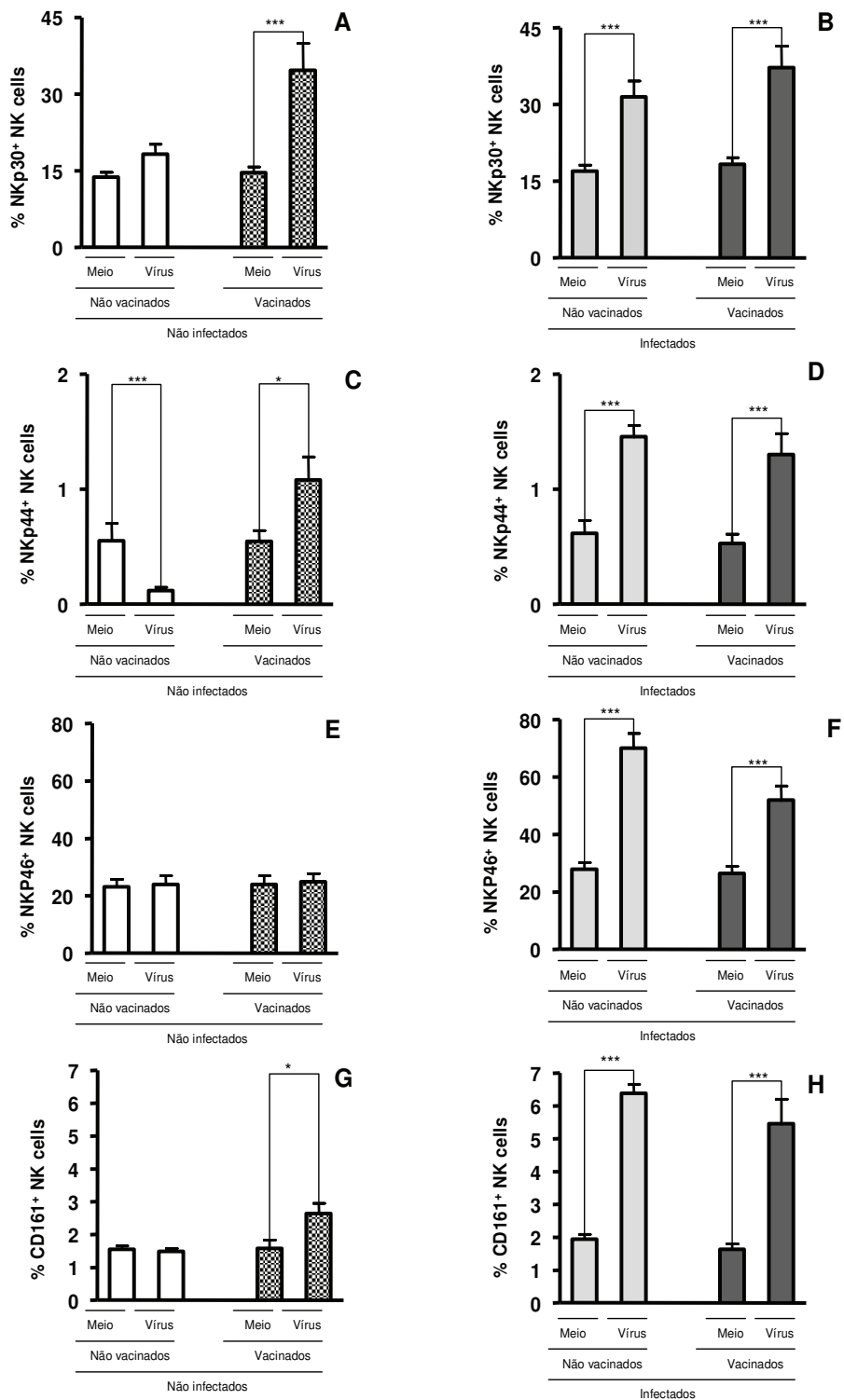


GRÁFICO 1: Comparação do percentual de células NK expressando os NCRs (NKp30, NKp44 e NKp46) e a molécula CD161, entre os grupos de indivíduos infectados ou não, antes e após estimulação *in vitro* com o VACV inativado. A, B = NKp30. C, D = NKp44. E, F= NKp46. G, H = CD161. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e foram representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Com o intuito de avaliar a importância da vacinação para uma resposta mais eficaz numa exposição subsequente ao *Vaccinia virus*, os grupos de indivíduos vacinados e não vacinados foram comparados entre si, após a estimulação *in vitro* com o VACV. O Gráfico 2 sumariza os resultados descritos aqui.

Dessa forma, ao compararmos os indivíduos que nunca haviam tido contato com o VACV, ou seja, não vacinados não infectados, com pacientes que já haviam sido previamente expostos ao vírus, seja pela vacinação ou infecção prévias, detectamos que houve um aumento no percentual de células expressando os NCRs (NKP30, NKP44 e NKP46) apenas nos indivíduos com contato prévio ao VACV, quando foram avaliadas apenas as culturas após estimulação antigênica. Os dados demonstram que os indivíduos não vacinados não infectados possuem menor percentual de células NK co-expressando os receptores citotóxicos naturais (NCRs), após estímulo viral. Os dados demonstram a importância da vacinação prévia, para uma maior eficácia da resposta imune.

Ainda podemos notar que o percentual de células NK co-expressando a molécula CD 161, considerada por alguns autores como marcador de ativação celular (LANIER 1998; AZZONI *et al.*, 1998) e por outros como molécula inibitória (ROSEN *et al.*, 2005; ALDEMIR *et al.*, 2005; GERMAIN *et al.*, 2011), está maior nos grupos de indivíduos que já tiveram uma exposição prévia ao *Vaccinia virus* seja por vacinação ou por infecção prévias, após estimulação com o VACV. No entanto, em nosso estudo não podemos inferir o papel ativador ou inibidor dessa molécula, uma vez que não foram realizados ensaios funcionais.

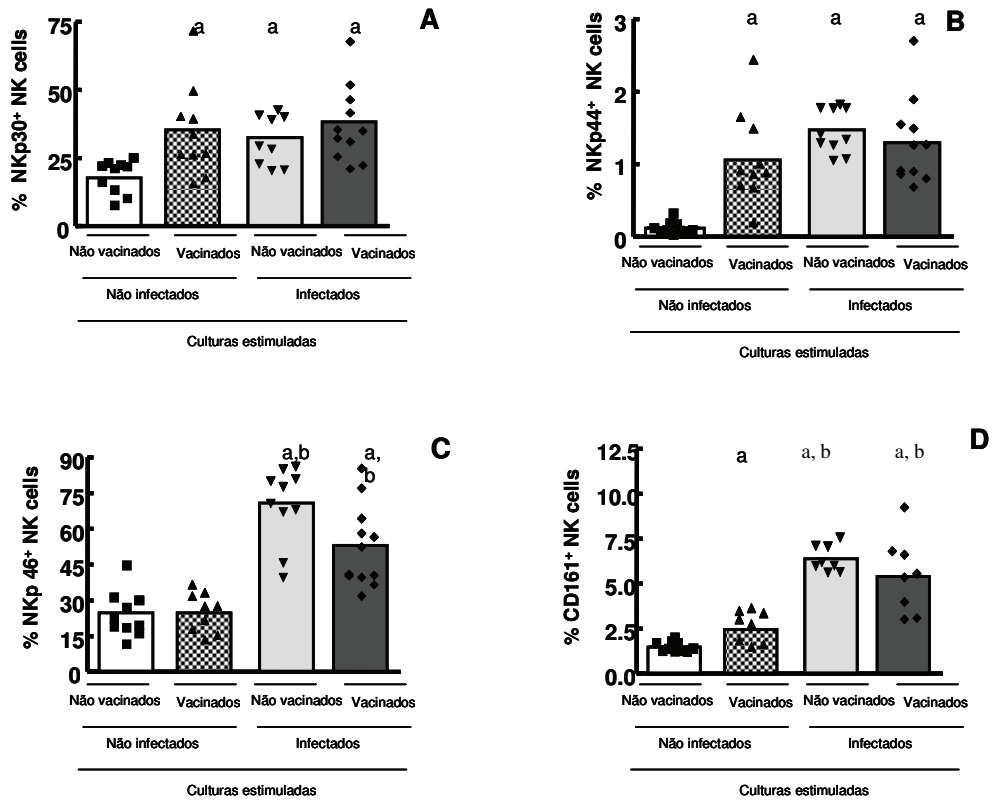


GRÁFICO 2: Comparação do percentual de células NK expressando os NCRs (NKp30, NKp44 e NKp46) e a molécula CD161, entre os grupos de indivíduos infectados ou não, após estimulação *in vitro* com o VACV inativado. A = NKp30. B = NKp44. C = NKp46. D = CD161. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e foram representadas por a = significativamente maior que não infectado não vacinado. b = significativamente maior que não infectado vacinado.

4.3.2) Análise de Células NK co-expressando CD107a, Perforina, Granzima A e Granzima B

O Gráfico 3 mostra o percentual de Células NK co-expressando CD107a, Perforina, Granzima A e Granzima B, antes e após estimulação *in vitro* com o VACV inativado por luz UV.

A molécula CD107a trata-se de um marcador de degranulação e está altamente expresso nas células NK citotóxicas, com fenótipo CD3⁺CD16^{Bright} (ALTER; MALENFANT; ALTFELD, 2004; KONJEVIC *et al.*, 2009).

Ao avaliarmos a expressão de CD107a (GRAF 3- A e B) nas culturas de células com estímulo antigênico, foi observado que houve diminuição significativa da expressão desse marcador em todas as culturas estimuladas pelo *Vaccinia virus* quando comparadas às culturas controle (C).

Da mesma forma, ao avaliarmos a expressão de Perforina (GRAF 3- C e D) e Granzima A (GRAF 3- E e F) também detectamos uma diminuição do percentual de células NK co-expressando essas enzimas, em todos os grupos analisados, quando as culturas controle (sem estímulo) e culturas com estímulo foram comparadas.

Contudo, em relação à expressão de Granzima B (GRAF 3- G e H) observamos que houve uma diminuição ($p = 0,0147$) na expressão desse marcador nos indivíduos sem exposição prévia ao vírus, ou seja, não infectados não vacinados, quando culturas controle (sem estímulo) e culturas estimuladas foram comparadas. Contudo, observamos que houve aumento da expressão de Granzima B, nos indivíduos vacinados e previamente infectados ($p=0,0147$, $p=0,0232$, $p=0,0194$, respectivamente), quando as culturas controle (sem estímulo) e culturas com estímulo foram comparadas.

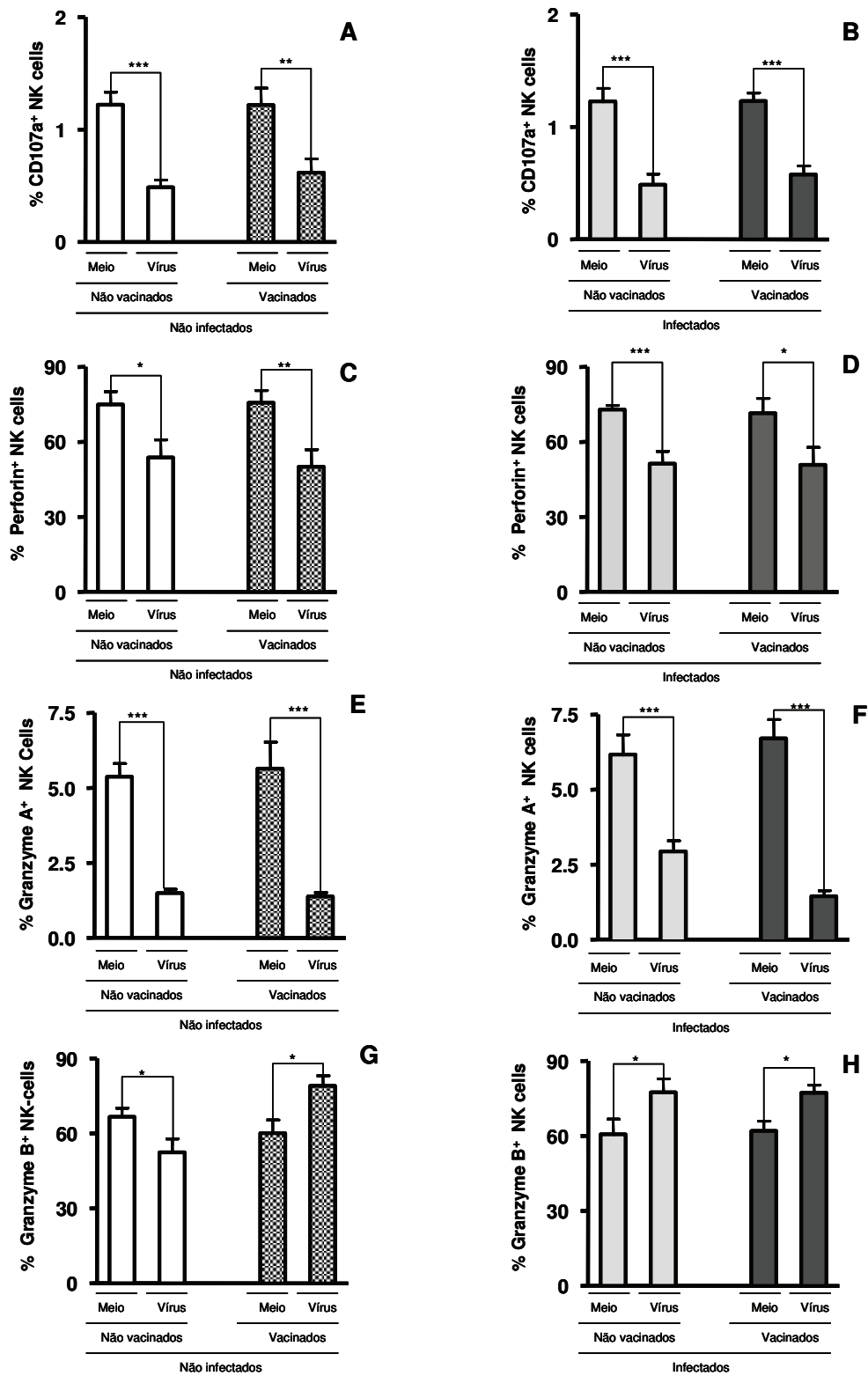


GRÁFICO 3: Expressão de CD107a, Perforina e Granzimas A e B em células Natural Killer de indivíduos infectados ou não pelo *Vaccinia virus*, antes e após estimulação *in vitro* com o vírus inativado. A, B) CD107a. C, D) Perforin. E, F) Granzyme A. G, H) Granzyme B expression. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e foram representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.3.3) *Análise de Células NK co-expressando CD94*

O Gráfico 4 mostra o percentual de Células NK co-expressando CD94, antes e após estimulação *in vitro* com o VACV inativado por luz UV. Quando avaliamos a expressão de CD94 (GRAF 4- A, B e C) podemos observar que de maneira semelhante aos resultados encontrados para os NCRs só houve aumento na expressão desse marcador nas culturas de indivíduos com exposição prévia ao VACV, ou seja, nos pacientes não infectados vacinados ($p=0,0433$), nos indivíduos infectados vacinados ($p<0,0001$) e não vacinados ($p<0,0001$), quando comparamos culturas controle (sem estímulo) e culturas estimuladas pelo VACV.

Além disso, analisando-se apenas as culturas estimuladas pelo VACV, pôde-se observar que houve aumento no percentual de células NK expressando CD94 nos indivíduos previamente expostos ao VACV, seja após vacinação ou infecção prévias, comparados aos indivíduos não infectados não vacinados.

Novamente, podemos notar que existe uma correlação entre a vacinação prévia contra a varíola e o estado de ativação da célula NK, após estímulo viral. Parece que a pré-exposição ao vírus confere um aumento de responsividade de células NK, visto que há aumento de moléculas envolvidas na ativação, como por exemplo, os NCRs, diferentemente dos indivíduos que nunca foram expostos ao vírus.

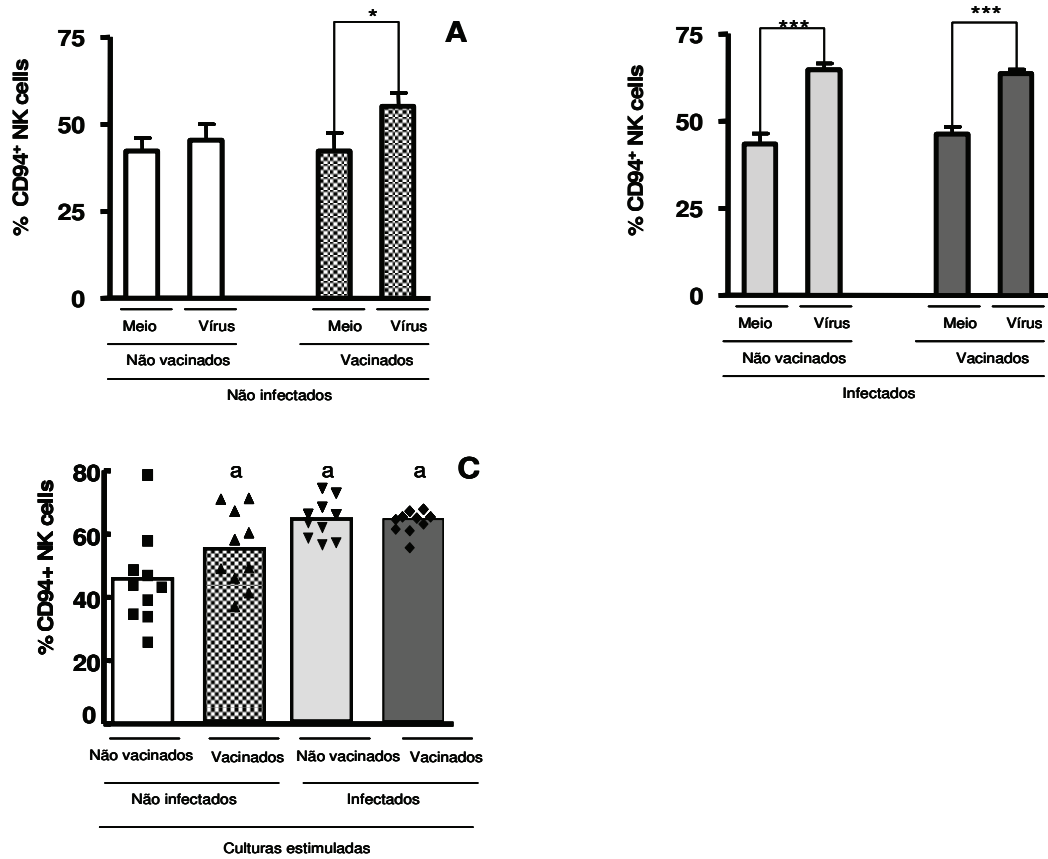


GRÁFICO 4: Expressão de CD94 em células Natural Killer de indivíduos infectados ou não pelo *Vaccinia virus*, antes e após estimulação *in vitro* com o vírus inativado. A, B) Expressão de CD94, antes e após estímulo viral. C) Expressão de CD94 em culturas estimuladas pelo VACV inativado. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e foram representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. a = significativamente maior que não infectado não vacinado. b = significativamente maior que não infectado vacinado.

4.3.4) Estudo do padrão de citocinas intracitoplasmáticas: expressão de IFN γ e TNF α por Células NK, antes e após estimulação *in vitro* com VACV

O Gráfico 5 mostra o percentual de Células NK co-expressando IFN- γ e TNF- α , antes e após estimulação *in vitro* com o VACV inativado por luz UV. Ao avaliarmos a expressão de IFN- γ (GRAF 5- A e B) nas culturas de células com estímulo antigênico de pacientes não infectados não vacinados, podemos observar que houve diminuição significativa ($p = 0,0147$) na expressão de IFN- γ em relação às culturas controle. Além disso, não observamos diferença significativa no percentual de células NK expressando IFN- γ nos grupos de indivíduos que já haviam sido previamente expostos ao VACV (previamente vacinados e previamente infectados), quando comparamos as culturas controle (sem estímulo) e culturas estimuladas pelo vírus.

Contudo, quando comparamos apenas as culturas estimuladas dos quatro grupos, foi observado que houve aumento do percentual de células NK co-expressando IFN- γ , apenas nos grupos com exposição prévia ao VACV, ou seja, nos indivíduos não infectados vacinados e nos indivíduos previamente infectados, quando comparados com indivíduos não infectados não vacinados (GRAF 5- E).

Em relação à expressão de TNF- α (GRAF 5- C, D e E) foi observado que houve aumento significativo da expressão dessa citocina apenas nas culturas de células com estímulo antigênico, comparadas às culturas controle, de pacientes previamente expostos ao VACV, ou seja, não infectados vacinados ($0,0005$), infectados não vacinados ($p=0,0003$) e infectados vacinados ($p=0,0021$).

Além disso, de modo semelhante ao resultado encontrado nos experimentos com o IFN- γ , pôde-se observar entre as culturas estimuladas que havia um maior percentual de células NK expressando IFN- γ nos indivíduos com exposição prévia ao VACV, comparados aos indivíduos não infectados não vacinados.

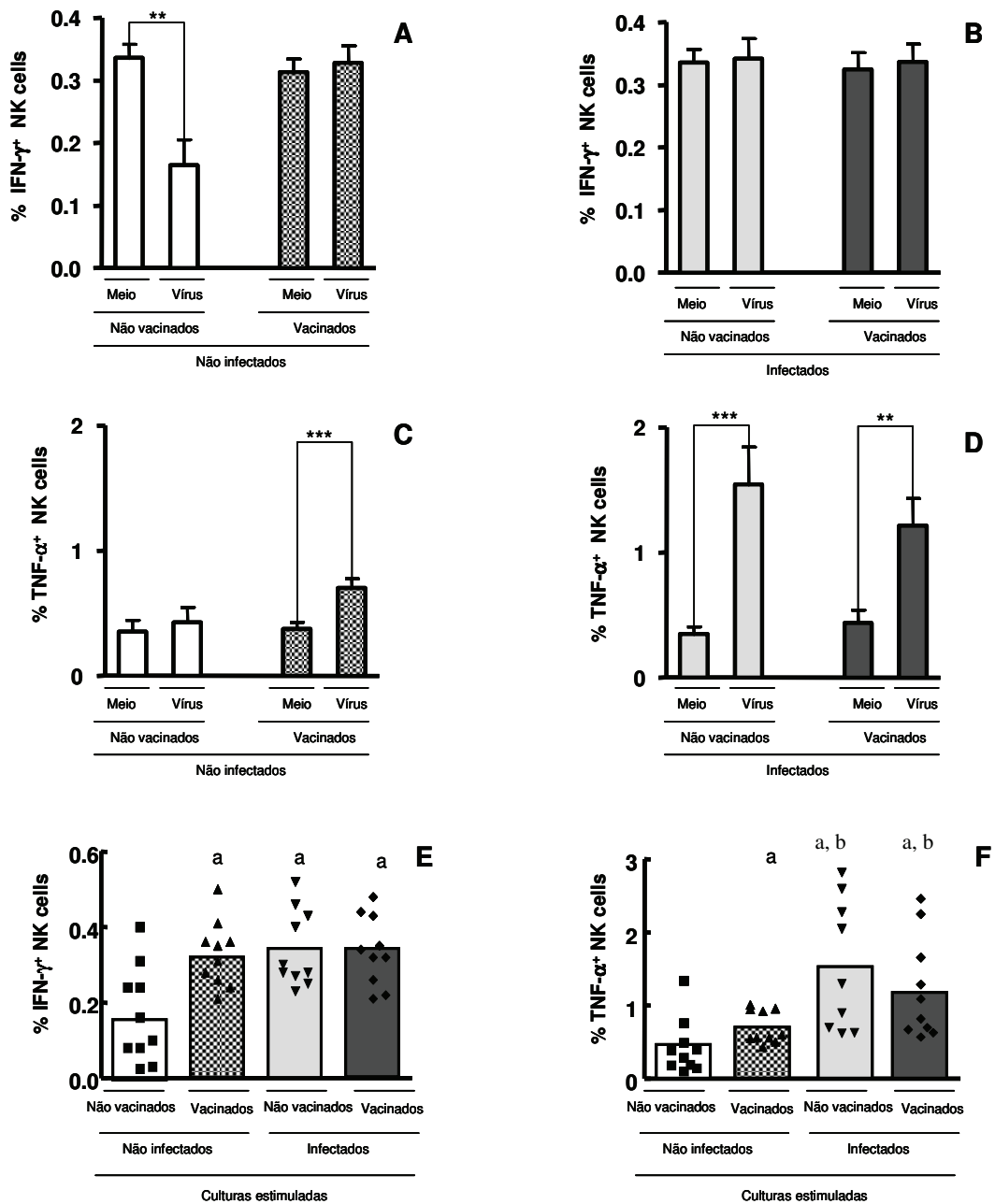


GRÁFICO 5: Expressão de IFN- γ e TNF- α em células Natural Killer de indivíduos infectados ou não pelo *Vaccinia virus*, antes e após estimulação *in vitro* com o vírus inativado. A, B) Expressão de IFN- γ , antes e após estímulo viral. C, D) Expressão de CD94, antes e após estímulo viral. E) Expressão de IFN- γ , em culturas estimuladas pelo VACV inativado. F) Expressão de TNF- α , em culturas estimuladas pelo VACV inativado. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e foram representadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. a = significativamente maior que não infectado não vacinado. b = significativamente maior que não infectado vacinado.

5) DISCUSSÃO

Dada à importância do VACV dentro do contexto de saúde pública e de sua ampla utilização na medicina preventiva existem vários estudos acerca da resposta imune do hospedeiro à infecção pelo VACV, sendo grande parte deles realizados em modelos animais demonstrando os mecanismos envolvidos na eliminação viral (VAN DE BROEK *et al.*, 2000; BELYAKOV *et al.*, 2003; GHERARDI *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2004; THOMPSON *et al.*, 2006; MARTINEZ *et al.*, 2008).

Considerando a infecção humana natural pelo VACV, são ainda escassos os estudos relacionados à resposta imune, principalmente quando se refere à resposta imune inata e a participação das células NK. A grande maioria desses estudos foi realizada em modelos murinos onde já foi descrita a importância das células NK na resposta protetora contra o VACV (CHISHOLM; REYBURN, 2006; PRLIC *et al.*, 2005; SMITH; KOTWAL, 2002; BUKOWSKI *et al.*, 1983; STITZ *et al.*, 1986). Além disso, já foi demonstrado também em modelos animais, que os receptores citotóxicos naturais (NCR) são importantes no reconhecimento das células alvo infectadas pelo VACV uma vez que a inativação destes bloqueia o reconhecimento e lise pelas células NK das células infectadas pelo VACV (CHISHOLM; REYBURN, 2006).

Recentemente, têm sido publicados inúmeros trabalhos demonstrando a ocorrência de surtos de VACV em vários estados do Brasil (DA FONSECA *et al.*, 2002; DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2007b; LEITE *et al.*, 2005; TRINDADE *et al.*, 2003; TRINDADE *et al.*, 2006; DONATELE *et al.*, 2007; MEDAGLIA *et al.*, 2009; SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009; MEGID *et al.*, 2008). Portanto, esses surtos representam uma grande oportunidade de se estudar a resposta imune contra esse vírus, não somente a resposta imune adaptativa, mas também a resposta imune inata.

Dentro desse contexto, esse trabalho traz uma contribuição para o estudo da resposta imune contra o VACV, uma vez que visa identificar os receptores de superfície e citocinas intracitoplasmáticas que estão expressos nas células NK, após uma estimulação *in vitro* de células de indivíduos que foram previamente expostos ao VACV seja pela infecção prévia ou pela vacinação contra a varíola, comparando os dados com aqueles de indivíduos que não têm

história de exposição prévia ao vírus, ou seja, indivíduos que não foram vacinados e não tiveram a infecção pelo VACV. O trabalho se deu após um surto ocorrido no estado de Minas Gerais, no ano de 2005, dando continuidade a um trabalho prévio realizado pelo nosso grupo no qual foi observado que o VACV parecia causar uma imunomodulação do sistema imune durante a infecção aguda em seres humanos, uma vez que foi demonstrado que tanto as células B, quanto as TCD4⁺ e monócitos/macrófagos estavam menos ativados nos indivíduos infectados quando comparados aos indivíduos não infectados. A porcentagem de células NK foi avaliada nesse estudo prévio, no entanto, não houve diferença significativa no percentual de células quando se comparou os indivíduos infectados e não infectados (GOMES *et al.*, 2012). Nesse trabalho prévio do nosso grupo não foram analisados os receptores das células NK, relacionados à ativação, inibição e degranulação celular.

As células NK estão entre os primeiros leucócitos a se tornarem ativadas após uma infecção viral e dessa forma iniciam a resposta imune antes mesmo que os linfócitos T e B estejam completamente prontos para atuarem como células efetoras (BIRON *et al.*, 1999; CERWENKA; LANIER, 2001). Dessa forma, foi observado que durante a infecção pelo VACV é necessária a ativação, proliferação e recrutamento das células NK para o sítio de infecção (BUKOWSKI *et al.*, 1983; DANIELS *et al.*, 2001; DOKUN *et al.*, 2001; NATUK; WELSH, 1987). Células infectadas pelo *Vaccinia virus* são marcadamente mais sensíveis à lise pela células NK que as células não infectadas (BARAZ *et al.*, 1999).

No entanto, os receptores das células NK envolvidos na resposta imune contra o VACV ainda não estão totalmente elucidados, necessitando de mais estudos acerca destes, tanto em indivíduos vacinados que foram ou não infectados pelo *Vaccinia virus* quanto de indivíduos não vacinados, infectados ou não.

Desse modo, nesse trabalho, 22 indivíduos previamente infectados pelo VACV, no ano de 2005, foram incluídos. Desses 22 indivíduos, 10 possuíam apenas história de infecção pelo VACV, enquanto os outros 12 possuíam história de infecção associada à vacinação prévia contra varíola. Os dados provenientes dos grupos desses indivíduos foram comparados com grupos controle que haviam sido vacinados (n=10) ou não (n=10) contra varíola, mas que não tinham história prévia de infecção pelo VACV.

Baseados nas correlações entre os dados coletados desses quatro grupos de voluntários, observam-se algumas diferenças significativas fenotípicas no perfil de células Natural Killer

induzidas pela infecção por VACV, pela vacinação contra varíola e pelos controles negativos (não infectados e não vacinados).

Nesse estudo não foi observado aumento significativo na porcentagem total de células NK e seus subtipos definidos pelas expressões dos marcadores CD56 e CD16 (CD56^{bright}CD16⁻, CD56^{bright}CD16^{dim}, CD56^{dim}CD16⁻, CD56^{dim}CD16⁺ e CD56⁻CD16⁺) em todos os grupos analisados, após estimulação com o VACV por 6 horas.

Um estudo prévio com modelo animal demonstrou que em apenas 6 horas após a infecção já é possível detectar um aumento significativo no número de células NK, no sítio de infecção. Portanto, nesse curto espaço de tempo já ocorre à mobilização de células NK para tentar conter a infecção no seu sítio (PRLIC; GIBBS; JAMESON, 2005). Os dados apresentados por Prlic e colaboradores (2005) não se assemelham aos resultados apresentados nesse estudo, uma vez que analisamos o percentual de células NK no sangue periférico dos indivíduos. Porém, no estudo de Prlic e colaboradores (2005) demonstrou-se que as células NK estavam presentes e ativadas no sítio primário de infecção pelo *Vaccinia virus* e, observaram que as células NK proliferavam-se pobremente nesse local, não sendo possível definir se o acúmulo dessas células no sítio de infecção ocorria devido à proliferação *in situ* ou à migração das células NK do sangue periférico para esse sítio (PRLIC; GIBBS; JAMESON, 2005).

Estudos prévios (DANIELS *et al.*, 2001; NATUK; WELSH, 1987) demonstraram que o número de células NK no sítio de infecção aumenta enormemente após 24 horas, com um pico no 3º dia, após a infecção. Possivelmente, o número de células NK circulantes no sangue seja então maior no 3º dia, após a infecção.

Nesse estudo foi observado que em relação às células do sangue periférico não houve diferença no percentual de células NK, quando se avaliaram as culturas controle (sem estímulo) e as culturas estimuladas com o VACV. Com esses dados, não é possível então inferir que existe um aumento das células NK circulantes após estímulo com VACV. Além disso, não observamos diferença no percentual de células NK do sangue periférico quando comparamos os indivíduos previamente infectados (vacinados ou não) com os indivíduos não infectados (vacinados ou não), após estimulação *in vitro* com o VACV.

Além da importância da migração e/ou proliferação da célula NK na resposta contra a infecção pelo VACV, uma outra característica das células NK é a lise eficiente de células alvo

que são deficientes ou que não possuem moléculas de HLA de classe I (MORETTA *et al.*, 1997; MORETTA *et al.*, 1992). Dessa forma, diferentes interações entre ligantes e receptores são provavelmente responsáveis pela ativação das células NK durante a interação com células alvo, sendo que em seres humanos já foram descritos receptores específicos para o HLA, dentre eles destacam-se os receptores constituídos pela interação de moléculas CD94 com moléculas da família NKG2 (MORETTA *et al.*, 1997; LOPEZ-BOTET *et al.*, 1997). Tal molécula, CD94, já foi descrita como importante na resistência contra a infecção pelo *Ectromelia virus* em camundongos B6 (FANG *et al.*, 2011).

Desse modo, nesse estudo avaliou-se a expressão de CD94 pelas células NK antes e após estimulação *in vitro* com o VACV, além de se comparar o percentual de células NK expressando tal molécula entre os indivíduos previamente infectados (vacinação ou não) com os indivíduos não infectados (vacinação ou não).

Os dados demonstraram que houve aumento no percentual de células NK expressando a molécula CD94, apenas nos grupos de indivíduos previamente expostos ao VACV, seja pela vacinação e/ou infecção prévias, quando comparamos as culturas controle (sem estímulo) e culturas estimuladas pelo VACV. Além disso, analisando-se apenas as culturas estimuladas pelo VACV, pôde-se observar que houve aumento no percentual de células NK expressando CD94 nos indivíduos previamente expostos ao VACV, seja após vacinação ou infecção prévias, comparados aos indivíduos não infectados não vacinados.

A partir dos nossos resultados não podemos inferir a função da molécula CD94, uma vez que o nosso trabalho foi apenas descritivo no qual não foram realizados ensaios funcionais. Contudo, estudos prévios já demonstraram que a molécula CD94 é importante no controle de outros patógenos. Dados encontrados em experimentos com camundongos infectados com *Ectromelia virus*, demonstraram que o receptor da molécula CD94 em células NK tem um papel essencial na resistência à infecção. Foi observado que camundongos deficientes em CD94, após a infecção por VACV apresentaram uma diminuição acentuada da resposta das células T CD8⁺, resultando como consequência, em um menor controle da infecção viral (FANG *et al.*, 2011; FANG *et al.*, 2010; FANG *et al.*, 2008).

Por outro lado já foi visto que a expressão do heterodímero CD94-NKG2A em células T CD8⁺ específicas ao poliovírus limita sua capacidade citolítica (MOSER *et al.*, 2002). Em infecções pelo *Vaccinia virus* em camundongos deficientes em CD94 foi demonstrado que

as células NK desenvolviam-se normalmente e realizavam de forma eficiente a lise de células alvo susceptíveis. Além disso, a ausência dos receptores de CD94 não alterava o controle das células contra os vírus (ORR *et al.*, 2010). Também foi visto que o tratamento com anticorpos monoclonais contra HLA de classe I levava a um discreto aumento na capacidade lítica das células NK tanto em relação às células não infectadas quanto às células alvo infectadas, mas isso não afetava a capacidade lítica específica contra as células infectadas pelo *Vaccinia virus* quando comparadas com a lise de fibroblastos não infectados (CHISHOLM; REYBURN, 2006).

Portanto, até o momento não está claramente definida a função da molécula CD94, sendo necessário o desenvolvimento de trabalhos, visando à determinação da funcionalidade desse marcador. Em nosso estudo, nós detectamos um aumento importante dessa molécula, quando foram avaliadas as culturas com e sem estímulo pelo VACV, sugerindo que há possivelmente uma correlação entre sua expressão e a função das células NK.

No entanto, sabe-se que a resposta das células NK não depende somente de um receptor, mas sim da associação entre vários ligantes e receptores que interagindo entre si vão proporcionar uma resposta imune efetiva. Dessa forma, diferentes interações entre ligantes e receptores são provavelmente responsáveis pela ativação das células NK durante a interação com células alvo. Um grupo importante de receptores relacionados à ativação das células NK são os receptores citotóxicos naturais (NCRs). Além disso, outras moléculas estão envolvidas nos processos de inibição e degranulação das células NK, como as moléculas CD161 e CD107a, respectivamente.

Dentre os NCRs, destaca-se o papel essencial dos receptores o NKp30, NKp44 e NKp46 no reconhecimento das células alvo infectadas pelo *Vaccinia virus* (CHISHOLM; REYBURN, 2006). A partir do conhecimento da importância dos marcadores de ativação das células NK, foi realizado em nosso estudo uma avaliação da expressão dos NCRs em células NK de indivíduos previamente infectados ou não pelo VACV, antes e após estimulação *in vitro* pelo VACV.

Assim, em nosso estudo, observamos um aumento no percentual de células NK expressando os marcadores NKp30 e NKp44 nas culturas células de indivíduos que já tiveram algum contato prévio com o vírus, seja por vacinação, seja pela própria infecção, quando culturas controle (sem estímulo) e culturas estimuladas pelo VACV foram comparadas. Além

disso, foi observada uma diminuição no percentual de células NK expressando NKp44, quando se comparou cultura controle (sem estímulo) e cultura estimulada no grupo de indivíduos não infectados não vacinados.

Ademais, análises das culturas, após estimulação viral demonstraram um aumento no percentual de células NK expressando NKp30 e NKp44, apenas nas culturas estimuladas de indivíduos previamente vacinados ou infectados, quando comparados a indivíduos não infectados não vacinados. Esses dados sugerem que tanto a vacinação prévia contra a varíola quanto uma infecção prévia pelo *Vaccinia virus* aumentam a eficácia da resposta das células NK, uma vez que os indivíduos não vacinados não infectados possuem menor percentual de células NK co-expressando receptores citotóxicos naturais.

Em relação ao NCR NKp46, pôde-se observar que houve aumento do percentual de células expressando essa molécula apenas nos grupos de indivíduos previamente infectados, ao analisar-se as culturas controle (sem estímulo) e culturas estimuladas pelo VACV. Nos grupos de indivíduos não infectados (vacinados ou não) não foi observado esse aumento ao se comparar culturas com e sem estímulo viral. No entanto, ao analisar-se a expressão dessa molécula pelas células NK em culturas estimuladas, observou-se que houve aumento do percentual dessas células em todos os indivíduos com exposição prévia ao VACV, tanto pela infecção quanto pela vacinação quando comparados aos indivíduos não vacinados não infectados.

Esses dados demonstram uma diferença no percentual de células NK expressando receptores citotóxicos naturais entre indivíduos previamente expostos ao VACV, ou seja, previamente infectados ou vacinados, comparados aos indivíduos não infectados não vacinados, após a estimulação *in vitro* com o VACV. Os motivos pelos quais houve esse aumento apenas nos grupos com exposição prévia ao VACV não podem ser esclarecidos no momento, mas sugere uma provável relação entre a vacinação e/ou infecções prévias com a posterior resposta imune pelas células NK. De alguma forma, tais indivíduos respondem de forma diferente daqueles que não tiveram contato prévio com o vírus.

Parece que uma hemaglutinina viral produzida pelo VACV é capaz de se ligar às moléculas de NKp30 e ao NKp46. A ligação da hemaglutinina à molécula NKp30 leva a uma diminuição da atividade lítica da célula NK. Porém, a ligação à molécula NKp46 parece estimular a citólise dirigida as células infectadas. Especula-se também uma participação da

hemaglutinina viral com a molécula NKp44, porém ela é um ligante fraco (JARAHIAN et al, 2001). Visto isso, podemos dizer que apesar da tentativa de aumento percentual de células NK expressando os NCRs, eles podem estar sendo modulados por ligantes virais.

Em nosso estudo foi demonstrado que existe um aumento percentual de células NKp30 e NKp44 em todos os grupos com exposição prévia ao VACV (previamente vacinados e infectados). A ligação ao NKp30 pode modular essa resposta em direção a uma diminuição de atividade lítica pela célula NK. Porém, já foi também demonstrado, em outro estudo, que o bloqueio do NKp30 é essencialmente danoso para resolução do processo infeccioso, levando a letalidade da infecção em modelos murinos (CHISHOLM; REYBURN, 2006). Podemos conjecturar, que apesar da hemaglutinina viral inibir o processo lítico de células NK, outros processos podem ser ativados, como a produção de interleucinas, fato ainda não estudado.

Porém, em relação á molécula NKp46 houve um aumento do percentual desta apenas nos grupos que foram previamente infectados pelo VACV, no grupo que fora apenas vacinado isso não ocorreu. Esse aumento percentual nos grupos que tiveram contato recente com o vírus pode refletir, então, numa maior prontidão de resposta ao VACV. Esse ocorrido pode ser uma das chaves de um dos acontecimentos que possam existir numa cooperação da resposta de memória de curto e longo prazo e a resposta inata das células NK.

A resposta imune contra os VACV é muito complexa, não existindo apenas um tipo celular e/ou molécula importantes para conter a infecção pelo VACV. Sabe-se que há uma interação entre as células NK, células T CD8⁺ (BECKER, 2003; BRAY, 2003; BRAY; WRIGHT, 2003; FREYSCHMIDT *et al.*, 2007), células T CD4⁺ (PUISSANT-LUBRANO *et al.*, 2010) e imunidade humoral (WORTHINGTON *et al.*, 2003).

Dentre as células NK, muitos receptores estão envolvidos na resposta imune contra o VACV, como já exposto. Portanto, nesse trabalho foi avaliada a expressão de outro receptor da célula NK importante na contenção da disseminação do VACV, a molécula CD161.

Assim a expressão da molécula CD161 pelas células NK foi avaliada e a partir da análise dos resultados acredita-se que exista um importante papel das células NKCD161⁺, na resposta imune contra o *Vaccinia virus*, uma vez que o percentual de células NK co-expressando esse marcador, considerado por alguns autores como marcador de ativação celular (LANIER 1998; AZZONI *et al.*, 1998) e por outros como molécula inibitória (ROSEN *et al.*, 2005; ALDEMIR *et al.*, 2005; GERMAIN *et al.*, 2011), está maior nos grupos de

pacientes que já foram expostos ao vírus, seja por meio somente da vacinação contra a varíola ou pela infecção viral em relação aos indivíduos não infectados não vacinados, analisando-se as culturas controle (sem estímulo) e as culturas estimuladas pelo VACV. Além disso, analisando apenas as culturas após estimulação viral, o percentual dessas células é maior nos grupos de indivíduos previamente infectados e vacinados comparados aos indivíduos não infectados não vacinados.

Considerando o papel dessa molécula como agente promotor da citotoxicidade das células NK (KONJEVIC *et al.*, 2009), poderíamos conjecturar que o aumento do percentual de células NK expressando CD161, estaria relacionado com uma maior efetividade da lise das células infectadas pelo *Vaccinia virus*. Por outro lado, caso a ação dessa molécula seja inibitória sobre a célula NK, o aumento desse marcador estaria relacionado com uma menor eficácia da lise das células alvo. No entanto, em nosso estudo não podemos inferir o papel ativador ou inibidor dessa molécula, uma vez que não foram realizados ensaios funcionais. São, portanto, necessários estudos de funcionalidade da célula NK para determinação da participação da molécula CD161, após infecção pelo VACV. Sabe-se que na literatura também não está claramente definida a função dessas células, como ativadora ou inibidora das células NK, como já exposto acima.

Dando continuidade ao estudo, após observar que os marcadores de ativação celular, os NCRs, estavam aumentados nos grupos de indivíduos previamente expostos ao *Vaccinia virus*, seja por infecção ou vacinação prévias, foi avaliada a expressão de uma importante molécula envolvida no processo de degranulação da célula NK. Para alcançar tal objetivo realizamos ensaios de citometria para avaliar o padrão de expressão da molécula CD107a, glicoproteína de superfície envolvida na degranulação celular. Assim, após interpretação dos resultados, pôde-se observar que a expressão desse marcador, CD107a, diminuiu significativamente nas culturas estimuladas com o *Vaccinia virus*, tanto dos indivíduos não infectados não vacinados quanto de indivíduos não infectados vacinados e nos previamente infectados. A partir da interpretação desses dados alguns questionamentos foram levantados: a diminuição na expressão dessa molécula envolvida no processo de degranulação celular seria uma estratégia de evasão utilizada pelo *Vaccinia virus*, para evitar a exocitose de vesículas citotóxicas, contendo perforina, Granzima A e/ou Granzima B, presentes nas células NK? Esse seria um mecanismo imunomodulatório utilizado pelo vírus?

A regulação pelos *Poxvirus* de moléculas de superfície importantes na resposta imune contra esses vírus já foi descrita, como por exemplo a supressão da molécula CD4 (BARRY *et al.*, 1995). Portanto, a diminuição da expressão da molécula CD107a pelas células em todas as culturas, após a estimulação pelo VACV, encontrada nesse estudo pode representar um mecanismo de evasão imune utilizado pelos VACV que reduz a eficácia da citotoxicidade das células NK, uma vez que tal molécula está associada ao processo de degranulação das vesículas contendo granzimas e perforinas.

Após ser observado que as células NK expressando a molécula CD107a estavam diminuídas em todos os grupos analisados, após a estimulação viral, foi realizada a análise das enzimas perforina, granzima A e granzima B. Nossos resultados demonstram que houve uma diminuição do percentual de células NK expressando Perforina e Granzima A, em todos os grupos analisados, quando foram comparadas as culturas controle (sem estímulo) e as culturas estimuladas pelo VACV. A partir da análise dos dados, acreditamos que essa diminuição do percentual de células NK expressando CD107a, Perforina e Granzima A, após estimulação *in vitro* pelo VACV, observada nesse estudo, possa ser uma forma de imunomodulação mediada pelo *Vaccinia virus*.

A participação dessas enzimas na resposta contra os *Poxvirus* ainda não é bem determinada, sendo por vezes contraditória, ao analisarmos a literatura existente sobre o assunto. Existe um estudo prévio no qual experimentos em modelos murinos sugeriram que a citólise mediada pela perforina não era importante para a resistência ao *Vaccinia virus*, ao vírus da estomatite vesicular e ao vírus Semiliki Forest (KAGI *et al.*, 1995).

No entanto, outro estudo prévio, com camundongos, demonstrou que a citólise dependente de perforina era importante na resistência contra infecções líticas pelo *Ectromelia virus* (EV) que é altamente virulento. Além disso, observou-se que camundongos que não possuíam Perforinas eram incapazes de controlar a infecção pelo EV, sugerindo um importante papel dessas enzimas na resposta imune contra os *Poxvirus* (MULLBACHER *et al.*, 1999).

Em relação à granzima A, um trabalho prévio identificou importância dessa enzima na resposta imune contra os *Poxivirs*, uma vez que demonstrou que ocorre a perda de resistência ao *Ectromelia virus* em camundongos deficientes em Granzima A, Granzima B, ou Granzima A e Granzima B, concomitantemente. Esses estudos demonstraram ainda que camundongos

que não possuíam Perforinas ou Granzimas eram incapazes de controlar a infecção pelo EV, demonstrando uma importante participação dessas enzimas na resposta imune contra os *Poxvirus* (MULLBACHER *et al.*, 1996).

Desse modo, a diminuição da expressão de Perforina e Granzima A observada em nosso estudo, quando foram comparadas as culturas controles e as culturas estimuladas pelo VACV, pode representar uma diminuição da eficácia da resposta imune das células NK ao VACV.

Outra enzima analisada em nosso estudo e já descrita como importante na resistência imune aos *Poxvirus* é Granzima B que também foi avaliada nesse estudo. Em relação à expressão de Granzima B pelas células NK, foram encontrados resultados diferentes daqueles encontrados para perforina e granzima A, uma vez que foi detectado que houve um aumento do percentual das células NK expressando Granzima B nos indivíduos que já tinham sido expostos previamente ao vírus, seja por vacinação ou infecção prévias, ao serem comparadas as culturas controle (sem estímulo) e as culturas estimuladas pelo VACV. Já no grupo que nunca foi exposto ao VACV (não infectados não vacinados) foi observada uma diminuição do percentual de células NK expressando Granzima B quando se compararam culturas com e sem estímulo antigênico.

A participação da Granzima B na resistência ao Ectromelia virus já foi comentada anteriormente, como demonstrado no estudo de Mullbacher e colaboradores (1996). A expressão dessas enzimas parece depender do tipo celular envolvido, do modelo utilizado e do tempo decorrido, após a exposição inicial aos vírus. Tal observação pode ser demonstrada pelo fato pelo fato de que, em ensaios com células T CD8 de seres humanos, Rock e colaboradores (2005), observaram resultados diferentes aos descritos em nosso estudo. Os autores, a partir de experimentos realizados com células T CD8 de pacientes vacinados contra a varíola, um mês após a vacinação, observaram que os indivíduos vacinados desenvolviam células TCD8⁺ com fenótipo efetor, expressando tanto Granzima A quanto Granzima B. Porém, um ano após a vacinação foi observada uma diminuição das células TCD8⁺ expressando Granzima B. (ROCK *et al.*, 2005).

Esses estudos com células T CD8 diferem dos resultados encontrados em nosso estudo, uma vez que em nosso estudo todos os indivíduos previamente expostos ao VACV, tinham mais de um ano de exposição ao vírus, seja pela vacinação e/ou pela infecção. E, no entanto,

ao invés de haver diminuição, houve aumento do percentual de células NK expressando Granzima B, nas culturas estimuladas *in vitro* pelo *Vaccinia virus*. Já no grupo de pacientes nunca expostos ao VACV, ou seja, não infectados não vacinados, houve diminuição do percentual de células NK expressando Granzima B nas culturas com estímulo antigênico. Nossos resultados sugerem mecanismos diferentes de regulação dessa enzima nas diferentes populações celulares do sistema imune. Vale ressaltar que no estudo de Rock e colaboradores (2005) foram avaliadas células TCD8⁺ e nosso estudo teve como foco as células NK.

Além de avaliarmos marcadores de ativação, de inibição, de degranulação e enzimas citotóxicas, analisamos também o papel das citocinas produzidas pelas células NK, como o IFN- γ e o TNF- α . Após análise dos resultados, foi observado que houve uma diminuição do percentual de células NK produtoras de IFN- γ nas culturas de indivíduos não vacinados, após estímulo antigênico quando comparadas às cultura controle. Além disso, ao serem analisadas as culturas estimuladas pelo VACV, foi observado que houve um aumento do percentual de células NK expressando IFN- γ nos grupos de indivíduos com exposição prévia ao VACV, ou seja, nos indivíduos vacinados e nos indivíduos previamente infectados, quando comparados aos indivíduos não infectados não vacinados.

O papel dos IFN já está bem estabelecido (READING; SMITH, 2003) como já previamente exposto na introdução desse trabalho, sendo que Puissant-Lubrano e colaboradores (2010) observaram que a frequência de células produtoras de IFN- γ específicas para o *Vaccinia virus* foi significativamente maior em indivíduos previamente vacinados que nos indivíduos saudáveis não vacinados. O IFN- γ tem um papel crítico em limitar as infecções por *Poxvirus*, demonstrado a partir de experimentos nos quais a administração de IFN- γ em camundongos infectados com *Ectromelia virus* ou *Vaccinia virus* aumentava a resistência contra esses vírus e limitava a infecção (HARRIS; BULLER; KARUPIAH G, 1995; KARUPIAH *et al.*, 1993; MELKOV'A; ESTEBAN 1994; KARUPIAH; BLANDEN; RAMSHAW, 1990; KOHONEN-CORISH *et al.*, 1990).

Em um trabalho prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa, com esses mesmos grupos de indivíduos, foi detectada um maior expressão de IFN- γ em células T CD4⁺ em indivíduos previamente infectados (vacinados ou não) pelo *Vaccinia virus*, quando comparados com indivíduos não infectados (vacinados ou não), após estimulação *in vitro* com

o VACV. Além disso, foi observado um aumento significativo no percentual de células T CD4⁺ expressando IFN- γ dos indivíduos que já tinham contato prévio com o vírus, isto é, indivíduos previamente infectados (vacinados ou não) e indivíduos não infectados vacinados, ao se comparar as culturas controle e estimuladas pelo VACV (MEDEIROS-SILVA *et al.*, 2013). Os dados de tais autores mostram a participação do sistema imune adaptativo no controle da infecção pelo VACV, demonstrando que, na verdade, existe uma intensa interação entre esse sistema e o sistema imune inato.

Além disso, um outro estudo prévio realizado pelo nosso grupo durante a infecção aguda pelo VACV ocorrida no surto de 2005, pôde-se observar, nas culturas de sobrenadante de PBMC's, obtidas dos indivíduos infectados ou não, que os níveis de IFN- γ produzidos após estimulação antigênica pelo VACV foi maior no grupo de indivíduos infectados, comparados aos indivíduos não infectados ($p < 0,001$) (GOMES *et al.*, 2012). Essa detecção de citocinas parece variar de acordo com o método utilizado, com o modelo avaliado, e com a resposta imune do indivíduo, uma vez que também já foi observado em outro grupo de pesquisa que, em um indivíduo com infecção aguda pelo VACV foram observados níveis diminuídos de IFN- γ nesse indivíduo comparado a controles não infectados (TRINDADE *et al.*, 2009). No estudo de Trindade e colaboradores (2009) foi realizada a análise de citocinas do sobrenadante de culturas de PBMCs, após estimulação antigênica. Já em nosso estudo realizamos a análise de citocinas intracitoplasmática, sendo observados resultados diferentes. Já no estudo de Gomes e colaboradores (2012) foi realizada a análise de citocinas do sobrenadante de culturas de PBMCs e observados resultados semelhantes nos quais os indivíduos previamente infectados apresentavam maior percentual de células T expressando IFN- γ quando comparados com indivíduos não infectados, após estimulação *in vitro* com o VACV.

Uma possível explicação para a não detecção de IFN- γ pode estar relacionada aos mecanismos de evasão da resposta imune apresentados pelo *Vaccinia virus*. Já foi demonstrado em estudos anteriores (ALCAMI; SMITH, 1995; ALCAMI; SMITH, 1996) que os *OrthoPoxvirus*, dentre eles o *Vaccinia virus*, produzem receptores solúveis contra os interferons do tipo 1 (IFN- α e IFN- β) e do tipo 2 (IFN- γ), denominados vIFN- α R, vIFN- β R e vIFN- γ R, respectivamente. Também foi demonstrado que o vIFN- γ R bloqueia eficientemente a ligação do IFN- γ nos receptores celulares, inibindo as funções imunes e anti-virais dessa

citocina, sendo esse receptor altamente conservado entre os membros da família *Poxvirus* (ALCAMI; SMITH, 1995; ALCAMI; SMITH, 1996; ALCAMI; SMITH, 2002). Estes homólogos apresentam similaridade com receptores celulares e são secretados para o meio extracelular onde se ligam aos interferons, impedindo que estes se liguem em seus receptores celulares e desencadeiem a resposta antiviral (ALCAMI; SMITH, 1996). Vírus deletados para estes genes mostram atenuação da virulência em vários modelos animais (SEET *et al.*, 2003).

Além dos homólogos de receptores de IFN's, os *Poxvirus* também possuem outros homólogos, como os de receptores para o TNF (SEET *et al.*, 2003). Portanto, nesse estudo avaliamos também a expressão de TNF- α já que este é importante no combate ao vírus.

Em relação à expressão de TNF- α , foi observado nesse estudo um aumento do percentual de células NK expressando essa citocina nos grupos de indivíduos previamente expostos ao VACV, infectados (vacinados ou não) e não infectados vacinados, quando foram comparadas as culturas controle (sem estímulo) e as culturas estimuladas pelo VACV. Além disso, de modo semelhante ao resultado encontrado nos experimentos com o IFN- γ , pôde-se observar entre as culturas estimuladas que havia um maior percentual de células NK expressando TNF- α nos indivíduos com exposição prévia ao VACV, comparados aos indivíduos não infectados não vacinados.

O papel do TNF- α na proteção contra o VACV já foi explorado e foi demonstrado que a vacinação contra a varíola induz a expressão de TNF- α pelas células T CD4 de memória (PUISSANT-LUBRANO *et al.*, 2010; HAMMARLUND *et al.*, 2003; HAMMARLUND *et al.*, 2010). Embora nosso estudo tenha analisado a população de células NK, é importante notar que a população de células NK expressando TNF- α está aumentada nos grupos de indivíduos que já tiveram contato com o *Vaccinia virus*, por vacinação ou infecção, mas não nos indivíduos não expostos previamente.

Em um trabalho prévio realizado pelo nosso grupo com esses mesmos indivíduos observou-se que os indivíduos previamente expostos ao VACV, seja pela vacinação prévia ou pela infecção recente apresentavam maior percentual de células T CD4⁺ e CD8⁺ expressando TNF- α , quando comparados com indivíduos não infectados não vacinados, após estímulo *in vitro* com o VACV (MEDEIROS-SILVA *et al.*, 2013). Novamente pode-se notar a

participação do sistema imune adaptativo na produção de citocinas importantes na proteção anti-viral.

Sabe-se que o TNF- α é uma potente citocina pró-inflamatória secretada por células NK. O TNF- α atua na resposta imune através da promoção de um estado anti-viral e mediando a lise das células infectadas. Os *Poxvirus*, para interferir na via do TNF- α , codificam homólogos do receptor de TNF (TNFR), denominados vTNFR que se ligam e seqüestram o TNF extracelular, impedindo a ligação deste ao receptor de TNF celular (cTNFR) (SEET *et al.*, 2003).

A produção de tais homólogos que modulam o TNF- α está provavelmente relacionada à função desta citocina na resposta contra o VACV, uma vez que já foi demonstrado em estudo anterior que em resposta à infecção pelo *Vaccinia virus*, a maior parte das células produtoras de citocinas, produzem apenas TNF- α (52% a 95%) dependendo do método utilizado e do clone de linfócito (JUDKOWSKI *et al.*, 2011).

Os achados desse estudo conjuntamente com aqueles encontrados por Medeiros-Silva e colaboradores (2013) sugerem que tais indivíduos (previamente infectados ou vacinados), em uma segunda exposição, produzem rapidamente citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ , pelas células de memória e também pelas células NK. Estas citocinas são capazes de modular a resposta à infecção pelo *Vaccinia virus*. A participação dessas citocinas, das células do sistema imune inato, principalmente as células NK ativadas e das células T CD4⁺ e CD8⁺, constituiriam um ambiente anti-viral capaz de controlar a infecção pelo VACV.

Por fim, resumando os resultados encontrados nesse trabalho podemos notar que quando analisamos as diferentes subpopulações de células NK, expressando NKp30, NKp46, CD94, CD161 e TNF- α , comparando-se as culturas controle (sem estímulo) e as culturas estimuladas pelo VACV, não há diferença no percentual de células NK expressando esses marcadores no grupo de indivíduos não expostos previamente ao VACV, ou seja, não vacinados não infectados. De maneira diferente quando se comparou culturas controle e estimuladas dos grupos de indivíduos com exposição prévia ao vírus, seja por vacinação e/ou infecção, foi detectado um aumento do percentual de células NK positivas para tais marcadores, nas culturas com estímulo. Por outro lado quando avaliamos as subpopulações de células NK co-expressando NKp44, Granzima B e IFN- γ detectamos uma diminuição na

porcentagem dessas subpopulações celulares, nas culturas com estímulo viral comparadas às culturas sem estímulo, apenas no grupo de indivíduos não infectados não vacinados quando comparados com indivíduos previamente vacinados ou infectados.

Esses dados demonstram uma marcada diferença no fenótipo das células NK quando comparamos culturas com e sem estímulo de indivíduos não expostos com indivíduos previamente expostos ao VACV. Poderia ser questionado se a exposição prévia ao VACV confere algum tipo de memória das células NK, comportamento só observado para os linfócitos T e B? Ou, mais provável, uma cooperação entre estes linfócitos a célula NK?

Esse trabalho mostrou que quando se compararam apenas as culturas com estímulo dos grupos de indivíduos que foram naturalmente infectados pelo VACV ou previamente vacinados contra a varíola houve um aumento da porcentagem de células NK expressando NKp30, NKp44, CD94, CD161, Granzima B, INF- γ e TNF- α em relação ao grupo não exposto previamente, ou seja não vacinados não infectados.

Também foi visto que em todos os grupos de indivíduos ocorreram diminuições no percentual de células NK expressando os marcadores CD107a, Perforina e Granzima A, ..quando comparadas populações estimuladas a culturas controle (sem estímulo);

Além disso, também foi observado, dentre as culturas estimuladas, que houve aumento das subpopulações de células NK expressando NKp46, CD161 e TNF- α nos grupos que tiveram a infecção natural pelo *Vaccinia virus* quando comparados com os indivíduos previamente vacinados, mas que não tiveram a infecção. Destaque para o NKp46, o único marcador aonde não ocorreu aumento nem entre o grupo vacinado/não infectado e o grupo não vacinado/não infectado.

Portanto, esses dados demonstram que a célula NK comporta-se de maneira diferente nos grupos que já tiveram uma infecção prévia pelo VACV. Parece que a infecção natural pelo VACV estimula vias de ativação das células NK diferentes das vias ativadas após a vacinação somente. Podendo, estes marcadores ser parte de sistemas cooperativos diferentes de memória de curto e longo prazo entre linfócitos e células NK.

Ademais, observamos que dentre os indivíduos que sofreram a infecção natural pelo VACV, o grupo de indivíduos vacinados apresentou sintomas mais brandos provavelmente associados ao fato da vacinação. Além de apresentarem sintomas diferentes daqueles

indivíduos que contraíram a doença, mas que não haviam sido vacinados, observamos diferentes fenótipos das células NK entre esses indivíduos demonstrando que a vacinação prévia pode levar a uma maior eficácia na resposta mediada pelas células NK, numa exposição subsequente ao VACV. Sendo assim, a vacinação repercute nas primeiras 6 horas em uma diferença de porcentagem de células NK que expressam CD161, NKp46 e TNF- α , o que poderia estar envolvido a progressão do processo infeccioso na população apesar de ser vacinada, porém com o abrandamento sintomático.

Esse trabalho sugere que células NK podem interagir intensamente com o sistema de memória das células T para responder de forma mais eficiente numa exposição secundária ao VACV. Isso, pois, os achados desse estudo conjuntamente com aqueles encontrados por Medeiros-Silva e colaboradores (2013) sugerem que estes indivíduos (previamente infectados ou vacinados) são capazes de produzir de maneira mais rápida as citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ , tanto pelas células T de memória como pelas células NK, em uma segunda exposição. Como consequência tais indivíduos previamente vacinados que adquiriram a infecção pelo VACV apresentaram manifestações clínicas mais brandas comparados aos indivíduos que se infectaram pelo VACV, mas que não eram previamente vacinados contra a varíola. Essa talvez seja a possível explicação ao fato de tais indivíduos apresentarem uma forma mais branda da infecção pelo VACV. Os mesmos possuem células T de memória efectoras e também células NK capazes de responder prontamente ao antígeno, produzindo TNF- α e IFN- γ , numa reexposição ao VACV.

Já foi observado em nossos estudos prévios que alguns indivíduos vacinados contra a varíola foram infectados pelo *Vaccinia virus*, vindo a desenvolver a doença. Porém, há também aqueles indivíduos vacinados contra a varíola e que foram expostos ao *Vaccinia virus* durante os surtos de varíola bovina, mas que, no entanto, não adoeceram (MEDEIROS-SILVA *et al.*, 2013).

Especula-se que a imunização com a vacina contra a varíola gera células T de memória que são apropriadamente reativas contra uma subsequente exposição ao *Vaccinia virus*, porém essas células podem ou não gerar proteção contra a aquisição da infecção, após uma reexposição ao VACV., no entanto, os sintomas apresentados pelos indivíduos

previamente vacinados e que adquiriram a infecção são mais brandos que aqueles entre os indivíduos não vacinados (MEDEIROS-SILVA *et al.*, 2013).

Tal proteção parcial já foi proposta em um estudo realizado por Karem e cols. (2007), nos EUA, após um surto de Monkeypox ocorrido nesse país. Tal estudo demonstrou que a vacinação prévia contra varíola fornecia apenas uma proteção parcial contra outros *Poxvirus*, uma vez que já foram observadas reduções na gravidade da infecção. Karem e cols. (2007) correlacionam essa ausência de proteção completa induzida pela vacina contra o *Monkeypox virus* ao longo intervalo de tempo ocorrido entre a vacinação e a ocorrência da infecção, visto que o surto, ocorrido nos EUA, por Monkeypox, aconteceu 33 anos após cessarem as campanhas de vacinação. Tal fato é extremamente semelhante aos surtos de infecção pelo VACV que ocorreram no Brasil, em 2005; visto que as campanhas de vacinação em nosso país se encerraram há mais de 30 anos.

Estudos realizados com infecções pelo *Monkeypox virus* determinaram um padrão semelhante de sintomatologia pela infecção pelo MPXV, aonde indivíduos vacinados contra varíola tiveram a infecção por este vírus, porém esta ocorreu com uma clínica mais branda em comparação a infecção em indivíduos não vacinados (HEYMANN; SZCZENIOWSKI; ESTEVES, 1998). Outro estudo realizado na África Central, na década de 90, demonstrou um aumento na incidência de infecção pelo *Monkeypox virus* associado a uma diminuição na proteção proveniente da vacinação, devido ao aumento no intervalo de tempo entre a vacinação e a ocorrência dos surtos infecciosos (HUTIN *et al.*; 2001).

Finalizando, nossos resultados fornecem informações acerca da importância de certos componentes do sistema imune inato numa re-exposição contra o VACV, mas é necessária continuidade de estudos que visem avaliar os mecanismos envolvidos na ativação, degranulação e inibição das células NK para maior entendimento da funcionalidade dessas células diante da infecção natural causada pelo *Vaccinia virus* humano.

6) CONCLUSÃO

6) CONCLUSÃO

Retomando a hipóteses propostas, em segunda exposição ao VACV, podemos dizer que além da participação das células T e B de memória existe, no controle da infecção, também, uma co-participação importante das células NK na modulação da resposta imune contra o vírus, sendo que as células NK desempenham papel fundamental no *clearance* viral. Além disso, em alguns achados fenotípicos percentuais da célula NK após estímulo viral, a infecção prévia pelo VACV teve um comportamento diferente de somente a vacinação prévia.

Tais considerações se fundamentam nos parâmetros descritos abaixo:

- A vacinação contra a varíola não impediu a infecção pelo VACV, porém permitiu uma infecção mais branda da doença;

- Não foi observado aumento significativo na porcentagem total de células NK e seus subtipos definidos pelas expressões dos marcadores CD56 e CD16 (CD56^{bright}CD16⁻, CD56^{bright}CD16^{dim}, CD56^{dim}CD16⁻, CD56^{dim}CD16⁺ e CD56⁻CD16⁺) entre grupos estimulados e controle;

- Somente no grupo de indivíduos não expostos previamente ao VACV, ou seja, não vacinados não infectados, não ocorreram diferenças no percentual de células NK expressando os marcadores NKp30, NKp46, CD94, CD161 e TNF- α , quando comparadas populações estimuladas a culturas controle (sem estímulo);

- Somente no grupo de indivíduos não expostos previamente ao VACV, ou seja, não vacinados não infectados, ocorreram diminuição no percentual de células NK expressando os marcadores NKp44, Granzima B e IFN- γ , quando comparadas populações estimuladas a culturas controle (sem estímulo);

- No grupo de indivíduos expostos previamente ao VACV, ou seja, por vacinação ou infecção, ocorreram aumento no percentual de células NK expressando os marcadores NKp30, NKp44, CD94, CD161, Granzima B e TNF- α , quando comparadas populações estimuladas a culturas controle (sem estímulo);

- Em todos os grupos de indivíduos ocorreram diminuições no percentual de células NK expressando os marcadores CD107a, Perforina e Granzima A, quando comparadas populações estimuladas a culturas controle (sem estímulo);

- Quando se compararam apenas as culturas com estímulo dos grupos de indivíduos que foram naturalmente infectados pelo VACV ou previamente vacinados contra a varíola houve um aumento da porcentagem de células NK expressando NKp30, NKp44, CD94, CD161, Granzima B, INF- γ e TNF- α em relação ao grupo não exposto previamente, ou seja não vacinados não infectados.

- Também foi observado, dentre as culturas estimuladas, que houve aumento das sub-populações de células NK expressando NKp46, CD161 e TNF- α nos grupos que tiveram a infecção natural pelo *Vaccinia virus* quando comparados com os indivíduos previamente vacinados, mas que não tiveram a infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO JS. Transmissão de Vaccinia virus em modelo murino: eliminação e resistência das partículas virais, **Dissertação de Mestrado**, 2008.

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

ALCAMI A; SMITH GL. Vaccinia, cowpox and camelpox viruses encode soluble gamma interferon receptors with novel broad species specificity. **J. Virol.**, v. 69, p. 4633–39, 1995.

ALCAMI, A.; SMITH, G. L. Cytokine receptors encoded by *Poxviruses*: a lesson in cytokine biology. **Immun. Today**, v. 16, n. 10, p. 474–478, 1995.

ALCAMI, A.; SMITH, G. L. Soluble interferon-gamma receptors encoded by *Poxviruses*. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.**, v. 19, n. 4, p. 305–17, set. 1996.

ALCAMI A; KOSZINOWSKI UH. Viral mechanisms of immune evasion. **Trends Microbiol.**, v. 8, p. 410–418, 2000.

ALCAMI, A.; SMITH, G. L. The *Vaccinia virus* soluble interferon-gamma receptor is a homodimer. **J Gen Virol.**, v. 83, pt. 3, p. 545–9, mar. 2002.

ALCAMI, A. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. **Nat Rev Immunol**, v. 3, p. 36–50, 2003.

ALDEMIR H, PROD'HOMME V, DUMAURIER MJ, RETIERE C, POUPON G, et al. Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor. **J Immunol.**, v. 175(12), p. 7791–5, 2005.

ALTER, G.; MALENFANT, J. M.; ALTFELD, M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. **J Immunol Methods.**, v. 294, p. 1–2, p. 15–22, nov. 2004.

AMANNA, I. J.; SLIFKA, M. K.; CROTTY, S. Immunity and immunological memory following smallpox vaccination. **Immunological Reviews**, v. 211, p. 320-337, 2006.

AMARA, R. R. *et al.* Long-lived poxvirus immunity, robust CD4 help, and better persistence of CD4 than CD8 T cells. **J Virol.**, v. 78, n. 8, p.3811–3816, 2004.

ANDRE, P. *et al.* Modification of P-selectin glycoprotein ligand-1 with a natural killer cell-restricted sulfated lactosamine creates an alternate ligand for L-selectin. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 97, p. 3400-3405, 2000.

ARAVINDARAM K, YANG NS. Gene gun delivery systems for cancer vaccine approaches. **Methods Mol Biol.**, v.542, n.8, p. 167-78.

ASSIS FL, BORGES IA, FERREIRA PC, BONJARDIM CA, TRINDADE GDE S, LOBATO ZI, GUEDES MI, MESQUITA V, KROON EG, ABRAHÃO JS. Group 2 vaccinia virus, Brazil. **Emerg Infect Dis.**, v.18, n.12, p.2035-8, 2012.

AZZONI L, ZATSEPINA O, ABEBE B *et al.* Differential transcriptional regulation of CD161 and a novel gene, 197/15a, by IL-2, IL-15, and IL-12 in NK and T cells. **J Immunol.**, v.161, p.3493–3500, 1998.

BANCROFT, G. J. The role of natural killer cells in innate resistance to infection. **Curr Opin Immunol.**, v. 5, p. 503-510, 1993.

BARAZ, L., E. KHAZANOV, R. CONDIOTTI, M. KOTLER, and A. NAGLER. Natural killer (NK) cells prevent virus production in cell culture. **Bone Marrow Transplant.** 1999; 24:179–189.

BARBALAT R, LAU L, LOCKSLEY RM, BARTON GM. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. **Nat Immunol.**, v.10, n.11, p.1200-7, 2009.

BATISTA VH, SCREMIN J, AGUIAR LM, SCHATZMAYR HG. Vulvar infection and possible human-to-human transmission of bovine poxvirus disease. **Virus Reviews & Research**, v.14, n.1, p.1-10, 2009.

BAXBY, D. *et al.* Ecology of the *Orthopoxviruses* and use of recombinant vaccinia vaccines. **Lancet**, p. 850-851, 1986.

BECKER Y. Vaccinia virus pathogenicity in atopic dermatitis is caused by allergen-induced immune response that prevents the antiviral cellular and humoral immunity. **Virus Genes.**, v. 27(3), p. 269- 82, 2003.

BECKER MN, OBRAZTSOVA M, KERN ER, QUENELLE DC, KEITH KA, PRICHARD MN, LUO M, MOYER RW. Isolation and characterization of cidofovir resistant vaccinia viruses. **Virol J.**, v.5, p.58, 2008.

BENNETT M, BAXBY D. Cowpox. **J Med Microbiol.**, v.45, n.3, p.157-8, 1996.

BELYAKOV IM, EARL P, DZUTSEV A, KUZNETSOV VA, LEMON M, WYATT LS, SNYDER JT, AHLERS JD, FRANCHINI G, MOSS B, BERZOFKY JA. **Proc Natl Acad Sci**, v. 100(16), p. 9458-63, 2003.

BERG SF, DISSEN E, WESTGAARD IH, FOSSUM S Two genes in the rat homologous to human NKG2. **Eur J Immunol**, v. 28, p. 444–450, 1998.

BERNARDES-TERZIAN AC, DE-MORAES-BRONZONI RV, DRUMOND BP, DA SILVA-NUNES M, DA-SILVA NS, URBANO-FERREIRA M ET AL Sporadic oropouche virus infection, Acre, Brazil. **Emerg Infect Dis.**, v.15, p.348–350, 2009.

BIRON, C. A. *et al.* Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. **Annu Rev Immunol.**, v. 17, p. 189-220,1999.

BOOMKER JM, DE LEIJ LF, THE TH, HARMSSEN MC. Viral chemokine-modulatory proteins: tools and targets. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.16, n.1, p.91-103, 2005.

BORREGO F, ULBRECHT M, WEISS EH, COLIGAN JE, BROOKS AG Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. **J Exp Med**, v. 187, p. 813–818, 1998.

BRAY M. Pathogenesis and potential antiviral therapy of complications of smallpox vaccination. **Antiviral Res.**, v. 58(2), p. 101-14, 2003.

- BRAY M1, WRIGHT ME. Progressive vaccinia. **Clin Infect Dis.**, v. 36(6), p. 766-74, 2003.
- BRAUD VM, ALLAN DS, O'CALLAGHAN CA, SODERSTROM K, D'ANDREA A, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. **Nature**, v. 391, p. 795–799, 1998.
- BREMAN, J. G.; HENDERSON, D. A. Diagnosis and management of *Smallpox*. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 556-559, 2002.
- BUKOWSKI, JF, WODA BA, HABU S et al. Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis *in vivo*. **J Immunol.**, v. 131, p.1531–1538, 1983
- BULLER, R., M., L.; PALUMBO, G. J. Poxvirus Pathogenesis. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 80-122, mar. 1991.
- CAMPOS RK, et al. Assessing the variability of Brazilian Vaccinia virus isolates from a horse exanthematic lesion: coinfection with distinct viruses. **Arch Virol.**, v.156, n.2, p.275-83, 2011.
- CAMPOS MAS, KROON EG. Critical period for irreversible block of Vaccinia virus replication. **Rev Microbiol.**, v. 24, p 104–10, 1993.
- CANTONI C, BOTTINO C, VITALE M, PESSINO A, AUGUGLIARO R, MALASPINA A, PAROLINI S, MORETTA L, MORETTA A, BIASSONI R. NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. **J Exp Med.**, v.189, n.5, p.787-96, 1999.
- CARRETERO M, CANTONI C, BELLON T, BOTTINO C, BIASSONI R, et al. The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. **Eur J Immunol**, v. 27, p.563–567, 1997.
- CERWENKA, A., and L. L. LANIER. Natural killer cells, viruses and cancer. **Nat. Rev. Immunol.** 2001; 1: 41–49.

CHEN N., LI G., LISZEWSKI M.K., ATKINSON J.P., JAHRLING P.B., FENG Z., SCHRIEWER J., BUCK C., WANG C., LEFKOWITZ E.J., ESPOSITO J.J., HARMS T., DAMON I.K., ROPER R.L., UPTON C., BULLER R.M. Virulence differences between monkeypox virus isolates from West Africa and the Congo basin. **Virology**. v.340, n.1, p.46-63, 2005.

CHISHOLM, S. E.; REYBURN, H. T.. Recognition of *Vaccinia virus*-Infected Cells by Human Natural Killer Cells Depends on Natural Cytotoxicity Receptors. **Journal Of Virology**, v. 80, n. 5, p. 2225–2233, mar. 2006.

CHUNG, C. S.; HUANG, C. Y.; CHANG, W. *Vaccinia virus* penetration requires cholesterol and results in specific viral envelope proteins associated with lipid rafts. **J Virol**, v.79, p.1623-1634, 2005.

COLONNA, M. et al. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. **J. Exp. Med.** 186, 1809–1818, 1997.

COMBADIÈRE, Behazine, et al. Distinct Time Effects of Vaccination on Long-Term Proliferative and IFN- γ -producing T Cell Memory to Smallpox in Humans. **J. Exp. Med.** Volume, v. 199, n. 11, p. 1585–1593, jun. 2004.

COOPER, M. A. *et al.* Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. **Blood**, v. 97, n. 10, mai. 2001.

CORAS B, ESSBAUER S, PFEFFER M, MEYER H, SCHRÖDER J, STOLZ W, LANDTHALER M, VOGT T. Cowpox and a cat. **Lancet.**, v.365, n.9457,p.446-8.

CROTTY, S.; AHMED, R. Immunological memory in humans. **Semin. Immunol.**, v. 16, p. 197-203, 2004.

CROUCH, A. C *et al.*. Serological evidence for the reservoir hosts of cowpox virus in British wildlife. **Epidemiol. Infect.**, v. 115, n. 1, p. 185-91, ago. 1995.

DA FONSECA, F. G.; *et al.* Morphological and molecular characterization of the poxvirus bean 58058. **Archives of Virology**, v. 143, p. 1171-1186, 1998.

DAFONSECA, F. G. Characterization of a vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 223-228, 2002.

DAMASO, C. R. A. *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, p. 439-449, 2000.

DAMON IK Poxviruses. In: KNIPE DM, HOWLEY PM, editors, **Fields virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2947-75.

DANIELS, K A, DEVORA G, LAI WC *et al.* Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H. **J Exp Med.**, v. 194, p. 29-44. 2001.

DAY SL, RAMSHAW IA, RAMSAY AJ, RANASINGHE C. Differential effects of the type I interferons alpha4, beta, and epsilon on antiviral activity and vaccine efficacy. **J Immunol.**, v.180, n.11, p.7158-66, 2008.

DE ASSIS FL, VINHOTE WM, BARBOSA JD, DE OLIVEIRA CH, DE OLIVEIRA CM, CAMPOS KF, SILVA NS, TRINDADE GDE S; JÔNATAS. Reemergence of vaccinia virus during Zoonotic outbreak, Pará State, Brazil. **Emerg Infect Dis.**, v.19, n.12, p.2017-20, 2013.

DE OLIVEIRA TM, REHFELD IS, COELHO GUEDES MI, FERREIRA JM, KROON EG, LOBATO ZI. Susceptibility of Vaccinia virus to chemical disinfectants. **Am J Trop Med Hyg.**v.85, n.1, p.152-7, 2011.

DENNES A, CROMME C, SURESH K, KUMAR NS, EBLE JA, HAHNENKAMP A, POHLMANN R. The novel Drosophila lysosomal enzyme receptor protein mediates lysosomal sorting in mammalian cells and binds mammalian and Drosophila GGA adaptors. **J Biol Chem.**, v.280, n.13, p.12849-57, 2005.

DEONARAIN, R., ALCAMI, A., ALEXIOU, M., DALLMAN, M. J., GEWERT, D. R. & PORTER, A. C. Impaired antiviral response and alpha/beta interferon induction in mice lacking beta interferon. **Journal of Virology**, v. 74, p. 3404-3409, 2000.

DI GIULIO DB, ECKBURG PB. Human monkeypox: an emerging zoonosis. **Lancet Infect Dis.**, v.4, n.1, p.15-25, 2004.

DI SANTO JP. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. **Annu Rev Immunol.**, v. 24, p. 257–286, 2006.

DINIZ, S. *et al.* Surto de varíola murina em camundongos suíços em biotérios – relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 2, p. 152-156, 2001.

DOKUN, A O, KIM S, SMITH HR *et al.* Specific and nonspecific NK cell activation during vírus infection. **Nat Immunol.**, v. 2, p. 951–956, 2001.

DOMINGO-GIL E, PÉREZ-JIMÉNEZ E, VENTOSO I, NÁJERA JL, ESTEBAN M. Expression of the E3L gene of vaccinia virus in transgenic mice decreases host resistance to vaccinia virus and Leishmania major infections. **J Virol.**, v.82, n.1, p.254-67, 2008.

DONATELLE DM, TRAVASSOS DCE, LEITE JA, KROON EG. Epidemiologia da poxvirose bovina no Estado do Espírito Santo, Brasil. **Braz J Vet Res Anim Sci**; v.44, n.4, p.275-82, 2007.

DRUMOND B.P., LEITE J.A., DA FONSECA F.G., BONJARDIM C.A., FERREIRA P.C., KROON E.G. Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. **Microbes Infect.**v.10, n.2, p.185-97, 2008.

EGAN C, KELLY CD, RUSH-WILSON K, DAVIS SW, SAMSONOFF WA, PFEIFFER H, MILLER J, TAYLOR J, CIRINO NM. Laboratory-confirmed transmission of vaccinia virus infection through sexual contact with a military vaccinee. **J Clin Microbiol.**, v.42, n.11, 5409-11, 2004.

EIS-HÜBINGER AM, GERRITZEN A, SCHNEWEIS KE, PFEIFF B, PULLMANN H, MAYR A, CZERNY CP. Fatal cowpox-like virus infection transmitted by cat. **Lancet.**, v.336, n.8719, p.880, 1990.

ESPOSITO, J.J. AND FENNER, F. Poxviruses. In: **Fields Virology**, Fourth Edition (D.M. Knipe and P.M. Howley, eds), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 2885-2921. 2001.

ESPOSITO JJ, PALMER EL, BORDEN EC, HARRISON AK, OBIJESKI JF, MURPHY FA. Studies on the poxvirus Cotia. **J Gen Virol.**, v.47, n.1, p.37-46, 1980.

ESPOSITO J.J., SAMMONS S.A., FRACE A.M., OSBORNE J.D., OLSEN-RASMUSSEN M., ZHANG M., GOVIL D., DAMON I.K., KLINE R., LAKER M., LI Y., SMITH G.L., MEYER H., LEDUC J.W., WOHLHUETER R.M. Genome sequence diversity and clues to the evolution of variola (smallpox) virus. **Science**. v. 313, n.5788, p. 807-12, 2006.

ESTEBAN DJ, BULLER RM. Ectromelia virus: the causative agent of mousepox. **J Gen Virol.**, v.86, n.10, p.2645-59, 2005.

FANG M, LANIER LL, SIGAL LJ. A role for NKG2D in NK cell-mediated resistance to poxvirus disease. **PLoS Pathog**. Feb 8;4(2):e30. 2008

FANG M, ROSCOE F, SIGAL LJ. Age-dependent susceptibility to a viral disease due to decreased natural killer cell numbers and trafficking. **LJ. J Exp Med**. Oct 25;207(11):2369-81. 2010

FANG M, ORR MT, SPEE P, EGEBJERG T, LANIER LL, SIGAL LJ. CD94 is essential for NK cell-mediated resistance to a lethal viral disease. **Immunity**. Apr 22;34(4):579-89. 2011

FENNER F *et al.*, 1988. Smallpox and its eradication. Geneva : **World Health Organization**. 1988. 1460p.

FENNER, F.; WITTEK, R.; DUMBELL, K. R. The *Orthopoxviruses*. **Academia Press Inc**, San Diego, California, 1989, 439p..

FENNER, F. Adventures with *Poxviruses* of vertebrates. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 2, p. 123-133, 2000.

FENNER, F.; *et al.* **Smallpox and its eradication**. Geneva: World Health Organization. 1988. 1718p.

FENNER, F. *Poxviruses*. In: FIELDS, D.M. *et al.* **Virology**. 3. ed. Philadelphia, Lippincott-Raven, p. 2673-2702, 1996.

FERREIRA JM, ABRAHÃO JS, DRUMOND BP, *et al.* Vaccinia virus: shedding and horizontal transmission in a murine model. *J Gen Virol.* v.89, n.12, p.2986-91, 2008.

FINLAY BB, MCFADDEN G. Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell*, v. 124, p. 767–782, 2006.

FONSECA, F. G. Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. *Archives of Virology*, v. 143, p. 1171-1186, 1998.

FREBEL H, RICHTER K, OXENIUS A. How chronic viral infections impact on antigen-specific T-cell responses. *Eur J Immunol.*, v.40, n.3, p.654-63, 2010.

FREYSCHMIDT EJ, MATHIAS CB, DIAZ N, MACARTHUR DH, LAOUAR A, MANJUNATH N, HOFER MD, WURBEL MA, CAMPBELL JJ, CHATILA TA, OETTGEN HC. Skin inflammation arising from cutaneous regulatory T cell deficiency leads to impaired viral immune responses. *J Immunol.*, v. 185(2), p. 1295-302, 2010.

GEDDES AM. The history of smallpox. *Clin Dermatol.*, v.24, n.3, p.152-7, 2006.

GHERARDI MM, RAMIREZ JC, ESTEBAN M. IL-12 and IL-18 act in synergy to clear vaccinia virus infection: involvement of innate and adaptive components of the immune system. *Gen Virol*, v. 84(Pt 8), p.1961-72, 2003.

GUEDES M.I.M.C., TRINDADE G.S., KROON E. Vaccinia virus strains in Brazil: emerging or reemerging viruses? *Virus Reviews and Research* v.11, p.14-18, 2006.

GERMAIN C, MEIER A, JENSEN T, KNAPNOUGEL P, POUPON G, *et al.* Induction of Lectin-like Transcript 1 (LLT1) Protein Cell Surface Expression by Pathogens and Interferon- γ Contributes to Modulate Immune Responses. *J Biol Chem.*, v. 286, n. 44, p. 37964-75, 2011.

GOEBEL, S. J. *et al.* The complete DNA sequence of *Vaccinia virus*. *Virology*, v. 179, p. 247-266, 1990.

GOMES, Juliana Assis Silva, ARAÚJO, Fernanda Fortes de, TRINDADE, Giliane de Souza Trindade, et al.. Immune Modulation in Primary Vaccinia virus Zoonotic Human Infections. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 11p., 2012.

GUARNER J, JOHNSON BJ, PADDOCK CD, SHIEH WJ, GOLDSMITH CS, REYNOLDS MG, DAMON IK, REGNER Y RL, ZAKI SR. Monkeypox transmission and pathogenesis in prairie dogs. **Emerg Infect Dis.**, v.10, n.3, p.426-31, 2004.

HAGA IR, BOWIE AG. Evasion of innate immunity by vaccinia virus. **Parasitology**, v. 130, (Suppl):S11–S25, 2005.

HAMMARLUND, E. et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. **Nature Medicine**, v. 9, n. 9, p. 1131-1137, set. 2003.

HAMMARLUND ERIKA, LEWIS MATTHEW W., HANIFIN JON M., MORI MOTOMI, KOUDELKA CAROLINE W., SLIFKA MARK K. Antiviral Immunity following Smallpox Virus Infection: a Case-Control Study. **Journal of Virology** 2010; 12754–12760.

HARRIS N, BULLER RML, KARUPIAH G. Gamma interferon-induced, nitric oxide-mediated inhibition of vaccinia virus replication. **J. Virol.**, v. 69, p. 910–15, 1995.

HARRISON SC, et al. Discovery of antivirals against smallpox. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.101, n.31, p.11178-92, 2004.

HENDERSON DA, MOSS B. Smallpox and Vaccinia. In: Plotkin SA, Orenstein WA. **Vaccines (3rd ed.)**. Philadelphia, Pennsylvania: WB Saunders, 1999.

HEYMANN DL, SZCZENIEWSKI M, ESTEVES K. Re-emergence of monkeypox in Africa: a review of the past six years. **Br Med Bull**, v. 54, n. 3, p. 693-702, 1998.

HORNUNG V, ABLASSER A, CHARREL-DENNIS M, BAUERNFEIND F, HORVATH G, CAFFREY DR, LATZ E, FITZGERALD KA. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. **Nature.**, v.458, n.7237, p.514-8, 2009.

HOWELL MD, GALLO RL, BOGUNIEWICZ M, JONES JF, WONG C, STREIB JE, LEUNG DY. Cytokine milieu of atopic dermatitis skin subverts the innate immune response to vaccinia virus. **Immunity.**, v.24, n.3, p.341-8, 2006.

HUANG, S., HENDRIKS, W., ALTHAGE, A., HEMMI, S., BLUETHMANN, H., KAMIJO, R., VILCEK, J., ZINKERNAGEL, R.M. & AGUET, M. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. **Science**, v. 259, p. 1742–1745, 1993.

HUMPHREY DC. Localized accidental vaccinia of the vulva. Report of 3 cases and a review of the world literature. **Am J Obstet Gynecol.**, v.86, p.460–469, 1963.

HUTCHENS M, LUKER KE, SOTTILE P, SONSTEIN J, LUKACS NW, NÚÑEZ G, CURTIS JL, LUKER GD. TLR3 increases disease morbidity and mortality from vaccinia infection. **J Immunol.**, v.180, n.1, p.483-91, 2008a.

HUTCHENS MA, LUKER KE, SONSTEIN J, NÚÑEZ G, CURTIS JL, LUKER GD. Protective effect of Toll-like receptor 4 in pulmonary vaccinia infection. **PLoS Pathog.**, v.4, n.9, p.e1000153, 2008b.

HUTIN, Y. J. *et al.* Outbreak of human *Monkeypox*, Democratic Republic of Congo, 1996 to 1997. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 7, p. 434-438, 2001.

ISHII KJ, COBAN C, KATO H, TAKAHASHI K, TORII Y, TAKESHITA F, LUDWIG H, SUTTER G, SUZUKI K, HEMMI H, SATO S, YAMAMOTO M, UEMATSU S, KAWAI T, TAKEUCHI O, AKIRA S. A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. **Nat Immunol.**, v.7, n.1, p.40-8, 2006

JACOBS N, CHEN RA, GUBSER C, NAJARRO P, SMITH GL. Intradermal immune response after infection with Vaccinia virus. **J Gen Virol.**, v.87, n.5, p.1157-61, 2006.

JARAHIAN M, et al. Modulation of NKp30- and NKp46-mediated natural killer cell responses by poxviral hemagglutinin. **PLoS Pathog.**, v.8, p.e1002195, 2011.

JOHNSON, G. P.; GOEBEL, S. J.; PAOLETTI, E. An update on the *Vaccinia virus* genome. **Virology**, v. 196, p. 381-401, 1993.

JOHNSTON JB, MCFADDEN G. Poxvirus immunomodulatory strategies: current perspectives. **J Virol.**, v.77, n.11, p.6093-100, 2003.

JOHNSTON JB, MCFADDEN G. Technical knockout: understanding poxvirus pathogenesis by selectively deleting viral immunomodulatory genes. **Cell Microbiol.**, v.6, n.8, p.695-705, 2004.

JOKLIK WK. The purification of four strains of poxvirus. *Virology* 1962;18: 9–18.
28. Ferrier-Rembert AR, Drillien JN, Tournier D, Garin, Crance JM. Intranasal cowpox virus infection of the mouse as a model for preclinical evaluation of smallpox vaccines. **Vaccine**, v. 25, p. 4809–17, 2007.

JUDKOWSKI V, BUNYING A, GE F, APPEL JR, LAW K, SHARMA A, et al. GM-CSF production allows the identification of immunoprevalent antigens recognized by human CD4 + T cells following smallpox vaccination. **PLoS One**, v. 6(9), e24091, 2011.

KAGI, D., P. SEILER, J. PAVLOVIC, B. LEDERMANN, K. BURKI, R. M. ZINKERNAGEL, H. HENGARTNER. 1995. The roles of perforin- and Fas-dependent cytotoxicity in protection against cytopathic and noncytopathic viruses. **Eur J Immunol.** 1995 Dec;25(12):3256-

KAREM KL, REYNOLDS M, HUGHES C, BRADEN Z, NIGAM P, CROTTY S, et al. Monkeypox-induced immunity and failure of childhood smallpox vaccination to provide complete protection. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, p1318–27, 2007.

KARUPIAH, G. *et al.* Importance of interferons in recovery from mousepox. **J. Virol.**, v. 67, p. 4214-26, 1993.

KARUPIAH G, BLANDEN RV, RAMSHAW IA. Interferon gamma is involved in the recovery of athymic nude mice from recombinant vaccinia virus/interleukin 2 infection. **J. Exp. Med.**, v. 172, p. 1495–503, 1990.

KARUPIAH, G., XIE Q., BULLER R. M. L., NATHAN C., DUARTE C., MACMICKING, J. D. . Inhibition of viral replication by interferon-g-induced nitric oxide synthase. **Science**, v. 261, p. 1445–1448, 1993a.

KAWAKAMI Y, TOMIMORI Y, YUMOTO K, HASEGAWA S, ANDO T, TAGAYA Y, CROTTY S, KAWAKAMI T. Inhibition of NK cell activity by IL-17 allows vaccinia virus to induce severe skin lesions in a mouse model of eczema vaccinatum. **J Exp Med.**, v.206, n.6, p.1219-25, 2009.

KOHONEN-CORISH MR, KING NJ, WOODHAMS CE, RAMSHAW IA. Immunodeficient mice recover from infection with vaccinia virus expressing interferon gamma. **Eur. J. Immunol.**, v. 20, p. 157–61, 1990.

KOHYAMA S1, OHNO S, ISODA A, MORIYA O, BELLADONNA ML, HAYASHI H, IWAKURA Y, YOSHIMOTO T, AKATSUKA T, MATSUI M. IL-23 enhances host defense against vaccinia virus infection via a mechanism partly involving IL-17. **J Immunol.**, v.179, n.6, p.3917-25, 2007.

KOLHAPURE, R. M. *et al.* Investigation of *Buffalopox* outbreaks in Maharashtra State during 1992-1996. **Indian Journal of Medical Research**, v. 106, p. 441-446, 1997.

KONJEVIC, G. *et al.* Distribution of Several Activating and Inhibitory Receptors on CD32CD16+ NK Cells and Their Correlation with NK Cell Function in Healthy Individuals. **J Membrane Biol.**, v. 230, p. 113–123, 2009.

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

KREIJTZ JH, et al.. Preclinical evaluation of a modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based vaccine against influenza A/H5N1 viruses. **Vaccine.**, v.27, n.45, p.6296-9, 2009.

LAACKONEN J, KALLIO ER, KALLIO-KOKKO H, VAPALAHTI O, VAHERI A, HENTTONEN H. Is there an association of Pneumocystis infection with the presence of arena-, hanta-, and poxvirus antibodies in wild mice and shrews in Finland? **Parasitology.**, v.132, n.4, p.461-6, 2006.

LANNA, Maria Célia. **Propriedades biológicas dos poxvírus silvestres Cotia e BeAn58058 isolados no Brasil.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1980.

LANIER, L. L. *et al.* The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. **J Immunol.**, v. 136, p. 4480-4486, 1986.

LANIER LL, CORLISS B, WU J, PHILLIPS JH. Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. **Immunity**, v. 8, p. 693–701, 1998.

LANIER LL. Activating and inhibitory NK cell receptors. **Adv Exp Med Biol.**, v.452, p.13-8, 1998.

LANIER, L.L. NK cell receptors. **Annu. Rev.Immunol.**, v.16, 359–393, 1998.

LAZETIC S, CHANG C, HOUCHINS JP, LANIER LL, PHILLIPS JH (1996) Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. **J Immunol** 157: 4741–4745.

LEDERMAN ER, et al. Prevalence of antibodies against orthopoxviruses among residents of Likouala region, Republic of Congo: evidence for monkeypox virus exposure. **Am J Trop Med Hyg.**, v.77, n.6, p.1150-6, 2007.

LEIST, T. P.; EPPLER, M.; ZINKERNAGEL, R. M. Enhanced virus replication and inhibition of lymphocytic choriomeningitis virus disease in anti-gamma interferon-treated mice. **J. virol**, v. 63, p. 2813-9, 1989.

LEITE, J. A. et al. Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 1935-1938, dez. 2005.

LEWIS-JONES S. Zoonotic poxvirus infections in humans. **Curr Opin Infect Dis.**, v.17, n.2, p.81-9, 2004.

LIKOS A.M., SAMMONS S.A., OLSON V.A., FRACE A.M., LI Y., OLSEN-RASMUSSEN M., DAVIDSON W., GALLOWAY R., KHRISTOVA M.L., REYNOLDS M.G., ZHAO H., CARROLL D.S., CURNS A., FORMENTY P., ESPOSITO J.J., REGNERY R.L., DAMON I.K. A tale of two clades: monkeypox viruses. **J Gen Virol.**; v.86(Pt 10), p. 2661-72, 2005

LIU L, XU Z, FUHLBRIGGE RC, PEÑA-CRUZ V, LIEBERMAN J, KUPPER TS. Vaccinia virus induces strong immunoregulatory cytokine production in healthy human epidermal keratinocytes: a novel strategy for immune evasion. **J Virol.** v.79, n.12, p.7363-70, 2005.

LOCKER JK, et al. Entry of the two infectious forms of vaccinia virus at the plasma membrane is signaling-dependent for the IMV but not the EEV. **Mol Biol Cell.**, v.11, n.7, p.2497-511, 2000.

LOPES O.S., Lacerda J.P., Fonseca I.E., Castro D.P., Forattini O.P., Rabello E.X. Cotia virus : a new agent isolated from sentinel mice in São Paulo, Brazil. **Am J Trop Med Hyg.**; v.14, p.156-7, 1965

LÓPEZ-BOTET M, CARRETERO M, BELLÓN T, PÉREZ-VILLAR JJ, LLANO M, NAVARRO F. The CD94/NKG2C-type lectin receptor complex in recognition of HLA class I molecules. **Res Immunol.**, v.148, n.3, p.155-9, 1997.

LOUSBERG EL, DIENER KR, BROWN MP, HAYBALL JD. Innate immune recognition of poxviral vaccine vectors. **Expert Rev Vaccines.** v.10, n.10, p.1435-49, 2011

LUBINSKI J, NAGASHUNMUGAM T, FRIEDMAN HM. Viral interference with antibody and complement. **Semin Cell Dev Biol**, v. 9, p. 329–337, 1998.

LJUNGGREN HG, STURMHÖFEL K, WOLPERT E, HÄMMERLING GJ, KÄRRE K. Transfection of beta 2-microglobulin restores IFN-mediated protection from natural killer cell lysis in YAC-1 lymphoma variants. **J Immunol.**, v.145, n.1, p.380-6, 1990.

MACLEOD, MEGAN K.L., CLAMBEYA, ERIC T., KAPPLERA, JOHNW., MARRACKA, PHILIPPA. CD4 memory T cells: What are they and what can they do? **Seminars in Immunology** v.21, p.53–61, 2009.

MAIBORODA AD. Experimental infection of Norwegian rats (*Rattus norvegicus*) with ratpox virus. **Acta Virol.**, v.26, n.4, p.288-91, 1982.

MALLARDO, M. *et al.* Relationship between *Vaccinia virus* intracellular cores, early mRNAs and DNA replication sites. **J. Virol**, v. 76, n. 10, p. 5167-5183, 2002.

MARENNIKOVA SS, MALTSEVA NN, KORNEEVA VI, GARANINA N. Outbreak of pox disease among carnivora (felidae) and edentata. **J Infect Dis.**, v.135, n.3, p.358-66, 1977.

MARQUES JT, TRINDADE GD, DA FONSECA FG, DOS SANTOS JR, BONJARDIM CA, FERREIRA PC, KROON EG. Characterization of ATI, TK and IFN-alpha/betaR genes in the genome of the BeAn 58058 virus, a naturally attenuated wild Orthopoxvirus. **Virus Genes.**, v.23, n.3, p.291-301, 2001.

MARTINEZ J, HUANG X, YANG Y. Direct action of type I IFN on NK cells is required for their activation in response to vaccinia viral infection in vivo. **J Immunol.**, v.180, n.3, p.1592-7, 2008.

MARTINEZ J, HUANG X, YANG Y. Toll-like receptor 8-mediated activation of murine plasmacytoid dendritic cells by vaccinia viral DNA. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.107, n.14, p.6442-7, 2010.

MCFADDEN G. Poxvirus tropism. **Nat Rev Microbiol.**, v.3, n.3, p.201-13, 2005.

MCLAUGHLIN J, SCHMIDT T, WESTCOTT M, *et al.* Vulvar vaccinia infection after sexual contact with a military smallpox vaccinee - Alaska, 2006. **Morbidity and Mortality Weekly Report/CDC**, v.56, p.417-419, 2007.

MCKELVEY, T. A. *et al.* Identification of the *Orthopoxvirus* p4c gene, which encodes a structural protein that directs intracellular mature virus particles into A-type inclusions. **J Virol.**, v. 76, n. 22, p. 11216-25, nov. 2002.

MEDAGLIA ML, PESSOA LC, SALES ER, FREITAS TR, DAMASO CR. Spread of cantagalo virus to northern Brazil. **Emerg Infect Dis.**, v. 15(7), p. 1142-3, 2009.

MEDEIROS-SILVA DC, Moreira-Silva EA, Gomes Jde A, Fonseca FG, Correa-Oliveira R. Clinical signs, diagnosis, and case reports of Vaccinia virus infections. **Braz J Infect Dis.**;v.14, n.2, p.129-34, 2010

MEDEIROS-SILVA DC, DOS SANTOS MOREIRA-SILVA EA, ASSIS SILVA GOMES JD, DA FONSECA FG, CORREA-OLIVEIRA R. CD4 and CD8 T cells participate in the immune memory response against Vaccinia virus after a previous natural infection. **Results Immunol.**, v. 3, p104-13, 2013.

MEGID J, APPOLINÁRIO CM, LANGONI H, PITUCO EM, OKUDA LH. Vaccinia virus in humans and cattle in southwest region of Sao Paulo state, Brazil. **Am J Trop Med Hyg.**, v.79, n.5, p.647-51, 2008.

MELKOV´A A, ESTEBAN M. Interferon-gamma severely inhibits DNA synthesis of vaccinia virus in a macrophage cell line. **Virology**, v. 198, p. 731-35, 1994.

MEYER H, ROOP SL, ESPOSITO JJ Gene for A-type inclusion body protein is useful for a polymerase chain reaction assay to differentiate orthopoxvirus. **J Virol Methods**; v.64, p.217–21, 1997.

MORETTA A, BOTTINO C, VITALE M, PENDE D, BIASSONI R, MINGARI MC, MORETTA L. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. **Annu Rev Immunol.**, v.14, p.619-48, 1996.

MORETTA, A. et al. Major histocompatibility complex class I-specific receptors on human natural killer and T lymphocytes. **Immunol. Rev.**1997; 155, 105-117

MORETTA A, BIASSONI R, BOTTINO C, MINGARI MC, MORETTA L. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. **Immunol Today.**, v.21, n.5, p.228-342, 2000.

MORETTA A, MORETTA L. HLA class I specific inhibitory receptors. **Curr Opin Immunol.**, v.9, n.5, p.694-701, 1997.

MORETTA L, CICCONE E, MINGARI MC, BIASSONI R, MORETTA A. Human natural killer cells: origin, clonality, specificity, and receptors. **Adv Immunol.**, v.55, p.341-80, 1994.

MORETTA, L. et al. Allorecognition by NK cells: nonself or no self? **Immunol. Today** 1992;13, 300-306

MORETTA L, MORETTA A. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. **J Exp Med.**, v.190, n.10, p.1505-16, 1999.

MOSER JM, GIBBS J, JENSEN PE, LUKACHER AE. CD94-NKG2A receptors regulate antiviral CD8(+) T cell responses. **Nat Immunol.**; 3: 189–195. 2002

MOSS, B. Genetically engineered *Poxviruses* for recombinant gene expression, vaccination and safety. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, v. 93, p. 11341-11348, 1996.

MOSS B, SHISLER JL. Immunology 101 at poxvirus U: immune evasion genes. **Semin Immunol**, v. 13, p. 59–66, 2001.

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

MOSS B. Smallpox vaccines: targets of protective immunity. **Immunol Rev.** v.239, n.1, p.8-26, 2011 .

MOSSMAN K, UPTON C, BULLER RM, MCFADDEN G.. Species specificity of ectromelia virus and vaccinia vírus interferon- α binding proteins. **Virology**, v. 208, p. 762–69, 1995.

MOTA BE, TRINDADE GS, DINIZ TC, DA SILVA-NUNES M, BRAGA EM, URBANO-FERREIRA M, RODRIGUES GO, BONJARDIM CA, FERREIRA PC, KROON EG. Seroprevalence of orthopoxvirus in an Amazonian rural village, Acre, **Brazil. Arch Virol.**, v.155, n.7, p.1139-44, 2010.

MULLBACHER, A. *et al.* Perforin Is Essential for Control of *Ectromelia Virus* but Not Related *Poxviruses* in Mice. **Journal of Virology**, v. 73, n. 2, p. 1665–1667, fev. 1999.

MULLBACHER, A. *et al.* Granzyme A is critical for recovery of mice from infection with the natural cytopathic viral pathogen, ectromelia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 5783-5787, jun.1996.

MULLER, U., STEINHOFF, U., REIS, L. F., HEMMI, S., PAVLOVIC, J., ZINKERNAGEL, R.M. & AGUET, M. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. **Science**, v. 264, p. 1918–1921, 1994.

NATUK, RJ, WELSH RM. Accumulation and chemotaxis of natural killer/large granular lymphocytes at sites of virus replication. **J Immunol.**, v. 138, p. 877–883, 1987.

NAZARIAN SH, BARRETT JW, FRACE AM, OLSEN-RASMUSSEN M, KHRISTOVA M, SHABAN M, NEERING S, LI Y, DAMON IK, ESPOSITO JJ, ESSANI K, MCFADDEN G. Comparative genetic analysis of genomic DNA sequences of two human isolates of Tanapox virus. **Virus Res.**, v.129, n.1, p.11-25, 2007.

NITSCHKE A, KURTH A, PAULI G. Viremia in human Cowpox virus infection. **J Clin Virol.**, v.40, n.2, p.160-2, 2007.

OLIVEIRA TML, REHFELD IS, MATOS ACD, RIVETTI JUNIOR AV, GUEDES MIMC, ABRAHÃO JS, KROON EG, LOBATO ZIP. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 9, n. 3, p.37-38, 2011.

ORR MT, WU J, FANG M, SIGAL LJ, SPEE P, et al. Development and Function of CD94-Deficient Natural Killer Cells. **PLoS ONE** 5 2010; (12): e15184. doi:10.1371/journal.pone.0015184

PENDE D, PAROLINI S, PESSINO A, SIVORI S, AUGUGLIARO R, MORELLI L, MARCENARO E, ACCAME L, MALASPINA A, BIASSONI R, BOTTINO C, PERDIGUERO, B; ESTEBAN, M. The Interferon System and Vaccinia Virus Evasion Mechanisms. **Journal of interferon & cytokine research**, v.29, n.9, 2009.

PERKUS, M. E. Deletion of 55 open reading frames from the termini of *Vaccinia virus*. **Virology**, v. 180, n. 1, p. 406-10, jan. 1991.

PESSINO A, SIVORI S, BOTTINO C, MALASPINA A, MORELLI L, MORETTA L, BIASSONI R, MORETTA A. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. **J Exp Med.**, v.188, n.5, p.953-60, 1998.

PHILLIPS JH, CHANG C, MATTSON J, GUMPERZ JE, PARHAM P, et al. (1996) CD94 and a novel associated protein (94AP) form a NK cell receptor involved in the recognition of HLA-A, HLA-B, and HLA-C allotypes. **Immunity** 5: 163–172.

PICHLMAIR A, SCHULZ O, TAN CP, REHWINKEL J, KATO H, TAKEUCHI O, AKIRA S, WAY M, SCHIAVO G, REIS E SOUSA C. Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. **J Virol.**, v.83, n.20, p.10761-9, 2009.

PRLIC M, GIBBS J, JAMESON SC. Characteristics of NK cell migration early after vaccinia infection. **J Immunol.**, v. 175, . 4, p. 2152-7, 2005.

PUISSANT, B.; COMBADIÈRE, B. Keeping the memory of smallpox virus. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, p. 2249-2259, 2006.

PUISSANT-LUBRANO, B. et al. Control of Vaccinia virus skin lesions by long-term-maintained IFN-gamma+TNF-alpha+ effector/memory CD4+ lymphocytes in humans. **J Clin Invest**, v. 120, n.5, p.1636-44, 2010.

PUTZ, MM, ALBERINI I, MIDGLEY CM, MANINI I, MONTOMOLI E, SMITH GL. Prevalence of antibodies to Vaccinia virus after smallpox vaccination in Italy. **J Gen Virol.**; v.86, p.2955–2960, 2005

QUIGLEY M, MARTINEZ J, HUANG X, YANG Y. A critical role for direct TLR2-MyD88 signaling in CD8 T-cell clonal expansion and memory formation following vaccinia viral infection. **Blood.**, v.113, n.10, p.2256-64, 2009.

QUIXABEIRA-SANTOS JC, MEDAGLIA ML, PESCADOR CA, DAMASO CR. Animal movement and establishment of vaccinia virus Cantagalo strain in Amazon biome, Brazil. **Emerg Infect Dis.**, v.17, n.4, p.726-9, 2011.

RAMSHAW, I. A. Cytokines and immunity to viral infection. **Immunol. Rev.**, v. 159, p. 119-35, 1997.

RAMSHAW, I. A., RAMSAY, A. J., KARUPIAH, G., ROLPH, M. S., MAHALINGAM, S. & RUBY, J. C. Cytokines and immunity to viral infections. **Immunological Reviews**, v. 159, p. 119–135, 1997.

RASKA, K. Measures for smallpox eradication in the 19Th Century. **International Journal of Epidemiology**, New York, v. 5, n. 3, p. 227 - 229, 1976.

READING PC, SMITH GL. Vaccinia virus interleukin-18-binding protein promotes virulence by reducing gamma interferon production and natural killer and T-cell activity. **J Virol.**, v.77, n.18, p.9960-8, 2003.

RESCH W, HIXSON KK, MOORE RJ, LIPTON MS, MOSS B. Protein composition of the Vaccinia virus mature virion. **Virology.**, v.358, n.1, p.233-47, 2007.

RIMOIN AW, MULEMBAKANI PM, JOHNSTON SC, et al. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.107, n.37, p.16262-7, 2010.

ROBERTS KL, SMITH GL. Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. **Trends Microbiol.**, v.16, n.10, p.472-9, 2008.

ROBERTSON, M. J.; RITZ, J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. **Blood**, v.76, p. 2421-2438, 1990.

ROCK, M. T. *et al.* Differential Regulation of Granzyme and Perforin in Effector and Memory T Cells following *Smallpox* Immunization. **J. Immunol.**, v. 174 p. 3757-3764, 2005.

RODRIGUEZ, J. R., RODRIGUEZ, D. & ESTEBAN, M. Interferon treatment inhibits early events in vaccinia virus gene expression in infected mice. **Virology**, v. 185, p. 929–933, 1991.

ROSEN DB, BETTADAPURA J, ALSHARIFI M, MATHEW PA, WARREN HS, LANIER LL. Cutting edge: lectin-like transcript-1 is a ligand for the inhibitory human NKR-P1A receptor. **J Immunol**, v.175, n. 12, p. 7796-9, dez.2005.

SAMUELSSON C, HAUSMANN J, LAUTERBACH H, SCHMIDT M, AKIRA S, WAGNER H, CHAPLIN P, SUTER M, O'KEEFFE M, HOCHREIN H. Survival of lethal poxvirus infection in mice depends on TLR9, and therapeutic vaccination provides protection. **J Clin Invest.**, v.118, n.5, p.1776-84, 2008.

SÁNCHEZ-PUIG JM1, SÁNCHEZ L, ROY G, BLASCO R. Susceptibility of different leukocyte cell types to Vaccinia virus infection. **Virol J.**, v.1, p.10, 2004.

SARAL Y, KALKAN A, OZDARENDELI A, BULUT Y, DOYMAZ MZ. Detection of Molluscum contagiosum virus (MCV) subtype I as a single dominant virus subtype in Molluscum lesions from a Turkish population. **Arch Med Res.**, v.37, n.3, p.388-91, 2006.

SAVONA MR, DELA CRUZ WP, JONES MS, THORNTON JA, XIA D, HADFIELD TL, DANAHER PJ. Detection of vaccinia DNA in the blood following smallpox vaccination. **JAMA.**, v.295, n.16, p.1898-900, 2006.

SCHARTON-KERSTEN, T. M.; SHER, A. Role of natural killer cells in innate resistance to protozoan infections. **Curr Opin Immunol.**, v. 9, p. 44-51, 1997.

SCHATZMARYR HG, ROMIJIN PC, BARRETO DF, SILVA EE, FARIAS FILHO JC, TAVARES AFA, BARTH OM. An outbreak of vesicopustular disease in humans and dairy cattle in the state of Rio de Janeiro. **Virus Revised Research**, v.10, p.61-63, 2005.

SCHATZMAYR, Hermann G. et al . Human infections caused by vaccinia-like poxviruses in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 42, n. 6, 2009.

SCHATZMAYR, H. G. *et al.* Detection of *Poxvirus* in cattle associated with human cases in the State of Rio de Janeiro: preliminary report. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v. 95, n. 5, p. 625-627, 2000.

SCHELLEKENS, H., DE REUS, A., BOLHUIS, R., FOUNTOULAKIS, M., SCHEIN, C., ECSODI, J., NAGATA, S. & WEISSMANN, C. Comparative antiviral efficiency of leukocyte and bacterially produced human alpha-interferon in rhesus monkeys. **Nature**, v. 292, p. 775–776, 1981.

SCLIAR, Moacyr. **Oswaldo Cruz: entre micróbios e barricadas**. Rio de Janeiro: Relume Dumara/Rioarte, (il). (Perfis do Rio, 6), 1996. 101p

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

SELIN LK, SANTOLUCITO PA, PINTO AK, SZOMOLANYI-TSUDA E, WELSH RM. Innate immunity to viruses: control of vaccinia virus infection by gamma delta T cells. **J Immunol.**, v.166, n.11, p.6784-94, 2001.

SENKEVICH, T. G., WARD, B. M., MOSS, B. *Vaccinia Virus* A28L gene encodes an essential protein component of the virion membrane with intramolecular disulfide bonds formed by the viral cytoplasmic redox pathway. **J. Virol**, v.78, p.2348-2356, 2004a.

SENKEVICH, T. G., WARD, B. M., MOSS, B. *Vaccinia Virus* entry into cells is dependent on a virion surface protein encoded by the A28L gene. **J. Virol**, v.78, p.2357-2366, 2004b.

SENKEVICH, T. G., MOSS, B. *Vaccinia Virus* H2 protein is an essential component of a complex involved in virus entry and cell-cell fusion. **J. Virol**, v.79, p.4744-4754, 2005.

SETTE A, GREY H, OSEROFF C, PETERS B, MOUTAFTSI M, CROTTY S, ASSARSSON E, GREENBAUM J, KIM Y, KOLLA R, TSCHARKE D, KOELLE D, JOHNSON RP, BLUM J, HEAD S, SIDNEY J. Definition of epitopes and antigens recognized by vaccinia specific immune responses: their conservation in variola virus sequences, and use as a model system to study complex pathogens. **Vaccine**. v.27 Supl 6:G21-6, 2009.

SHCHELKUNOV *et al.* Analysis of the *Monkeypox virus* genome. **Virology**, v. 297, p. 172-194, 2002.

SHCHELKUNOV, S.N.; MARENNIKOVA, S.S.; MOYER, R.W. Classification of poxviruses and brief characterization of the genus. Orthopoxvirus. In: **Orthopoxviruses pathogenic for humans**. New York: Springer Science, p. 11-18, 2005.

SILVA-FERNANDES AT, TRAVASSOS CE, FERREIRA JM, ABRAHÃO JS, ROCHA ES, VIANA-FERREIRA F, DOS SANTOS JR, BONJARDIM CA, FERREIRA PC, KROON EG. Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. **J Clin Virol.**, v. 44, n. 4, p. 308-13, 2009.

SIVORI S, PENDE D, BOTTINO C, MARCENARO E, PESSINO A, BIASSONI R, MORETTA L, MORETTA A. NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. **Eur J Immunol.**, v.29, n.5, p.1656-66, 1999

SIVORI S, VITALE M, MORELLI L, et al. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. **J Exp Med.**, v.186, p.1129-1136, 1997.

SLIFKA, M. K. Immunological memory to viral infection. **Curr. Opin. Immunol**, v. 16, p. 443-450, 2004.

SMITH, G. L.. Secreted poxvirus proteins that interact with the immune system. In: **Effects of Microbes on the Immune System** (Eds. Cunningham, M. W. & Fujinami, R. S.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000, p. 491-507.

SMITH, C. A., DAVIS, T., WIGNALL, J.M., DIN, W. S., FARRAH, T., UPTON, C., MCFADDEN, G. & GOODWIN, R. G. T2 open reading frame from the Shope fibroma virus

encodes a soluble form of the TNF receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 176, p. 335–342, 1991.

SMITH GL, LAW M. The exit of vaccinia virus from infected cells. *Virus Res.*, v.106, n.2, p.189-97, 2004.

SMITH GL, MURPHY BJ, LAW M. Vaccinia virus motility. *Annu Rev Microbiol.*, v.57, p.323-42, 2003.

SMITH, S. A.; KOTWAL, G. J. Immune response to *Poxvirus* infections in various animals. *Crit Rev Microbiol.*, v. 28, n. 3, p. 149-85, 2002.

SMITH, G. L.; VANDERPLASSCHEN, A. Extracellular enveloped *Vaccinia virus*. Entry, egress, and evasion. *Adv Exp Med Biol.*, v. 440, p. 395-414, 1998.

SOUZA TRINDADE G, DRUMOND BP, GUEDES MI, LEITE JA, MOTA BE, CAMPOS MA, da FONSECA FG, NOGUEIRA ML, LOBATO ZI, BONJARDIM CA, FERREIRA PC, KROON EG. Zoonotic vaccinia virus infection in Brazil: clinical description and implications for health professionals. *J Clin Microbiol.*, v.45, n.4, p.1370-2, 2007.

STITZ, L, BAENZIGER J, PIRCHER H et al. Effect of rabbit anti-asialo GM1 treatment in vivo or with anti-asialo GM1 plus complement in vitro on cytotoxic T cell activities. *J Immunol.*, v. 36, p. 4674–4680, 1986.

TAYLOR JM, BARRY M. Near death experiences: poxvirus regulation of apoptotic death. *Virology*, v. 344, p.139–150, 2006.

THOMPSON LJ, KOLUMAM GA, THOMAS S, MURALI-KRISHNA K. Innate inflammatory signals induced by various pathogens differentially dictate the IFN-I dependence of CD8 T cells for clonal expansion and memory formation. *J Immunol.*, v.177, n.3, p.1746-54, 2006.

TIAN T, LIU L, FREYSCHMIDT EJ, MURPHY GF, KUPPER TS, FUHLBRIGGE RC. Overexpression of IL-1alpha in skin differentially modulates the immune response to scarification with vaccinia virus. *J Invest Dermatol.*, v.129, n.1, p.70-8, 2009.

TOUGH, D. F.; SPRENT, J. Immunological memory. In: PAUL, W. E. **Fundamental Immunology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003. p. 865-899.

TOWNSLEY, A.C.; SENKEVICH, T. G.; MOSS, B. The product of the *Vaccinia virus* L5R gene is a fourth membrane protein encoded by all *Poxviruses* that is required for cell entry and cell-cell fusion. **J Virol.**, v. 79, n. 17, p. 10988-98, set. 2005a.

TOWNSLEY, A.C.; SENKEVICH, T. G.; MOSS, B. *Vaccinia virus* A21 virion membrane protein is required for cell entry and fusion. **J Virol.**, v. 79, n. 15, p. 9458-69, ago 2005b.

TRAKTMAN, P. *Poxviruses*: an emerging portrait of biological strategy. **Cell**, v. 24, p. 621-626, 1990.

TRINCHIERI G. Biology of natural killer cells. **Adv Immunol.**, v.47, p.187-376, 1989.

TRINDADE, G. S. *et al.* *Araçatuba virus*: a vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle. **Emerging Infectious Disease**, v. 9, n. 2, p. 155-160, fev. 2003.

TRINDADE, G. 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, p. 2015-2021, 2004.

TRINDADE, G. S. *et al.* Short report: isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 75, n. 3, p. 486-490, 2006.

TRINDADE G.S., EMERSON G.L., CARROLL D.S., KROON E.G., DAMON I.K. Brazilian vaccinia viruses and their origins. **Emerg Infect Dis.**; v.13, n.7, p.965-72, 2007a

TRINDADE G.S., DRUMOND B.P., GUEDES M.I., LEITE J.A., MOTA B.E., CAMPOS M.A., DA FONSECA F.G., NOGUEIRA M.L., LOBATO Z.I., BONJARDIM C.A., FERREIRA P.C., KROON E.G. Zoonotic vaccinia virus infection in Brazil: clinical description and implications for health professionals. **J Clin Microbiol.**; v.45, n.4, p.1370-2, 2007b

TRINDADE GS1, GUEDES MI, DRUMOND BP, MOTA BE, ABRAHÃO JS, LOBATO ZI, GOMES JA, CORRÊA-OLIVEIRA R, NOGUEIRA ML, KROON EG, DA FONSECA FG. Zoonotic vaccinia virus: clinical and immunological characteristics in a naturally infected patient. **Clin Infect Dis.**, v. 48(3), e37-40, 2009.

TSUNG, KANGLA; YIM, JOHN H.; MARTI, WALTER; BULLER, R. MARK L.; NORTON, JEFFREY A. Gene Expression and Cytopathic Effect of Vaccinia Virus Inactivated by Psoralen and Long-Wave UV Light. **Journal of virology**, p. 165–171, 1996.

TULMAN, E. R. et al. Genome of horsepox virus. **Journal of Virology**, v. 80, n. 18, p. 9244-9258, set. 2006.

UEDA Y, DUMBELL KR, TSURUHARA T, TAGAYA I. Studies on Cotia virus, an unclassified poxvirus. **J Gen Virol.**, v.40, n.2, p.263-76, 1978.

UEDA Y, MORIKAWA S, WATANABE T. 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.

UPTON, C., MOSSMAN, K. & MCFADDEN, G. Encoding of a homolog of the IFN-gamma receptor by myxoma virus. **Science**, v. 258, p. 1369–1372, 1992.

VALIANTE NM, UHRBERG M, SHILLING HG, et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. **Immunity.**, v.7, p.739-751, 1997.

VALENTINE R, SMITH GL. Inhibition of the RNA polymerase III-mediated dsDNA-sensing pathway of innate immunity by vaccinia virus protein E3. **J Gen Virol.**, v.91, n.9, p.2221-9, 2010.

VANCE RE, KRAFT JR, ALTMAN JD, JENSEN PE, RAULET DH. Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b). **J Exp Med**, v. 188, p. 1841–1848, 1998.

VAN DEN BROEK M, BACHMANN MF, KÖHLER G, BARNER M, ESCHER R, ZINKERNAGEL R, KOPF M. IL-4 and IL-10 antagonize IL-12-mediated protection against acute vaccinia virus infection with a limited role of IFN-gamma and nitric oxide synthetase 2. **J Immunol.**, v.164, n.1, p.371-8, 2000.

VAN DEN BROEK, M. F., MULLER, U., HUANG, S., AGUET, M. & ZINKERNAGEL, R.M. Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta and gamma interferon receptors. **Journal of Virology**, v. 69, p. 4792–4796, 1995.

VANCE RE, JAMIESON AM, RAULET DH. Recognition of the class Ib molecule Qa-1(b) by putative activating receptors CD94/NKG2C and CD94/NKG2E on mouse natural killer cells. **J Exp Med**, v. 190, p. 1801–1812, 1999.

VITALE M, BOTTINO C, SIVORI S et al. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. **J Exp Med**, v.187, p.2065–72, 1998.

VORA S, DAMON I, FULGINITI V, et al. Severe eczema vaccinatum in a household contact of a smallpox vaccinee. **Clin Infect Dis.**,v.46, n.10, p.1555-61, 2008.

VOSS, S. D *et al.* Participation of the CD94 receptor complex in costimulation of human natural killer cells. **J Immunol.**, v. 160, p. 1618-1626, 1998.

WARD BM. Visualization and characterization of the intracellular movement of vaccinia virus intracellular mature virions. **J Virol.**, v.79, n.8, p.4755-63, 2005.

WARD BM, MOSS B. Vaccinia virus intracellular movement is associated with microtubules and independent of actin tails. **J Virol.**, v.75, n.23, p.11651-63, 2001.

WERENNE, J., VANDEN BROECKE, C., SCHWERS, A., GOOSSENS, A., BUGYAKI, L., MAENHOUDT, M. & PASTORET, P. P. Antiviral effect of bacterially produced human interferon (Hu-IFN alpha 2) against experimental vaccinia infection in calves. **Journal of Interferon Research**, v. 5, p. 129–136, 1985.

WORTHINGTON M. Role of antibody in recovery from severe vaccinia virus infection. **Clin Infect Dis.**, v. 37(6), p. 864-5, 2003.

XIE YC, HWANG C, OVERWIJK W, ZENG Z, ENG MH, MULÉ JJ, IMPERIALE MJ, RESTIFO NP, SANDA MG. Induction of tumor antigen-specific immunity in vivo by a novel

vaccinia vector encoding safety-modified simian virus 40 T antigen. **J Natl Cancer Inst.**, v.91, n.2, p.169-75, 1999.

XU R, JOHNSON AJ, LIGGITT D, BEVAN MJ. Cellular and humoral immunity against vaccinia virus infection of mice. **J Immunol.**, v. 172(10), p. 6265-71, 2004 .

YAO Y, LI P, SINGH P, THIELE AT, WILKES DS, RENUKARADHYA GJ, BRUTKIEWICZ RR, TRAVERS JB, LUKER GD, HONG SC, BLUM JS, CHANG CH. Vaccinia virus infection induces dendritic cell maturation but inhibits antigen presentation by MHC class II. **Cell Immunol.**, v.246, n.2, p.92-102, 2007.

APÊNDICE A - Questionário realizado com os participantes da pesquisa durante o estudo de 2005

QUESTIONÁRIO

Data da notificação: ___/___/___
Nome do paciente: _____
Telefone para contato: _____
Endereço Residencial: _____
Nome do Local de Trabalho: _____
Endereço do Local de Trabalho: _____

Questionário Socioeconômico

- 1) Idade: _____
- 2) Data de Nascimento: ___/___/___
- 3) Sexo: () Masculino () Feminino
- 4) Estado Civil: () casado () solteiro () Outros _____
- 5) Qual é a sua cor ou raça?
() Branca
() Preta
() Parda
() Amarela
() Indígena
() Não desejo declarar
- 6) Função Exercida no Emprego: _____
- 7) Há quanto tempo trabalha neste local? _____
- 8) Possui outro emprego: () Sim () Não Qual? _____
- 9) Nível Instrução :
() Nenhum
() Ensino Fundamental incompleto até a 4a série

- Ensino Fundamental incompleto após a 4a série
- Ensino Fundamental completo
- Ensino Médio incompleto
- Ensino Médio completo
- Superior incompleto
- Superior completo
- Desconheço

10) Renda familiar:

- menos de 1 salário mínimo
- 1 salário mínimo
- entre 1 e 2 salários mínimos
- entre 2 a 5 salários mínimos
- mais de 5 salários mínimos

História pregressa

11) Você fuma?

- Sim
- Não

Em caso afirmativo, quantos cigarros por dia? _____

È tabagista há quanto tempo? _____

12) Você faz uso de bebidas alcoólicas?

- Sim
- Não

Em caso afirmativo, com qual frequência? _____

13) Possui alguma patologia?

- Diabetes Tipo I
- Artrite reumatóide
- Doença de Chron
- Lúpus eritematoso sistêmico
- Esclerose Múltipla
- Pênfigo
- Doença celíaca
- Outras. Qual? _____

14) Faz uso de algum medicamento de rotina?

- Sim.
- Não

Em caso afirmativo, qual é o medicamento? _____

15) Já apresentou algum sintoma semelhante a esta doença, anteriormente?

Sim.

Não

Em caso afirmativo, quando? _____

História atual da doença

16) O paciente apresenta sinais e sintomas da vacciniose no momento da inspeção?

Sim

Não

Em caso afirmativo, quais sinais e/ou sintomas podem ser identificados?

Febre . Durante quanto tempo?

Edema Local

Dor generalizada

Mal estar

Linfadenopatia

Calafrios

Vômitos

Nauseas

Conjuntivite

Icterícia

Cefaléia

Outros _____

Data do início dos sintomas: _____

17) O paciente apresenta lesões características de vacciniose?

Sim

Não

Em caso afirmativo, essas lesões estão localizadas em qual (is) membros e em qual número:

Membro afetado	Localização	Número de lesões	Tamanho da lesão (Principal)	Características da lesão (Principal)
	() Esq. () Dir.			() Exudato () Necrose () Infecção sec. () Dor () Edema () Calor () Rubor () Eritema () mácula () pápula () vesícula () pústula () ulcera () crosta () cicatriz Espessura () parcial () total
	() Esq. () Dir.			() Exudato () Necrose () Infecção sec. () Dor () Edema () Calor () Rubor () Eritema () mácula () pápula () vesícula () pústula () ulcera () crosta () cicatriz Espessura () parcial () total
	() Esq. () Dir.			() Exudato () Necrose () Infecção sec. () Dor () Edema () Calor () Rubor () Eritema () mácula () pápula () vesícula () pústula () ulcera () crosta () cicatriz Espessura () parcial () total
	() Esq. () Dir.			() Exudato () Necrose () Infecção sec. () Dor () Edema () Calor () Rubor () Eritema () mácula () pápula () vesícula () pústula () ulcera () crosta () cicatriz Espessura () parcial () total
	() Esq. () Dir.			() Exudato () Necrose () Infecção sec. () Dor () Edema () Calor () Rubor () Eritema () mácula () pápula () vesícula () pústula () ulcera () crosta () cicatriz Espessura () parcial () total
	() Esq. () Dir.			() Exudato () Necrose () Infecção sec. () Dor () Edema () Calor () Rubor () Eritema () mácula () pápula () vesícula () pústula () ulcera () crosta () cicatriz Espessura () parcial () total

18) Foi necessário afastamento do trabalho?

() Sim. Duração do afastamento: _____ dias

() Não

19) Foi necessária hospitalização?

() Sim. Duração da internação: _____ dias
() Não

20) Você recebeu vacinação contra varíola?

() Sim
() Não

Em caso afirmativo, possui marca vacinal no braço esquerdo?

() Sim
() Não

21) Você tem contato direto com animal doente?

() Sim
() Não

22) Você está em usando alguma medicação para esta doença?

() Sim
() Não

Em caso afirmativo, assinale qual:

() Antibióticos. Qual? _____
() Antiinflamatórios. Qual? _____
() Outros. Qual (is)? _____

7) Há outras pessoas da família com sinais e sintomas característicos da vacciniose?

() Sim
() Não

Em caso afirmativo, qual o grau de parentesco? _____

Quantas pessoas da sua família, além de você, foram afetadas pela doença? _____

Os familiares afetados pela doença têm contato com animal (gado) doente?

() Sim
() Não

APÊNDICE B - Questionário realizado com os participantes da pesquisa durante o estudo de 2009

QUESTIONÁRIO

Data da coleta de sangue: ___/___/___

Nome do paciente: _____

Telefone para contato: _____

Endereço Residencial: _____

Nome do Local de Trabalho: _____

Questionário Socioeconômico

1) Idade: _____

2) Data de Nascimento: ___/___/___

3) Sexo: () Masculino () Feminino

4) Estado Civil: () casado () solteiro () Outros _____

5) Qual é a sua cor ou raça?

() Branca

() Preta

() Parda

() Amarela

() Indígena

() Não desejo declarar

6) Função Exercida no Emprego na época em que ficou doente: _____

7) Quanto tempo trabalhou neste local? _____

8) Possuía outro emprego: () Sim () Não Qual? _____

9) Nível Instrução:

() Nenhum

() Ensino Fundamental incompleto (estudou até a 4ª série)

() Ensino Fundamental incompleto (estudou entre a 4ª e a 8ª série, mas não terminou)

() Ensino Fundamental completo (estudo da 1ª até a 8ª série)

() Ensino Médio incompleto (estudou entre o 1º e o 3º ano do 2º grau, mas não terminou)

() Ensino Médio completo (estudou do 1º ao 3º ano do segundo grau)

() Superior incompleto

() Superior completo

() Desconheço

10) Renda familiar:

() menos de 1 salário mínimo

() 1 salário mínimo

() entre 1 e 2 salários mínimos

- () entre 2 a 5 salários mínimos
 () mais de 5 salários mínimos

História pregressa

11) Você fuma?

- () Sim
 () Não

Em caso afirmativo, quantos cigarros **por dia**? _____

É tabagista há quanto tempo? _____

12) Você faz uso de bebidas alcoólicas?

- () Sim
 () Não

Em caso afirmativo, com qual frequência? _____

13) Possui alguma patologia?

- () Diabetes Tipo I () Artrite reumatóide
 () Doença de Chron () Lúpus eritematoso sistêmico
 () Esclerose Múltipla () Pênfigo

() Doença celíaca
 () Doenças cardíacas. Qual? _____

() Outras. Qual? _____

14) Faz uso de algum medicamento de rotina, ou seja, para controle de alguma doença?

- () Sim.
 () Não

Em caso afirmativo, qual é o medicamento? _____

15) Você está utilizando algum medicamento nesse momento?

- () Sim.
 () Não

Em caso afirmativo, qual é o medicamento?

- () Antiinflamatório, Corticóides. Qual? _____
 () Outros. Qual? _____

16) Na época em que você ficou doente (vacciniose), quais sintomas você apresentou?

- () Febre () Edema Local
 () Dor generalizada () Mal estar
 () Linfadenopatia (íngua) () Calafrios
 () Vômitos () Náuseas
 () Conjuntivite () Icterícia
 () Cefaléia (dor de cabeça)
 () Outros _____

17) Na época em que você ficou doente (vacciniose), você apresentou alguma lesão na pele?

- () Sim
 () Não

Em caso afirmativo, aonde apareceram essas feridas?

Membro afetado	Localização	Número aproximado de lesões
() Dedos	() Esq. () Dir.	
() Mãos	() Esq. () Dir.	
() Braços	() Esq. () Dir.	

<input type="checkbox"/> Face	<input type="checkbox"/> Esq. <input type="checkbox"/> Dir.	
<input type="checkbox"/> Nuca	<input type="checkbox"/> Esq. <input type="checkbox"/> Dir.	
<input type="checkbox"/> Cabeça	<input type="checkbox"/> Esq. <input type="checkbox"/> Dir.	
<input type="checkbox"/> Outras regiões	Quais? _____	

18) Na época em que ficou doente, foi necessário afastamento do trabalho?

- Sim. Duração do afastamento: _____ dias
 Não

19) Na época em que ficou doente, foi necessária hospitalização?

- Sim. Duração da internação: _____ dias
 Não

20) Você recebeu vacinação contra varíola?

- Sim
 Não

Em caso afirmativo, verificar se o indivíduo apresenta marca vacinal no **BRAÇO ESQUERDO** (geralmente em formato de cruz)?

- Sim
 Não

21) Na época em que ficou doente você tinha contato direto com animal doente (gado), ou seja realizava a ordenha dos animais?

- Sim
 Não

22) Na época em que ficou doente, outras pessoas da família também apresentaram a doença?

- Sim
 Não

Em caso afirmativo, qual o grau de parentesco? _____

Quantas pessoas da sua família, **ALÉM DE VOCÊ**, foram afetadas pela doença? _____

Os familiares afetados pela doença tinham contato com animal (gado) doente, ou seja, realizavam a ordenha?

- Sim
 Não

APÊNDICE C – Termo de consentimento livre e esclarecido apresentado aos participantes da pesquisa realizada em 2009

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Instituições: UFMG – ICB / Belo Horizonte, MG

FIOCRUZ – CPqRR / Belo Horizonte, MG.

Título do Projeto: **CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE INDIVÍDUOS ACOMETIDOS POR INFECÇÕES CAUSADAS POR ORTHOPOXVIRUS EM SURTOS ZONÓTICOS OCORRENDO NO BRASIL**

Investigadores Principais:

Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

Laboratório de Imunologia Celular e Molecular / Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ

Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira

Laboratório de Imunologia Celular e Molecular / Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ

Informações Gerais:

A vaccínia bovina é uma doença que ataca o gado e outros animais domésticos e é normalmente causada por um vírus denominado “Vaccinia”. No gado, a doença pode ser reconhecida pelo surgimento de pústulas e ferimentos nas tetas da vaca, embora este sinal clínico possa ocorrer em outras doenças que afetam o gado. Eventualmente, pessoas que entram em contato com animais infectados podem adquirir a doença. Em pessoas esta infecção pode causar prostração, febre, inchaço dos membros superiores, dor e surgimento de pústulas e ferimentos nas mãos e membros superiores. A doença é benigna e a cura espontânea ocorre em pouco tempo. Em pessoas imunocomprometidas o quadro clínico pode ser mais grave, com o surgimento de pústulas por todo o corpo. O vírus vaccínia é um vírus não-nativo ao Brasil e normalmente existente apenas em laboratórios. Entretanto, existem sinais de que ele pode estar circulando livre na natureza.

Descrição de Estudo:

Quando um surto de varíola bovina for detectado em sua localidade. Nossa equipe, chefiada pelo Dr. Flávio Guimarães da Fonseca (CPqRR), será chamada para analisar e acompanhar tanto os indivíduos doentes como aqueles não doentes mas que convivem na mesma localidade afetada pela doença. Vocês responderão a um questionário simples sobre suas atividades de rotina e seu estado de saúde será avaliado por um profissional de saúde. Indivíduos apresentando lesões da doença terão material colhido nos ferimentos com um cotonete estéril descartável. Este procedimento não causa dor ou desconforto algum. Indivíduos doentes e também aqueles que moram na mesma região e que concordarem em participar do estudo terão sangue colhido na veia do antebraço, local onde normalmente é colhido sangue para exames de rotina. Serão retirados 20 ml de sangue, que é pouco maior que a rotineiramente usada para exames de sangue.

Objetivo do Estudo:

O objetivo do estudo é analisar a resposta imunológica desenvolvida contra a infecção pelo vírus.

Benefícios do Estudo:

Sua participação neste estudo possibilitará maior conhecimento sobre a vaccínia bovina no Brasil e o vírus causador desta doença. Este estudo não acarretará em nenhum benefício imediato para o participante. No entanto, com o andamento do projeto, todo e qualquer achado que possa ser aplicado e revertido em benefício público será imediatamente implementado. O conhecimento gerado a partir de sua participação ajudará a se entender melhor como nosso organismo responde à infecção. Também auxiliará os agentes de saúde a se prepararem de forma eficiente para o surgimento de novos surtos e poderá indicar se existe a necessidade futura de vacinação contra o vírus ou não.

Riscos Potenciais:

Todo material utilizado é descartável ou estéril, portanto isento de risco de contaminação. Serão utilizadas seringas descartáveis individuais para cada paciente. Todo material utilizado será destruído em frente ao paciente. Durante a retirada do sangue você pode sentir um pequeno desconforto devido a introdução da agulha e em alguns casos raros poderá surgir um pequeno hematoma no local da retirada do sangue. Esse hematoma não tem a menor consequência para você e não acarretará em nenhum problema de saúde e desaparecerá em pouco tempo.

Acesso ao Projeto de Pesquisa em íntegra:

Para a realização deste Projeto, os pesquisadores o submeteram ao Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo seres humanos da Universidade federal de Minas Gerais e do Centro de Pesquisas René Rachou-FIOCRUZ. A íntegra do projeto está disponível para que todo e qualquer participante possa tomar conhecimento. Caso queira conhecer o projeto em detalhes, basta solicitar uma cópia ao Dr. Flávio Guimarães da Fonseca através do telefone número (31) (xx) 3409-2746, ou através da autoridade de saúde pública local.

Entendimento por parte dos participantes:

Fui informado e entendi que posso retirar meu consentimento e interromper minha participação neste projeto a qualquer momento. Posso discutir as questões relacionadas com minha participação neste projeto, com o Dr. Flávio Guimarães da Fonseca e, ou sua equipe, pelo telefone (31) (xx) 3409-2746 ou em sua residência telefone (31) (xx) 3024-5825. Como o Dr. Flávio está em Belo Horizonte, as despesas relacionadas aos telefonemas serão cobertas pelo projeto. Sempre que necessário o Dr. Flávio viajará até sua localidade para tomar quaisquer providências necessárias relacionadas ao estudo e seus participantes.

Consentimento:

Eu....., com base no exposto, tenho conhecimento de minha participação como voluntário no projeto de pesquisa.

Local e data _____

Assinatura do voluntário _____

Assinatura do Pesquisador Responsável _____

Assinatura de testemunha _____

ANEXO A – Número da aprovação do projeto no comitê de ética

Andamento do projeto - CAAE - 0062.0.203.000-08

Título do Projeto de Pesquisa
 CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE INDIVÍDUOS ACOMETIDOS POR INFECÇÕES CAUSADAS POR ORTHOPOXVIRUS EM SURTOS ZONÓTICOS OCORRENDO NO BRASIL

Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	14/03/2008 14:09:14	06/05/2008 14:30:28		

Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	13/03/2008 16:56:21	Folha de Rosto	FR181322	Pesquisador
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	14/03/2008 14:09:14	Folha de Rosto	0062.0.203.000-08	CEP
3 - Protocolo Pendente no CEP	17/04/2008 09:39:51	Folha de Rosto	62/08	CEP
4 - Protocolo Aprovado no CEP	06/05/2008 14:30:28	Folha de Rosto	62/08	CEP

[Voltar](#)

ANEXO B – ARTIGO 1



Profile of natural killer cells after a previous natural *Vaccinia virus* infection in an *in vitro* viral re-exposure



Eduardo Augusto dos Santos Moreira-Silva^{a,b,*}, Daniela Carla Medeiros-Silva^{a,b},
Juliana de Assis Silva Gomes^c, Flávio Guimarães da Fonseca^d, Rodrigo Correa-Oliveira^{a,b}

^a Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Ministério da Saúde, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 October 2013

Received in revised form 3 February 2014

Accepted 4 February 2014

Available online 11 February 2014

Keywords:

Vaccinia virus

Poxviridae infections

NK cells

Zoonoses

Smallpox vaccine

ABSTRACT

The present study compares the profile of NK cells in an *in vitro* re-exposure by *Vaccinia virus* (VACV), in groups that have had a previous vaccination or natural infection. Our data suggests that stimulation with VACV triggers a cytotoxic response by NK cells marked by an increase of NCRs: NKp30, NKp44, and NKp46 in infected (vaccinated and unvaccinated) subjects and in non-infected vaccinated patients, when compared with non-infected unvaccinated individuals. However, the degranulation and secretion processes are inhibited in infected (vaccinated and unvaccinated) subjects and in the non-infected vaccinated patients, when compared with non-infected unvaccinated individuals. We demonstrated that stimulation with VACV downregulates the percentage of expression of Perforin, Granzyme A, and CD107a, but upregulate CD94 in infected (vaccinated and unvaccinated) subjects and in non-infected vaccinated patients, when compared with non-infected unvaccinated individuals. Furthermore, the percentage of IFN- γ ⁺ NK cells was significantly lower in non-infected unvaccinated subjects, when compared with infected (vaccinated and unvaccinated) and non-infected vaccinated individuals. Our results also show that the percentage of TNF- α ⁺ NK cells was significantly higher in infected (vaccinated and unvaccinated) subjects and in non-infected vaccinated patients, when compared with non-infected unvaccinated individuals, after *in vitro* stimulation with UV-inactivated VACV. Our data suggest that the expression of NCRs NKp30, NKp44, NKp46 and cytokines by NK cells are important in the innate response against VACV.

© 2014 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Vaccinia virus (VACV) is the causative agent of a zoonotic infection that affects cattle and humans in many regions of Brazil and since 1969, VACV outbreaks have been reported in different regions of the country (Medeiros-Silva et al., 2010). Despite the fact that the number of human cases is still increasing and new epidemic foci have been reported, little is known about the human immunological response against VACV natural infection, but it is clear that both the innate and adaptative responses are important (Lewis-Jones, 2004).

Natural killer (NK) cells constitutes an important element of the innate immune response against *Poxvirus* (Bukowski et al., 1983;

Stitz et al., 1986). It has been described that VACV infection induces activation, proliferation, and accumulation of NK cells at the site of infection (Bukowski et al., 1983; Daniels et al., 2001; Dokun et al., 2001; Natuk and Welsh, 1987). It has been demonstrated that infection with *Orthopoxvirus* induces a marked increase in the susceptibility of target cells to lysis by NK cells and it seems that the natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44, and NKp46 are the most important NK cell receptors for the recognition of the VACV-infected target cell (Chisholm and Reyburn, 2006). Other NK cell receptors are well known to be involved in the immune response against *Poxvirus*. Among them are the surface molecules, CD161, that is involved in the inhibition process and is one of the earliest markers of NK cells (Rosen et al., 2005; Aldemir et al., 2005; Germain et al., 2011) and CD94 that has an essential role in the resistance of B6 mice to *Mousepoxvirus* (Fang et al., 2011).

Several new families of activators and inhibitory receptors have been recently identified on NK cells that have their activity determined by the balance of the expression of these receptors (Konjević et al., 2009). Although this has been shown to be critical there are no

* Corresponding author at: Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, Caixa Postal 486, CEP: 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil. Tel.: +55 31 88079591.

E-mail address: duduagusto1@yahoo.com.br (E.A.d.S. Moreira-Silva).

studies that evaluate the role of the different receptors expressed by NK cells against *Vaccinia virus* in human infection. In the present study, we evaluated the phenotype of NK cells expressing inhibitory markers (CD161), activation markers (CD94), natural cytotoxicity receptors (NKp30, NKp44, and NKp46), cytokines (IFN- γ and TNF- α), Granzymes (Granzyme A and B) and Perforins, after *in vitro* stimulation with UV-inactivated VACV following a natural *Vaccinia virus* infection after a zoonotic outbreak that occurred in Brazil in 2005.

2. Patients, materials, and methods

2.1. Study population

In 2005, a zoonotic outbreak of *Vaccinia virus* infection occurred in different areas in the state of Minas Gerais in Brazil. During the outbreak, blood from the affected individuals and from the cattle were collected and sent to Laboratory of Virus of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) and to the Immunology Laboratory in the Centro de Pesquisas Rene Rachou, FIOCRUZ-Minas to confirm the infection by VACV. As an extension of the studies during the outbreak, this investigation was initiated to evaluate the immune responses 5 year post exposure. The same individuals were recruited by our research group and blood collected at the 5-year time point to investigate the NK cells phenotype after *in vitro* stimulation with the virus. A total of 42 individuals were included in this study (Table 1). Out of the 42 individuals, 22 were previously infected by VACV and 20 were not affected by the disease. Important to note that out of the 22 infected individuals, 12 were vaccinated against smallpox and 10 were unvaccinated. Out of the 20 non-infected individuals, 10 were previously vaccinated and 10 were normal healthy individuals unvaccinated (negative control). Infections and/or vaccinations were confirmed with Plaque-reduction neutralization tests and/or IgG ELISA tests. Vaccinated individuals were identified by their vaccination card and/or vaccination scar. All study participants provided written informed consent following the guidelines of the Human Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais.

2.2. Viruses and cells

Vero cells were used for virus replication, titration and UV inactivated viral test (Campos and Kroon, 1993). A thin layer of viral stocks, at a distance of 15 cm, were exposed 5 to 10 min to UV radiation at a wavelength of 280 nm. UV irradiated viruses were then tested for virus infectivity. Viruses that were unable to form plaques were considered to be UV inactivated. The infectious and cytopathic nature of VACV live virus limits its use in some applications, because it causes the host cell's death. UV inactivated VACV were used because it has been demonstrated that treatment of VACV with UV light results in the inactivation of viral replication without the abolition of viral transcription under early viral promoters. Furthermore, the antigenicity of the UV-inactivated VACV was found indistinguishable from that of the replicating VACV, both for restimulating the VV-primed cytotoxic T lymphocytes and serving as the cytotoxic T-lymphocyte target *in vitro* (Tsung et al., 1996). The cytopathic effect (CPE) of infection with VACV in particular includes the induction of early cell rounding, damage to the host genome and RNA, inhibition of host protein synthesis, and eventually, death of the infected cells (Bablanian, 1975).

2.3. Cell phenotype analysis

In vitro short-term cultures of whole blood samples were performed. Whole blood cells were stimulated *in vitro* with

UV-inactivated VACV in RPMI 1640 media for 6 h at 37 °C. Approximately 1×10^4 PFU of *Vaccinia virus* strain WR were added per 1×10^6 leukocytes. Control cultures were maintained in culture media for the same period of time. Cultured cells were washed in FACS buffer and stained with monoclonal antibodies against CD3 (FITC, BD-Pharmingen, clone HIT3a), CD16 (PerCp, EXBIO, clone LNK16) and CD56 (APC, BD-Pharmingen, clone B159). The same cells were labeled simultaneously with antibodies against CD94 (PE, BD-Pharmingen, clone HP-3D9), CD107a (PE, BD-Pharmingen, clone H4A3), NKp30 (PE, BD-Pharmingen, clone P30-15), NKp44 (PE, BD-Pharmingen, clone P44-8.1), NKp46 (PE, BD-Pharmingen, clone 9E2/Nkp46). Cell preparations were fixed in FACS fix solution and stored at 4 °C in the dark. A total of 100,000 events/tube were acquired using a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson). CELLQuest™ software was used for data acquisition and the FLOW JO Version 7.5.5 software for analysis.

2.4. Intracellular cytokine staining (ICCS)

Whole blood was stimulated *in vitro* with UV-inactivated VACV as described above. During the last 4 h of culture, Brefeldin A was added. Cultured cells were washed twice in FACS buffer and stained with monoclonal antibodies specific for the different cell-surface markers, as described above. The cells were then permeabilized in saponin buffer and stained intracellularly with monoclonal antibodies against IFN- γ (PE, BD-Pharmingen, clone 4S.B3), TNF- α (PE, BD-Pharmingen, clone 6401.1111), Perforin (PE, BD-Pharmingen, clone δ G9), Granzyme A (PE, BD-Pharmingen, clone CB9) and Granzyme B (PE, BD-Pharmingen, clone GB11). A total of 100,000 events/tube were acquired using a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences, USA). The samples were analyzed by using FlowJo software (Tree Star—Version 7.5.5).

2.5. FACS analysis of surface markers and intracellular cytokine

NK cells were analyzed for their intracellular cytokine expression patterns and frequencies as well as for cell surface markers using the FlowJo software (Tree Star—Version 7.5.5), as described in Supplementary Fig. 1. (A) First we performed the identification of peripheral lymphocytes population in diagram of FSC \times SSC (R1) (Fig. S1A). Second we made dot plots of FSC \times FL-1, displaying the frequency of CD3⁺ and CD3⁻ cells. Thus, CD3⁻ cells were selected (R2) (Fig. S1B). Third, dot plots of FL-3 \times FL-4 were made displaying the frequency of CD3⁻CD16⁻CD56⁺, CD3⁻CD16⁺CD56⁻, CD3⁻CD16⁺CD56⁺ populations (R3) (Fig. S1C). Finally, we made dot plots of FSC \times FL-2, displaying the frequency of NK cells, co-expressing the marker CD107a (R4) (Fig. S1D). The same strategy was used to select the frequency of NK cells, co-expressing NKp30, NKp44, NKp46, CD161, CD94, IFN- γ , TNF- α , Granzyme A, Granzyme B and Perforin (R4) (figure not shown). Limits for the quadrant markers were always set based on negative populations and isotype controls.

2.6. Statistical analysis

Analyses were performed using GraphPad Prism version 4.0 software (GraphPad Software Inc, USA). The nonparametric Mann–Whitney *U* test was performed to compare stimulated and non-stimulated cultures in each of the four groups. Kruskal–Wallis test was used to compare the four clinical groups, followed by Dunn's test to compare all pairs of experiments. Differences were considered significant when the *p* value was less than 0.05.

Table 1
Characterization of the population involved in the study.

Groups	Vaccination status	Number of individuals studied	Mean age (min–max)	Gender (n)	
				Male	Female
Previously infected*	Vaccinated**	12	56 (42–68)	12	0
	Unvaccinated	10	24.5 (18–34)	10	0
Noninfected	Vaccinated***	10	46.4 (39–62)	7	3
	Unvaccinated	10	29.2 (28–31)	6	4

* These individuals were infected with *Vaccinia virus* during outbreaks that occurred in 2005 in different farms in the state of Minas Gerais, Brazil.

** Importantly, out of 22 individuals previously infected, 12 were vaccinated against smallpox in the past, as confirmed by visualization of a typical vaccination scar in their left arm.

*** Of the 20 individuals noninfected, 10 were vaccinated against smallpox in the past, as confirmed by visualization of a typical vaccination scar in their left arm and data from vaccination card.

3. Results

3.1. Previous vaccination against smallpox leads to a milder form of VACV infection

In this study some infected individual were previously vaccinated against smallpox. Despite their vaccination status they acquired VACV infection. In order to evaluate the clinical differences between vaccinated and unvaccinated infected individuals was previously validated by a questionnaire applied to all volunteers. It was observed that the mean age was 24.5 years in unvaccinated individuals and 56 years in the vaccinated group. All subjects studied were male, milkers and the average of time worked in this function was 18 years among the unvaccinated individuals and 32 years in the vaccinated group. None of these individuals reported having a prior infection by VACV. It was observed that the number and type of symptoms (fever, generalized pain, lymphadenopathy, headache, and others) presented by unvaccinated and vaccinated individuals were significantly different. The average of symptoms was of 6, ranging from 4 to 7 symptoms, in unvaccinated individuals and 2.5, ranging from 1 to 7 in vaccinated patients, with mild features. In relation to the features of the lesions, the vaccinated individuals had an average of 2.5 injuries and unvaccinated individuals had an average of 8 lesions. In relation to the place of occurrence of the lesions in vaccinated subjects they concentrated largely on the hands (100%) and small events in other regions (17%) (nose, neck, and legs), while in unvaccinated individuals, the primary site of involvement was also on the hands (100%), but its occurrence in other regions was more significant (40%). Analysis of the days of leave of absence due to illness was 25% of the vaccinated group, which had an average of 10 days off, and in unvaccinated subjects an average of 15 days of sick leave for 60% of the individuals. There were two hospitalizations due to symptoms developed after treatment. There were no lethal cases. We had reports that family members had also contracted the infection by VACV in both groups analyzed.

3.2. Natural cytotoxicity receptors (NCR) are expressed at higher percentages in individuals who had been previously exposed to *Vaccinia virus*

In order to evaluate NK cells phenotype, after *in vitro* stimulation with UV-VACV, triple and fourth labeling were used. Initially the cells were stained simultaneously against CD3, CD16 and CD56. The same cells were then labeled against NK cell receptors, CD161, CD94, CD107a, NKp30, NKp44 and NKp46 to evaluate the expression of these molecules in the NK cell surface. The NK cells phenotype was defined based on the relative expression of the CD16 (or FcRIIIA, low-affinity receptor for the Fc portion of immunoglobulin G) and CD56 (adhesion molecule mediating homotypic adhesion) markers in five NK cell subpopulations: (1) CD56^{bright}CD16⁻ (50–70% of CD56^{bright}), (2) CD56^{bright}CD16^{dim}

(30–50% of CD56^{bright}), (3) CD56^{dim}CD16⁻, (4) CD56^{dim}CD16^{bright}, and (5) CD56⁻CD16^{bright} (Cooper et al., 2001; Mavilio et al., 2005; Caligiuri, 2008).

The results did not show any significant difference in the mean percentage of natural killer cells in the four groups, after *in vitro* stimulation with UV-inactivated VACV when compared to control cultures (Table 2). The analysis of NK cells subpopulations did not show any significant difference (data not shown).

Analysis of the expression of natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44, and NKp46 showed a significant increase in the mean percentages of NK cells co-expressing NKp30 and NKp44 in the infected individuals (vaccinated and unvaccinated) and in non-infected vaccinated subjects, when stimulated and control cultures were compared (Fig. 1A–D). This was not observed in the non-infected unvaccinated group. Interestingly, the expression of NKp44 receptor, was lower in the non-infected unvaccinated group, when stimulated and control cultures were compared (Fig. 1C). It was also observed that NK cells co-expressing NKp30 or NKp44 were at higher percentages only in infected (vaccinated and unvaccinated) and in non-infected vaccinated patients, when compared to non-infected unvaccinated subjects, after stimulation with UV-inactivated VACV (Fig. 2A and B). However, our data showed that expression of NKp46 by NK cells was significantly higher only in the infected individuals (vaccinated and unvaccinated) when compared control and stimulated cultures (Fig. 1E and F). Previously infected subjects (vaccinated or not) had higher percentages of NK cells co-expressing NKp46, when compared with non-infected individuals (vaccinated or not) (Fig. 2C).

3.3. *In vitro* stimulation with UV-inactivated VACV upregulates CD161 and downregulates the CD107a

In order to study the inhibitory receptors expressed by NK cells, we analyzed CD161 molecule, which is one of the earliest markers of NK cells (Di Santo, 2006), firstly designated as an activating receptor (Azzoni et al., 1998), however the expression of this marker by NK cells has also been shown to have inhibitory activity (Rosen et al., 2005; Aldemir et al., 2005; Germain et al., 2011). Our results showed an increase on the percentage of NK cells co-expressing CD161 in the infected (vaccinated and unvaccinated)

Table 2

Mean percentage of NK cells on the whole blood from individuals infected (vaccinated and unvaccinated) and noninfected (vaccinated and unvaccinated) by *Vaccinia virus* after *in vitro* stimulation with UV-inactivated VACV.

Groups		NK cells/std. deviation
Noninfected	Unvaccinated	30.52 ± 4.87
	Vaccinated	35.26 ± 8.89
Infected	Unvaccinated	26.72 ± 7.89
	Vaccinated	30.79 ± 8.06

There were no statistically significant differences in the mean percentage of NK cells when the four groups were compared.

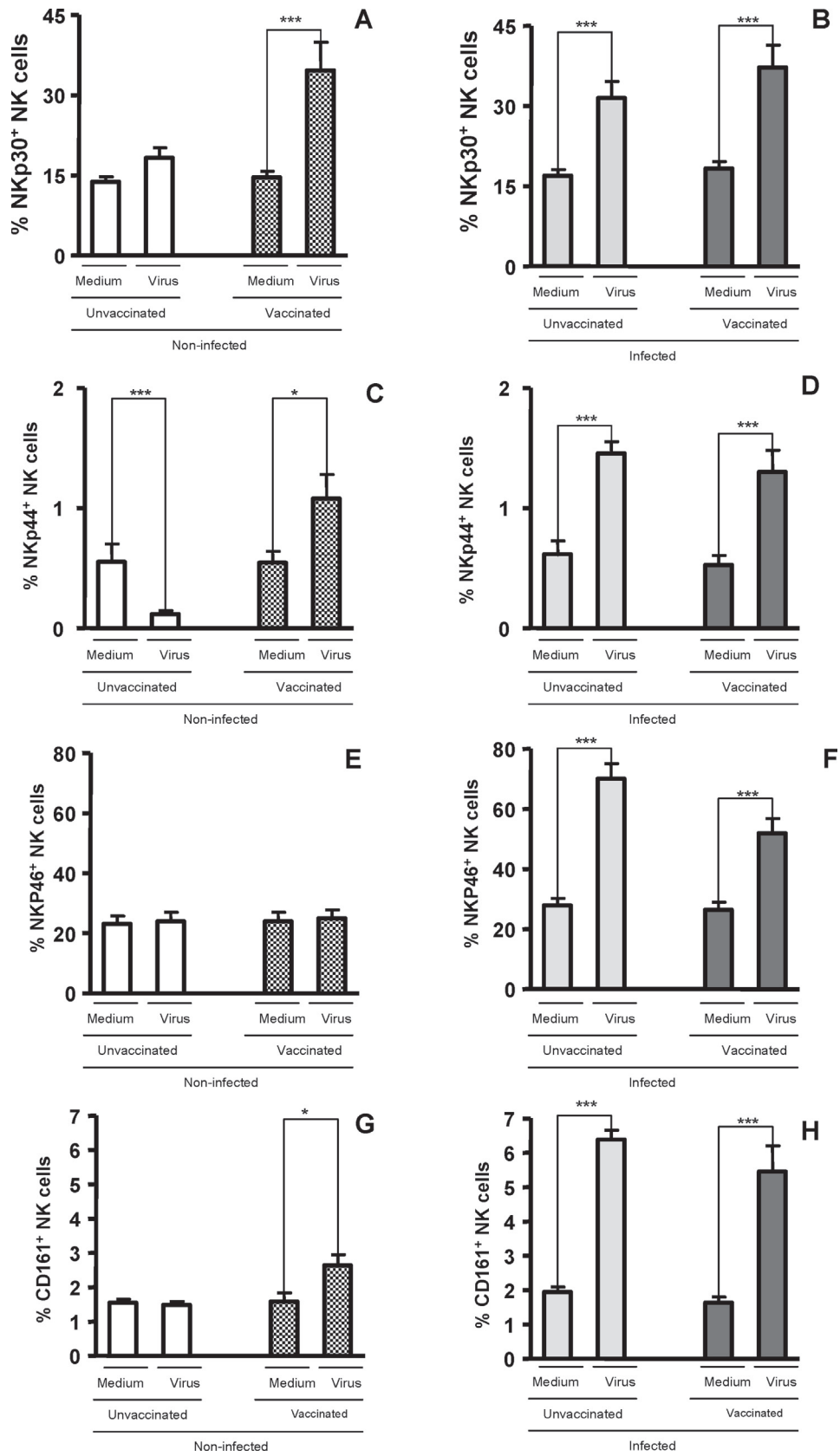


Fig. 1. NCR's evaluation of NK cells in the whole blood cells from individuals previously infected or not by zoonotic *Vaccinia virus*, before and after viral stimulation. Whole blood cells from patients infected or not with zoonotic *Vaccinia virus* were stimulated in the presence of UV-inactivated VACV or medium. The percentages of NK cells expressing Nkp30, Nkp44, Nkp46 and CD161 in control and stimulated cultures from infected and non-infected groups were evaluated by flow cytometry. (A and B) Percentage of Nkp30⁺ NK cells. (C and D) Percentage of Nkp44⁺ NK cells. (E and F) Percentage of Nkp46⁺ NK cells. (G and H) Percentage of CD161⁺ NK cells. The differences between the groups are considered significant at *p* less than 0.05 and are represented by * *p*, 0.05, ** *p*, 0.01 and *** *p*, 0.001.

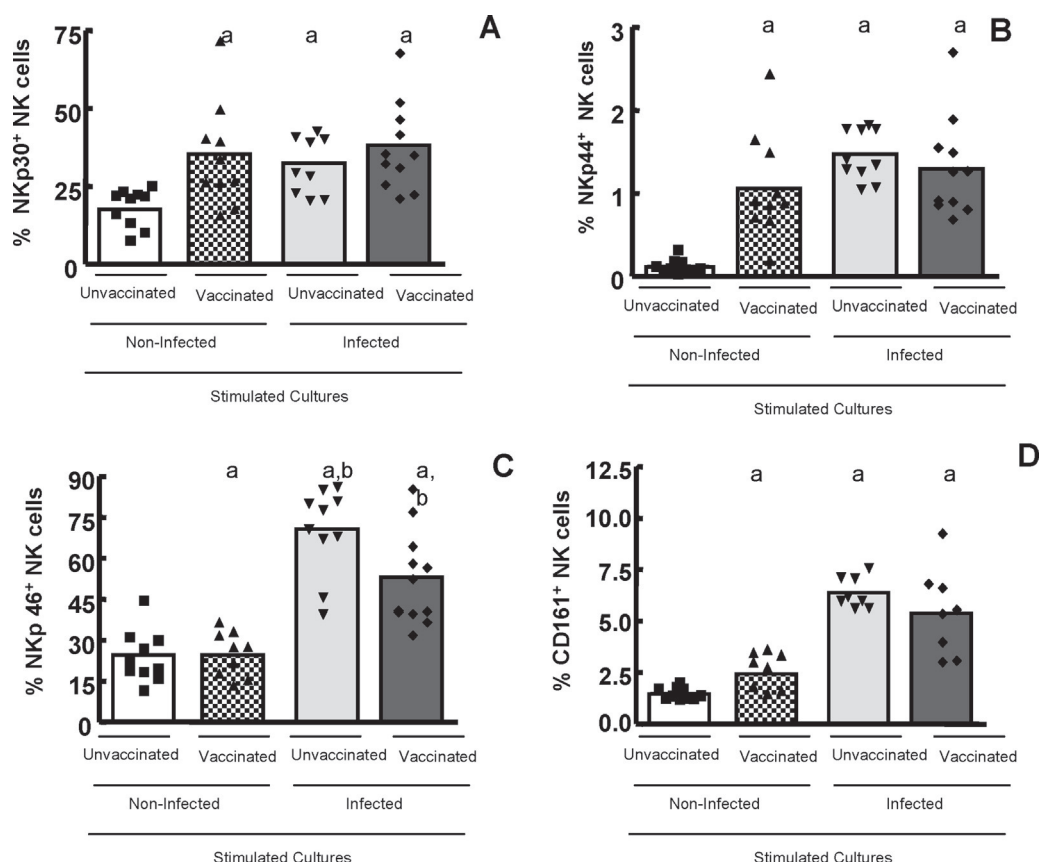


Fig. 2. NCR's evaluation of NK cells in the whole blood cells from individuals previously infected or not by zoonotic *Vaccinia virus*, after viral stimulation. Whole blood cells from patients infected or not with zoonotic *Vaccinia virus* were stimulated in the presence of UV-inactivated VACV or medium. After stimulus, NK cells from infected and non-infected individuals were labeled with mouse anti-human Nkp30, Nkp44, Nkp46 and CD161. (A) Percentage of Nkp30⁺ NK cells, after viral stimulation. (B) Percentage of Nkp44⁺ NK cells, after viral stimulation. (C) Percentage of Nkp46⁺ NK cells, after viral stimulation. (D) Percentage of CD161⁺ NK cells, after viral stimulation. The differences between the groups are considered significant at *p* less than 0.05. (a) Different from non-infected unvaccinated. (b) Different from non-infected vaccinated.

and in non-infected vaccinated subjects, when control and stimulated cultures were compared. No significant difference was observed in the non-infected unvaccinated group (Fig. 1G and H). When the four groups were compared after viral stimulation, our data showed that CD161 positive NK cells were at higher percentages only in the groups that had previous contact with VACV, either through vaccination or natural infection, when compared to non-infected unvaccinated subjects. Furthermore, previously infected individuals (vaccinated and unvaccinated) had higher percentages of this cells when compared to non-infected vaccinated subjects, after stimulation with UV-inactivated VACV (Fig. 2D).

Since the NK cells of the studied individuals were observed to be activated as measured by NCRs staining, the degranulation process was evaluated using the CD107a molecule. CD107a is a degranulation marker of NK cell and its expression correlates with both cytokine secretion and NK cell-mediated lysis of target cells (Alter et al., 2004). Our results showed that CD107a expression on the surface of NK cells was significantly decreased in all four groups studied, when control and stimulated cultures were compared (Fig. 3A and B). No differences were observed between the four groups, when stimulated cultures were compared (data not shown).

3.4. VACV induced a decrease in the expression of Granzyme A and Perforin by NK cells but did not affect the percentage of NK cells co-expressing Granzyme B

Labeling of peripheral blood NK cells with antibodies against Granzyme A, B, and Perforin was performed to evaluate the

process of cytotoxicity of natural killer cells. Expression of Perforin and Granzyme A by NK cells were significantly lower when control and stimulated cultures were compared in all four groups (Fig. 3C–F). Our data did not show any significant difference on the percentage of NK cells co-expressing Perforin and Granzyme A among the four groups when stimulated cultures were compared (data not shown). A decrease in the percentage of NK cells expressing Granzyme B in non-infected unvaccinated group was observed when stimulated and control cultures were compared. Nonetheless, the percentage of these cells was higher in the infected (vaccinated and unvaccinated) and in the non-infected vaccinated individuals, when compared to noninfected unvaccinated group, after stimulation with UV-inactivated VACV (Fig. 3G and H).

3.5. VACV stimulation upregulates CD94 expression

CD94 is another surface molecule involved in the development and maturation of NK cells (Carretero et al., 1997; Lazetic et al., 1996; Phillips et al., 1996). CD94 receptors have been proposed to be important in NK cell tolerance to self, and contribute to NK cell-mediated immunity to viral infections (Orr et al., 2010). In this study, the mean percentage of CD94 positive NK cells were higher in infected (vaccinated and unvaccinated) and in non-infected vaccinated individuals, when control and stimulated cultures were compared (Fig. 4A and B). No significant difference between non-infected and infected groups was observed after viral stimulation (Fig. 4C).

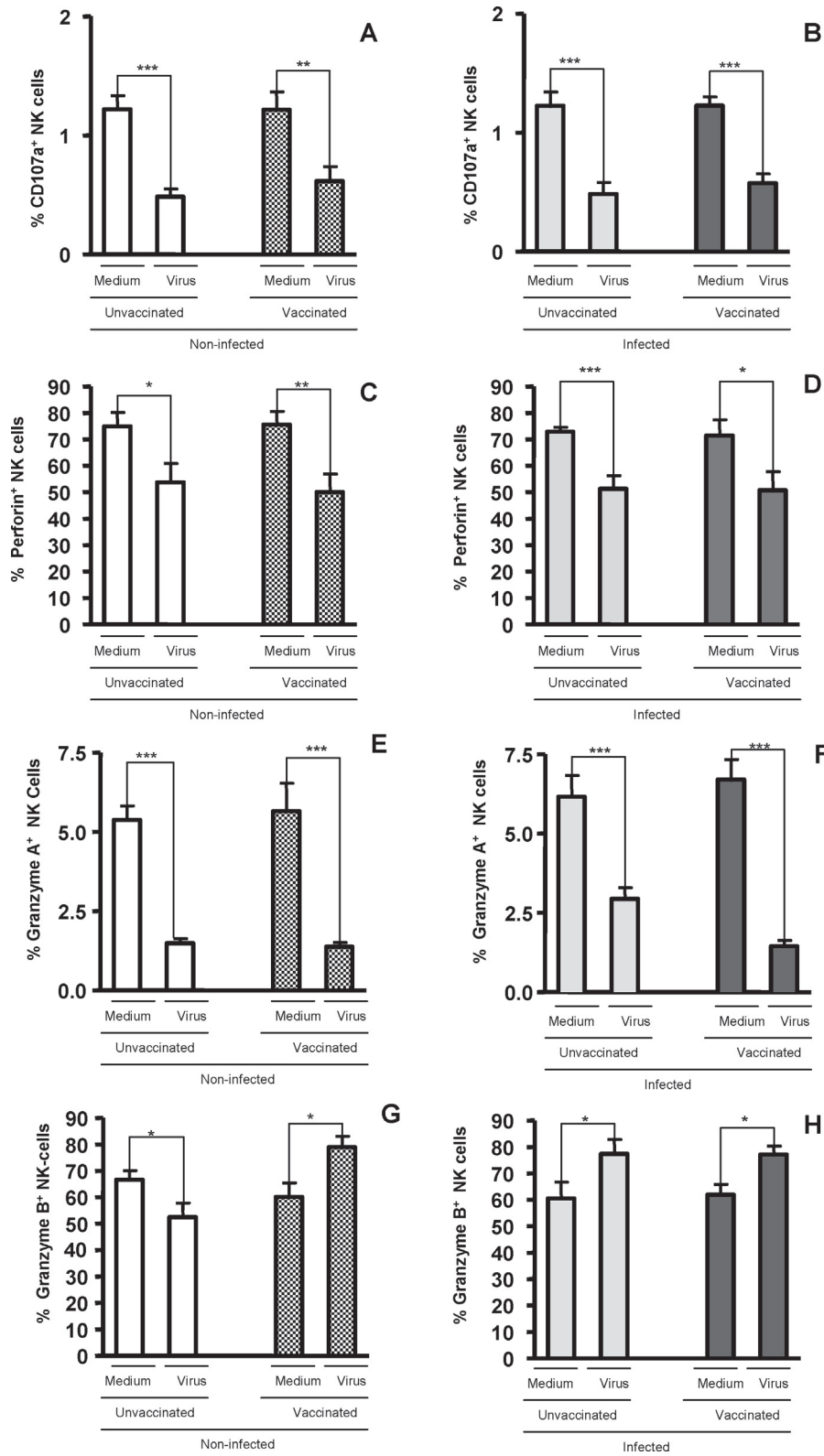


Fig. 3. Evaluation of the percentage of NK cells expressing CD107a, Perforin, Granzyme A and Granzyme B from infected and non-infected individuals, before and after viral stimulation. The percentages of CD107a⁺, Perforin⁺, Granzyme A⁺ and Granzyme B⁺ NK cells were evaluated by flow cytometry. (A and B) CD107a⁺ NK cells. (C and D) Perforin⁺ NK cells. (E and F) Granzyme A⁺ NK cells. (G and H) Granzyme B⁺ NK cells. The differences between the groups are considered significant at *p* less than 0.05 and are represented by * *p*, 0.05, ** *p*, 0.01 and *** *p*, 0.001.

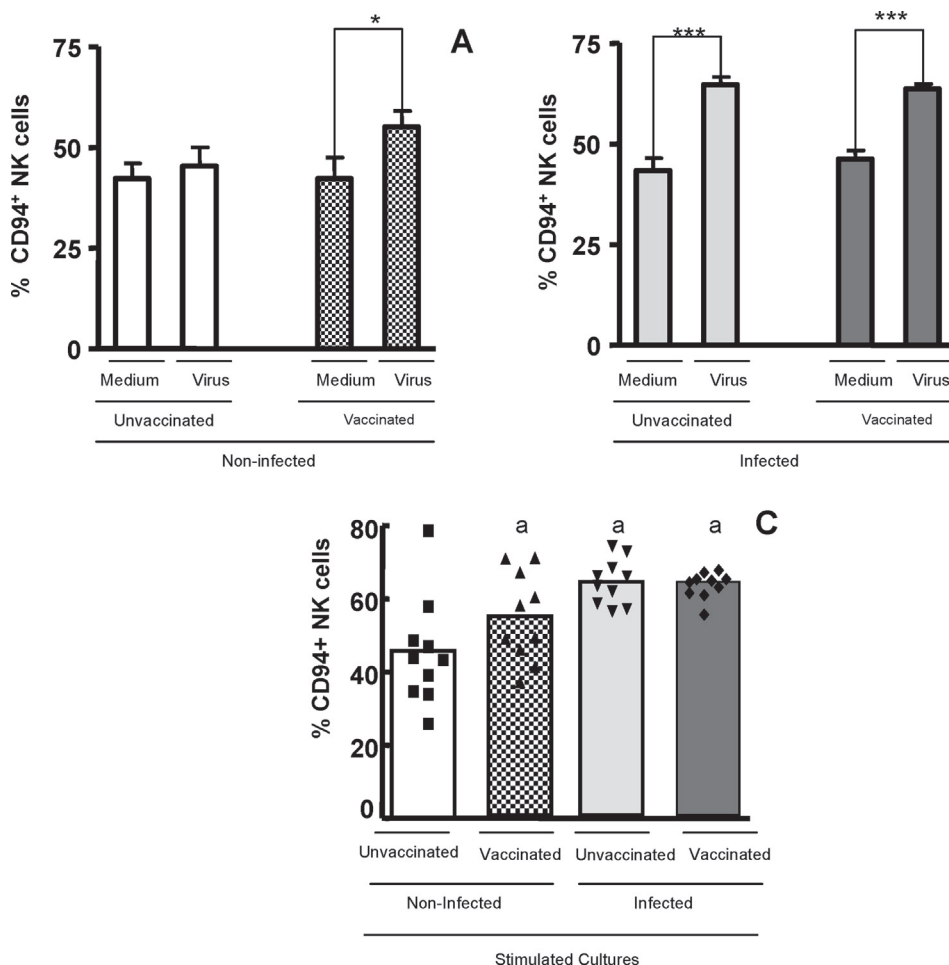


Fig. 4. Evaluation of NKCD94⁺ cells in the whole blood cells from individuals previously infected or not by zoonotic *Vaccinia virus*. Whole blood cells from patients infected or not with zoonotic *Vaccinia virus* were stimulated in the presence of UV-inactivated VACV or medium. After stimulus, NK cells were labeled with mouse anti-human CD94 antibody. (A and B) Percentage of NKCD94⁺ in control and stimulated cultures from infected and non-infected groups. (C) Percentage of NKCD94⁺ from infected and non-infected groups, after viral stimulation. The differences between the groups are considered significant at *p* less than 0.05 and are represented by * *p*, 0.05, ** *p*, 0.01 and *** *p*, 0.001. (a) Different from non-infected unvaccinated.

3.6. Previous exposure to *Vaccinia virus* leads to higher percentages of NK-TNF- α positive cells but not the number of NK-IFN- γ positive cells

Our results showed that the percentage of IFN- γ ⁺ NK cells was significantly lower in the non-infected unvaccinated group, when control and stimulated cultures were compared (Fig. 5A and B). No significant differences between non-infected and infected groups were observed, when the stimulated cultures were compared (Fig. 5E). Our data showed that the percentage of TNF- α ⁺ NK cells was significantly higher in infected (vaccinated and unvaccinated) and in non-infected vaccinated individual, when control and stimulated cultures were compared (Fig. 5C and D). Analysis of stimulated cultures of the four groups demonstrated a higher percentage of TNF- α positive NK cells only in the infected individuals (vaccinated and unvaccinated), when compared to non-infected (vaccinated and unvaccinated) subjects (Fig. 5F).

4. Discussion

In the course of VACV infection, the activation, proliferation, and recruitment of NK cell at the site of infection has been shown to be necessary for virus clearance (Bukowski et al., 1983; Daniels et al., 2001; Dokun et al., 2001; Natuk and Welsh, 1987). Furthermore, NK cells have long been proposed to mediate an important element

in the protective response against different *Poxvirus* (Bukowski et al., 1983; Stitz et al., 1986). Previous work indicates that 6 h are sufficient for NK cells to be activated at the primary site of infection (Prlic et al., 2005). These previous works had demonstrated the importance of NK cells against VACV, using murine models or individuals vaccinated against *Smallpox*. In this study the phenotype of NK cells were described following a natural *Vaccinia virus* infection and compared with the profile of NK cells induced by smallpox vaccination. Thus, 22 previously infected individuals and 20 non-infected individuals were selected. Out of the 22 previously infected individuals, 12 were vaccinated against smallpox and 10 were unvaccinated. From 20 non-infected individuals, 10 were vaccinated and 10 unvaccinated. It is interesting to note that in the previously infected group, 12 individuals were vaccinated against smallpox and despite their vaccination status, they acquired the VACV infection, but developed a milder form.

We demonstrated in a precedent work that previously infected individuals (vaccinated or not) have higher percentages of T memory cells when compared to non-infected individuals (both vaccinated and unvaccinated). It was also detected that just the infected individuals (vaccinated and unvaccinated) presented higher percentages of effector-memory T cells (T_{EM}), capable to produce IFN- γ and TNF- α . In the non-infected individuals (vaccinated and unvaccinated), this increase in the mean percentage of T

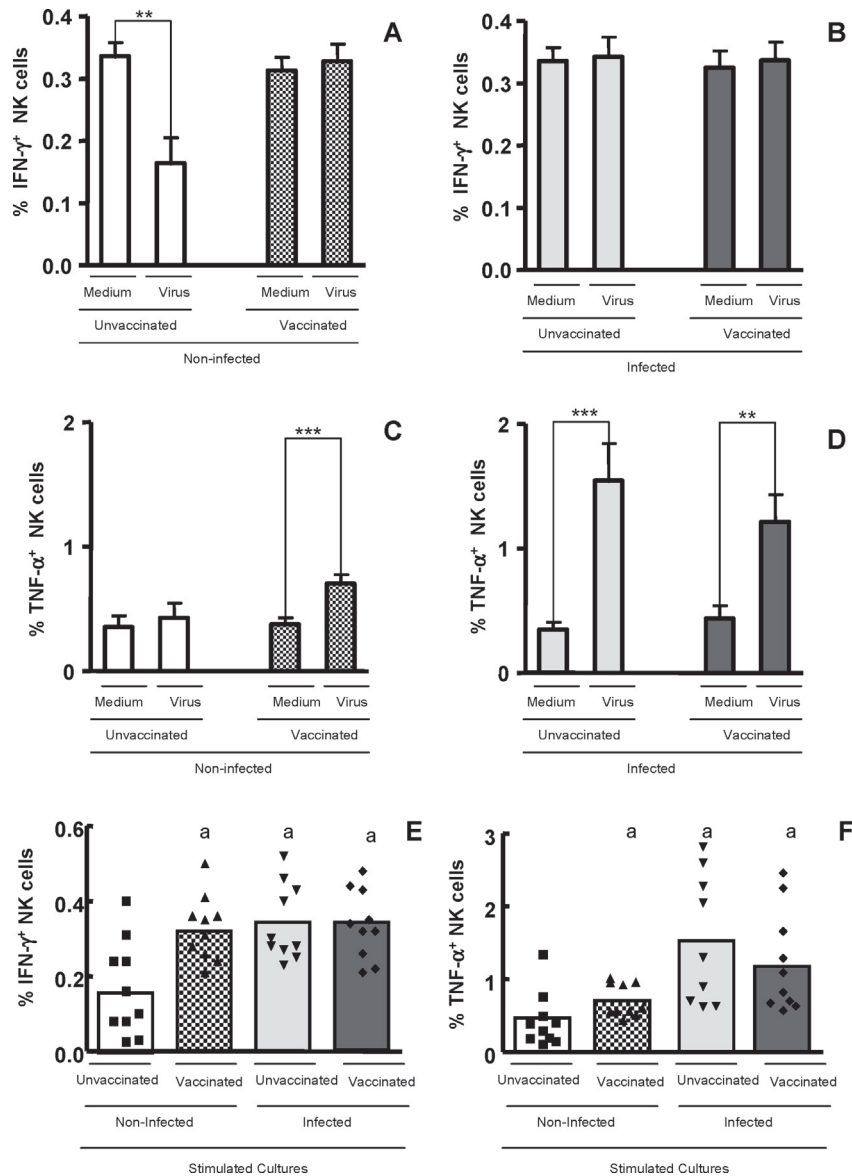


Fig. 5. Intracellular TNF- α and IFN- γ detection in NK cells in the whole blood cells from individuals previously infected or not by zoonotic *Vaccinia virus*, before and after viral stimulation. Whole blood cells from patients infected or not with zoonotic *Vaccinia virus* were stimulated in the presence of UV-inactivated VACV or medium. The percentages of NK cells expressing TNF- α and IFN- γ in control and stimulated cultures from infected and non-infected groups were evaluated by flow cytometry. (A and B) Percentage of IFN- γ ⁺ NK cells in control and stimulated cultures. (C and D) Percentage of TNF- α ⁺ NK cells in control and stimulated cultures. (E) Percentage of IFN- γ ⁺ NK cells, after viral stimulation. (F) Percentage of TNF- α ⁺ NK cells, after viral stimulation. The differences between the groups are considered significant at p less than 0.05 and are represented by ^{*} p , 0.05, ^{**} p , 0.01 and ^{***} p , 0.001. (a) Different from non-infected unvaccinated.

CD4 memory lymphocytes expressing IFN- γ was not observed (Orr et al., 2010).

In our studies, we also observed that recent infection by VACV induced a more significant CD4 and CD8 effector memory response when we compared previously infected individuals (vaccinated and unvaccinated) to non-infected vaccinated patients (Orr et al., 2010). Once we demonstrated that CD4 and CD8 T cells were involved in the immune memory response following a natural infection with *Vaccinia virus*, we developed this work since it is well known that both the innate and adaptive responses are important to clear the infection (Lewis-Jones, 2004). We aimed to describe the phenotype of NK cells in the whole blood cells from previously infected and non-infected individuals, to better understand the human immunological response against VACV natural infection.

It is well known that different receptor–ligand interactions are responsible for NK-cell activation upon interaction with target cells.

In this study, we determined the profile of activation, degranulation and inhibition of NK cells following a natural *Vaccinia virus* infection and compared it to NK cells phenotype of non-infected individuals, previously vaccinated or not against smallpox. It has been described that natural cytotoxic receptors (NCRs) are involved in NK-cell activation upon interaction with target cells. In our work, we demonstrated an increase in the expression of these natural cytotoxic receptors (NCRs) NKp30, NKp44 and NKp46 by NK cells, after viral stimulation, only in individuals that were previously exposed to VACV, either by vaccination against smallpox or recent natural infection. Our data also showed that the percentage of NK cells expressing NKp44 was lower in the non-infected unvaccinated individuals, when control and stimulated cultures were compared. A significant increase on the percentage of NK cells expressing NKp46 were observed when we compared control and stimulated cultures of infected individuals (vaccinated and unvaccinated), but not in the non-infected groups (vaccinated and

unvaccinated). When we analyzed the stimulated cultures of the four groups, we observed higher percentages of Nkp46⁺ cells in previously infected individuals compared with non-infected subjects (vaccinated or not). We also observed a higher percentage of Nkp46⁺ cells in non-infected vaccinated individuals compared to non-infected unvaccinated patients. Our data suggest that NCRs are involved in VACV recognition after a previous exposure to antigen and probably participate in the immune response to clear the infection. A precedent work demonstrated that pre-treatment of NK cells with a cocktail of MAbs specific for all three NCRs completely blocked NK recognition of VACV-infected cells (Chisholm and Reyburn, 2006). This demonstrates the importance of NCR's in viral recognition and clearance.

Another surface marker analyzed in this work was the CD94 molecule. Our data demonstrated an increase on the percentage of NK cells expressing this marker in the infected (vaccinated and unvaccinated) and non-infected vaccinated individuals, when compared with non-infected unvaccinated subjects, after viral stimulation. Previous work with murine models demonstrated that CD94 has an essential role in resistance of infected mice with *Ectromelia virus* (Fang et al., 2008, 2010, 2011). So, we can speculate that the up regulation of this molecule detected in our work is probably associated with the resistance against *Vaccinia virus* as it has been demonstrated in previous works with *Ectromelia virus* (Fang et al., 2008, 2010, 2011). However, our data showed that only infected (vaccinated and unvaccinated) and non-infected vaccinated individuals, had higher percentages of NK cells expressing CD94, when compared with non-infected unvaccinated subjects, after viral stimulation, suggesting that previous exposure may affect the expression of this markers by NK cells leading to faster elimination of the virus.

The finding of higher percentages of NK cells expressing NCR's (Nkp30, Nkp44 and Nkp46) suggests it is important role in these cells. However, it is also known that the degranulation and secretion processes of NK cells may also be inhibited after viral stimulation. Therefore, in order to determine whether inhibition of degranulation was occurring, we NK cells were intracellular staining for Perforin, Granzyme A and B and CD107a. Our results showed that after *in vitro* stimulation with *Vaccinia virus* the percentages of Perforin⁺, Granzyme A⁺ and CD107a⁺ NK cells were lower, in previously infected (vaccinated and unvaccinated) and non-infected vaccinated individuals, when compared to non-infected unvaccinated subjects. Moreover, VACV induced an increase in the percentage of NK cells expressing CD161, an inhibitory molecule (Rosen et al., 2005; Aldemir et al., 2005), and Granzyme B, in these same groups of individuals. This was not observed in non-infected unvaccinated individuals. This downregulation of molecules that are involved in the degranulation and secretion processes associated with the upregulation of CD161, an inhibitory molecule, found in our work, could lead to an impaired NK cell immune response against *Vaccinia virus*, in these individuals, but the mechanisms of this process must be studied.

Experiments in murine models suggested that Perforin-mediated cytotoxicity was not required for resistance to VACV, Vesicular stomatitis virus, or Semliki Forest virus (Kagi et al., 1995). Furthermore, mice of the highly EV-resistant C57BL/6 background have an increased loss of resistance to EV when mutant mice deficient in GrA, GrB, or GrA and GrB were evaluated (Mullbacher et al., 1999). These studies demonstrated that mice lacking Perforin or Granzymes were unable to control primary EV infection and suggested an important role for these serine proteases in resistance to poxviruses. Our results do not show similar data but they suggest that in human infection the balance between Perforin and Granzymes is necessary for the immune response against VACV infection.

We also evaluated the expression of intracellular cytokines by NK cells and the data showed that the percentage of IFN- γ ⁺ NK cells was significantly lower in non-infected unvaccinated group when control and stimulated cultures were compared. We observed that infected (vaccinated and unvaccinated) and non-infected vaccinated subjects had higher percentages of IFN- γ ⁺ NK cells when compared with the non-infected unvaccinated individuals, after viral stimulation. The importance of IFN- γ in host defense against VACV is well established (Reading and Smith, 2003). Previous studies with CD4 memory T cells demonstrated that VACV infection induces the production of IFN- γ and that the frequency of IFN- γ producing cell is higher in previously vaccinated volunteers when compared with unvaccinated healthy volunteers (Combadiere et al., 2004; Puissant-Lubrano et al., 2010). Our data also demonstrated a higher percentage of NK cells expressing IFN- γ by groups that have been previously exposed to VACV. Analysis of TNF- α ⁺ NK cells demonstrated a higher percentage of these cells in infected (vaccinated and unvaccinated) and non-infected vaccinated individuals, when compared to non-infected unvaccinated, after *in vitro* stimulation with UV-inactivated VACV. The role of TNF- α in protection against VACV infection has been previously explored and it was demonstrated that *Smallpox* vaccination induces TNF- α expression by CD4⁺ memory T cells (Puissant-Lubrano et al., 2010; Hammarlund et al., 2003, 2010). Although our work analyzed the TNF- α ⁺ NK cells population it is important to notice that this population is significantly increased in those individuals who had a history of VACV infection or smallpox vaccination but not in non-infected unvaccinated subjects. Our results showed that NK cells are also an important source of TNF- α , a cytokine involved in the mechanisms of viral clearance.

In this work NK cells phenotype from individuals previously infected with VACV (vaccinated and unvaccinated) following a natural VACV infection was described and compared with the profile of NK cells induced by smallpox vaccination (non-infected vaccinated individuals). A negative control using non-infected unvaccinated individuals was used to compare the data presented by infected (vaccinated and unvaccinated) and non-infected vaccinated subjects. In this study we did not observe any difference in NK cells phenotype when we compared infected (vaccinated and unvaccinated) individuals to non-infected vaccinated patients (except with marker Nkp46). However, we observed significant differences when comparing infected (vaccinated and unvaccinated) and non-infected vaccinated individuals to the unvaccinated non-infected group, after stimulation with UV-inactivated VACV.

It seems that previous exposure to VACV (either by infection or vaccination) leads to a more robust NK cell immune response in a second Ag exposure, since we demonstrated that NK cells from previously infected individuals (vaccinated and unvaccinated) and non-infected vaccinated subjects expressed higher percentages of NCRs (Nkp 30, 44 and 46), Granzyme B, INF- γ and TNF- α (molecules involved in lysis of target cells) when compared to non-infected unvaccinated individuals, after stimulation with UV-inactivated VACV.

In addition, our data showed that previous exposure to the antigen (either by natural infection or vaccination) induced partial protection that leads to a milder form of VACV infection, demonstrated by our clinical data. In previous work of our group we suggested that this fact occurred due to the long time interval between *Vaccinia virus* infection and vaccination, at least 30 years before the recent infection. So, previous exposure to the antigen induced partial protection that was reflected on a milder symptoms (Medeiros-Silva et al., 2013). Corroborating with the data presented in this work, previous studies with human *Monkeypox* infection indicated that smallpox vaccination was not able to prevent the infection, but it seems that *Monkeypox* infection in humans that received a smallpox vaccine manifested in a milder form (Heymann

et al., 1998). Another study also suggests that receipt of smallpox vaccination more than 3–4 decades ago may not provide current protection. Furthermore, this study demonstrated that, vaccinia-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses obviously decline with age (Hsieh et al., 2004). In our work, the vaccinated groups are significantly older than the control group and this could interfere in the NK cells responses, although we did not detect any significant difference when we compared the previously vaccinated individuals (infected and non-infected) with the unvaccinated infected subjects. We had demonstrated that there were some significant differences in the phenotype of NK cells when we compared the infected (vaccinated and unvaccinated) and non-infected vaccinated individuals with the unvaccinated non-infected subjects. However we can speculate that this difference is not just due to the age of the individuals, but it is also associated with the previous exposure to the VACV. Our hypothesis is reinforced by another study that showed that a proliferative memory responses to VACV persisted in 72% of the population and were not influenced by age (Combadiere et al., 2004). We suggest that previous exposure to VACV, either by recent infection or smallpox vaccination, leads to a more robust immune response mediated by NK and T memory cells, as we previously described (Medeiros-Silva et al., 2013), but at this moment we cannot identify what mechanisms are involved in this process.

It is necessary to further explore the mechanisms involved in the activation, degranulation and inhibition of NK cells to fully elucidate the roles of the distinct aspects of the immune response against a primary and secondary response to VACV infection.

Financial support

CAPES/CNPQ/FAPEMIG.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2014.02.001>.

References

- Medeiros-Silva, D.C., Moreira-Silva, E.A.S., Gomes, J. de A., Fonseca, F.G., Correia-Oliveira, R., 2010. Clinical signs, diagnosis, and case reports of *Vaccinia virus* infections. *Braz. J. Infect. Dis.* 14 (2), 129–134.
- Lewis-Jones, S., 2004. Zoonotic poxvirus infections in humans. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 17 (2), 81–89.
- Bukowski, J.F., Woda, B.A., Habu, S., et al., 1983. Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo. *J. Immunol.* 131, 1531–1538.
- Stitz, L., Baenziger, J., Pircher, H., et al., 1986. Effect of rabbit anti-asialo GM1 treatment in vivo or with anti-asialo GM1 plus complement in vitro on cytotoxic T cell activities. *J. Immunol.* 36, 4674–4680.
- Daniels, K.A., Devora, G., Lai, W.C., et al., 2001. Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H. *J. Exp. Med.* 194, 29–44.
- Dokun, A.O., Kim, S., Smith, H.R., et al., 2001. Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nat. Immunol.* 2, 951–956.
- Natuk, R.J., Welsh, R.M., 1987. Accumulation and chemotaxis of natural killer/large granular lymphocytes at sites of virus replication. *J. Immunol.* 138, 877–883.
- Chisholm, S.E., Reyburn, H.T., 2006. Recognition of vaccinia virus-infected cells by human natural killer cells depends on natural cytotoxicity receptors. *J. Virol.* 80 (5), 2225–2233.
- Rosen, D.B., Bettadapura, J., Alsharifi, M., Mathew, P.A., Warren, H.S., Lanier, L.L., 2005. Cutting edge: lectin-like transcript-1 is a ligand for the inhibitory human NKR-P1A receptor. *J. Immunol.* 175 (12), 7796–7799.
- Aldemir, H., Prod'homme, V., Dumaurier, M.J., Retiere, C., Poupon, G., et al., 2005. Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor. *J. Immunol.* 175 (12), 7791–7795.
- Germain, C., Meier, A., Jensen, T., Knapnougel, P., Poupon, G., et al., 2011. Induction of lectin-like transcript 1 (LLT1) protein cell surface expression by pathogens and interferon- γ contributes to modulate immune responses. *J. Biol. Chem.* 286 (44), 37964–37975, Epub 2011 Sep 19.
- Fang, M., Orr, M.T., Spee, P., Egebjerg, T., Lanier, L.L., Sigal, L.J., 2011. CD94 is essential for NK cell-mediated resistance to a lethal viral disease. *Immunity* 34 (4), 579–589.
- Konjević, G., Mirjacić Martinović, K., Vuletić, A., et al., 2009. *J. Membr. Biol.* 230 (3), 113–123, Epub 2009 Aug 27.
- Campos, M.A.S., Kroon, E.G., 1993. Critical period for irreversible block of *Vaccinia virus* replication. *Rev. Microbiol.* 24, 104–110.
- Tsung, K., Yim, J.H., Marti, W., Buller, R.M., Norton, J.A., 1996. Gene expression and cytopathic effect of *Vaccinia virus* inactivated by psoralen and long-wave UV light. *J. Virol.* 70 (1), 165–171.
- Bablanian, R., 1975. Structural and functional alterations in cultured cells infected with cytopathic viruses. *Prog. Med. Virol.* 19, 40–83.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Caligiuri, M.A., 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 22, 633–640.
- Mavilio, D., Lombardo, G., Benjamin, J., et al., 2005. Characterization of CD56⁺/CD16⁺ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *PNAS* 102, 2886–2891.
- Caligiuri, M., 2008. Human natural killer cells. *Blood* 112, 461–469.
- Di Santo, J.P., 2006. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 257–286.
- Azzoni, L., Zatspeina, O., Abebe, B., et al., 1998. Differential transcriptional regulation of CD161 and a novel gene, 197/15a, by IL-2, IL-15, and IL-12 in NK and T cells. *J. Immunol.* 161, 3493–3500.
- Alter, G., Malenfant, J.M., Altfeld, M., 2004. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J. Immunol. Methods* 294 (1–2), 15–22.
- Carretero, M., Cantoni, C., Bellon, T., et al., 1997. The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *Eur. J. Immunol.* 27, 563–567.
- Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J.P., et al., 1996. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J. Immunol.* 157, 4741–4745.
- Phillips, J.H., Chang, C., Mattson, J., Gumperz, J.E., Parham, P., et al., 1996. CD94 and a novel associated protein (94AP) form a NK cell receptor involved in the recognition of HLA-A, HLA-B, and HLA-C allotypes. *Immunity* 5, 163–172.
- Orr, M.T., Wu, J., Fang, M., Sigal, L.J., Spee, P., et al., 2010. Development and function of CD94-deficient natural killer cells. *PLoS One* 5 (12), e15184, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0015184>.
- Priic, M., Gibbs, J., Jameson, S.C., 2005. Characteristics of NK cell migration early after vaccinia infection. *J. Immunol.* 175 (4), 2152–2157, Aug 15.
- Medeiros-Silva, D.C., Moreira-Silva, E.A.S., Gomes, J.A.S., Fonseca, F.G., Correia-Oliveira, R., 2013. CD4 and CD8 T cells participate in the immune memory response against *Vaccinia virus* after a previous natural infection. *Results Immunol.* 3, 104–113.
- Fang, M., Roscoe, F., Sigal, L.J., 2010. Age-dependent susceptibility to a viral disease due to decreased natural killer cell numbers and trafficking. *J. Exp. Med.* 207 (11), 2369–2381, Epub 2010 Sep 27.
- Fang, M., Lanier, L.L., Sigal, L.J., 2008. A role for NKG2D in NK cell-mediated resistance to poxvirus disease. *PLoS Pathog.* 4 (2), e30.
- Kagi, D., Seiler, P., Pavlovic, J., Ledermann, B., Burki, K., Zinkernagel, R.M., Hengartner, H., 1995. The roles of perforin- and Fas-dependent cytotoxicity in protection against cytopathic and noncytopathic viruses. *Eur. J. Immunol.* 25 (12), 3256–3262.
- Mullbacher, A., Waring, P., Tha Hla, R., Tran, T., Chin, S., Stehle, T., Museteanu, C., Simon, M.M., 1999. Granzymes are the essential downstream effector molecules for the control of primary virus infections by cytolytic leukocytes. *PNAS* 96 (24), 13950–13955.
- Reading, P.C., Smith, G.L., 2003. *Vaccinia virus* interleukin-18-binding protein promotes virulence by reducing gamma interferon production and natural killer and T-cell activity. *J. Virol.* 77 (18), 9960–9968.
- Combadiere, B., Boissonnas, A., Carcelain, G., Lefranc, E., Samri, A., Bricaire, F., Debre, P., Autran, B., 2004. Distinct time effects of vaccination on long-term proliferative and IFN- γ -producing T cell memory to smallpox in humans. *J. Exp. Med.* 199 (11), 1585–1593.
- Puissant-Lubrano, B., Bossi, P., Gay, F., Crance, J.M., Bonduelle, O., Garin, D., Bricaire, F., Autran, B., Combadiere, B., 2010. Control of *Vaccinia virus* skin lesions by long-term-maintained IFN- γ +TNF- α + effector/memory CD4⁺ lymphocytes in humans. *J. Clin. Invest.* 120 (5), 1636–1644.
- Hammarlund, E., Lewis, M.W., Hansen, S.G., Strelow, L.I., Nelson, J.A., Sexton, G.J., Hanifin, J.M., Slifka, M.K., 2003. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat. Med.* 9, 1131–1137.
- Hammarlund, E., Lewis, M.W., Hanifin, J.M., Mori, M., Koudelka, C.W., Slifka, M.K., 2010. Antiviral immunity following smallpox virus infection: a case-control study. *J. Virol.* 12754–12760.
- Heymann, D.L., Szczeniowski, M., Esteves, K., 1998. Re-emergence of monkeypox in Africa: a review of the past six years. *Br. Med. Bull.* 54 (3), 693–702.
- Hsieh, S.M., Pan, S.C., Chen, S.Y., Huang, P.F., Chang, S.C., 2004. Age distribution for T cell reactivity to vaccinia virus in a healthy population. *Clin. Infect. Dis.* 38 (1), 86–89, Epub 2003 Dec 8.

ANEXO C – ARTIGO 2



CD4 and CD8 T cells participate in the immune memory response against *Vaccinia virus* after a previous natural infection[☆]



Daniela Carla Medeiros-Silva^{a,b,*}, Eduardo Augusto dos Santos Moreira-Silva^{a,b}, Juliana de Assis Silva Gomes^c, Flávio Guimarães da Fonseca^d, Rodrigo Correa-Oliveira^{a,b}

^aCentro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Ministério da Saúde, Avenida Augusto de Lima, 1715 - Barro Preto - CEP: 30190-002 - Belo Horizonte, MG - Brazil.

^bDepartamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil

^cDepartamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil

^dDepartamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 June 2013

Received in revised form 25 October 2013

Accepted 28 October 2013

Keywords:

Vaccinia virus

Poxviridae infections

Infection

Zoonoses

Smallpox vaccine

ABSTRACT

The present study evaluates the immune response of memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells from patients following a natural *Vaccinia virus* (VACV) infection. A total of 42 individuals were involved in the study being: 22 previously infected individuals (vaccinated or not against smallpox) and 20 non-infected individuals (vaccinated or not). A short-term *in vitro* stimulation with UV-inactivated VACV of whole blood cells was performed. Our study showed that previously infected individuals have a lower percentage of CD4⁺ T cells expressing lymph-node homing receptors (CD4⁺CD62L⁺CCR7⁺) and higher percentage of memory CD4⁺ T cells subsets (CD4⁺CD45RO^{high}) when compared with non-infected subjects, after *in vitro* viral stimulation. We also showed that infected individuals presented higher percentages of CD4⁺ and CD8⁺ memory T lymphocytes expressing IFN- γ when compared to non-infected individuals. We verified that the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T memory cells expressing TNF- α was higher in infected and non-infected vaccinated subjects when compared with non-infected unvaccinated individual. We also observed that previously infected individuals have higher percentages of CD8⁺ T cells expressing lymph-node homing receptors (CCR7⁺ and CD62L⁺) and that the memory T cells expressing IFN- γ and TNF- α were at higher percentages in the whole blood cells from infected and non-infected vaccinated individuals, when compared to unvaccinated non-infected subjects. Thus, our findings suggest that CD4⁺ and CD8⁺ T cells are involved in the immune memory response against *Vaccinia virus* natural infection.

© 2013 The Authors. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Vaccinia virus (VACV) is the causative agent of a zoonotic infection that affects cattle and humans in many regions of Brazil, since 1969 [1]. The occurrence of these outbreaks is interesting as some individuals have no immunity against this infection and there are no immunological studies on the duration of immunity after natural human VACV infection. Most of the studies have evaluated the duration of immunity after smallpox vaccination [2–8], but there is little information about the immunity against a natural *Smallpox* and VACV human infection [7,9].

[☆] This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

* Corresponding author at: Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Ministério da Saúde, Avenida Augusto de Lima, 1715 - Barro Preto - CEP: 30190-002 - Belo Horizonte, MG - Brazil. Tel.: +55 31 84923130.

E-mail address: daninhamed@yahoo.com.br (D.C. Medeiros-Silva).

have lost the constitutive expression of CCR7, are heterogeneous for CD62L ($T_{EM}CD45RO^+ CCR7^- CD62L^{-/+}$), home to peripheral tissues, and can rapidly produce effector cytokines such as IFN- γ upon antigenic stimulation [17–19,22]. T memory cells are not classified just by the expression of the surface markers CD45RO, CD62L and CCR7. It is also necessary to evaluate the production of effector cytokines, such as IFN- γ . T_{EM} expresses high levels of activation markers (such as CD45RO), lose expression of the chemokine receptor CCR7, and acquire the capacity to produce IFN- γ and to kill target cells. In contrast, T_{CM} cells retain CCR7 expression, and fail to acquire cytotoxic function, although produce low levels of IFN- γ [17–22].

The importance of the role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the control of VACV infection, in the induction and maintenance of long-term memory is well known [23], but the phenotype of these T cell subsets was not described. In the present study, we evaluated the phenotype of CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressing activation markers (CD45RO), lymph node-homing receptors L-selectin (CD62L) and CCR7 and production of cytokines (IFN- γ and TNF- α) after *in vitro* stimulation with UV-inactivated VACV following a natural *Vaccinia virus* infection after a zoonotic outbreak that occurred in Brazil in 2005.

2. Participants, materials, and methods

2.1. Study population

In 2005 a zoonotic outbreak of VACV infection occurred in different areas in Minas Gerais state, Brazil. During the outbreak, blood from these individuals and from cattle were collected and sent to the Virus Laboratory of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) and to the Immunology Laboratory of the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) as a part of the outbreak investigation to confirm the infection with *Vaccinia virus*. For confirmation of the infection some experiments were performed as previously described by virus isolation, phylogenetic analysis, plaque-reduction neutralization test and IgG ELISA [24]. As an extension of the outbreak investigation, this study was initiated to assess immune responses 5 years post-exposure. The same individuals were recruited and specimens collected to investigate the profile of CD4 and CD8 memory T cells. A total of 42 individuals were considered in these analyses. The studied group consisted of 22 infected human patients and 20 non-infected and healthy individuals. Importantly, out of 22 individuals previously infected, 12 were vaccinated against smallpox in the past, as confirmed by visualization of a typical vaccination scar in their left arm. Of the 20 non-infected individuals, 10 were vaccinated against smallpox in the past, as confirmed by visualization of a typical vaccination scar in their left arm and by data on the vaccination card; 10 were unvaccinated (control group) (Table 1). All patients were previously examined by a physician and those presenting apparent clinical signs of any other disease, infectious or not, were not included in the study. All study participants provided a written informed consent following the guidelines of the Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais.

2.2. Viruses and cells

Vero cells were used for virus replication, titration and UV inactivated viral test [25]. A thin layer of viral stocks, at a distance of 15 cm, was exposed for 5–10 min to UV radiation at a wavelength of 280 nm. UV irradiated viruses that were unable to form plaques were considered to be UV inactivated.

2.3. Cell phenotype analysis

In vitro short-term cultures of whole blood samples were performed. Whole blood was stimulated *in vitro* with UV-inactivated

VACV for 6 h at 37 °C and 5% CO₂. Approximately 1×10^4 PFU of *Vaccinia virus* strain WR was added per 1×10^6 leucocytes. Control cultures were maintained in culture media for the same period of time. Cultured cells were washed in FACS buffer and stained with monoclonal antibodies against CD4, CD8, CD45RO, CCR7, and CD62L. Cell preparation was incubated in the dark for 30 min at room temperature. Following incubation, erythrocytes were lysed, the cells washed and fixed in FACS fix solution. A total of 100,000 events/tube were acquired using a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson). The CELLQuest™ software was used for data acquisition and the FLOW JO Version 7.5.5 software for analysis.

2.4. Intracellular cytokine staining (ICCS)

Whole blood was stimulated *in vitro* with UV-inactivated VACV as described above. During the last 4 h of culture, Brefeldin A (10 mg/mL) was added to the cultures. Cultured cells were washed and stained with monoclonal antibodies against the different cell-surface markers, as described above. The cells were then fixed in FACS fix solution. Finally, the cells were incubated and stained intracellularly with monoclonal antibodies against IFN- γ and TNF- α PE. A total of 100,000 events/tube were acquired using a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences, USA). Samples were analyzed using the FlowJo software (Tree Star – Version 7.5.5).

2.5. FACS analysis of surface markers and intracellular cytokine

Lymphocytes were analyzed for their intracellular cytokine expression patterns and frequencies as well as for cell surface markers using the FlowJo software (Tree Star – Version 7.5.5), as described in Supplementary Fig. S1. First we performed the identification of peripheral lymphocytes population in diagram of FSC \times SSC (Fig. S1A). Second we made dot plots of FL-1 \times FL-4, displaying the frequency of CD4⁺CD45RO⁺ cells. The CD4⁺CD45RO^{Low} (R1) and CD4⁺CD45RO^{High} (R2) populations were sorted using the indicated sorting gates (Fig. S1B). The same strategy was used to select the CD4⁺CD62L⁺ subpopulations. Dot plots of FL-1 \times FL-4 were made displaying the frequency of CD4⁺CD62L⁺ cells. The CD4⁺CD62L^{neg} (R1), CD4⁺CD62L^{Low} (R2) and CD4⁺CD62L^{High} (R3) populations were sorted using the indicated sorting gates (Fig. S1C). Finally, we made dot plots of FL-4 \times FL-2, displaying the frequency of CD4⁺CD45RO^{Low}IFN- γ ⁺, CD4⁺CD45RO^{High}IFN- γ ⁺, CD4⁺CD62L^{neg}IFN- γ ⁺, CD4⁺CD62L^{Low}IFN- γ ⁺ and CD4⁺CD62L^{High}IFN- γ ⁺ (Fig. S1D). Limits for the quadrant markers were always set based on negative populations and isotype controls.

2.6. Statistical analysis

Analyses were performed using GraphPad Prism version 4.0 software (GraphPad Software Inc., USA). The nonparametric Mann-Whitney *U* test was used to compare stimulated and non-stimulated cultures in each of the four groups. The Kruskal-Wallis test was used to compare the four clinical groups, followed by Dunn's test to compare all stimulated and non-stimulated cultures. Differences were considered significant when a *p* value of less than 0.05 was obtained.

3. Results

3.1. Previous vaccination leads to a mild form of VACV infection

Some of the infected individuals were previously vaccinated against smallpox, so we evaluated the clinical differences that occurred between the vaccinated and unvaccinated individuals. For this purpose we applied and analyzed a questionnaire previously validated by our group. In unvaccinated individuals, the mean age was

Table 1
Characterization of the population involved in the study.

Groups	Vaccination status	Number of individuals studied	Mean age (min–max)	Gender (n)	
				Male	Female
Previously infected ^a	Vaccinated ^b	12	56 (42–68)	12	0
	Unvaccinated	10	24.5 (18–34)	10	0
Non-infected	Vaccinated ^c	10	46.4 (39–62)	7	3
	Unvaccinated	10	29.2 (28–31)	6	4

^a These individuals were infected with *Vaccinia virus* during outbreaks that occurred in 2005 in different farms in the state of Minas Gerais, Brazil.

^b Importantly, out of 22 individuals previously infected, 12 were vaccinated against smallpox in the past, as confirmed by visualization of a typical vaccination scar in their left arm.

^c Of the 20 individuals non-infected, 10 were vaccinated against smallpox in the past, as confirmed by visualization of a typical vaccination scar in their left arm and data from vaccination card.

24.5 years with a minimum of 18 years and a maximum of 34. However, in patients previously vaccinated, the mean age was 56 years, with a minimum of 42 and a maximum of 68. All subjects studied were male milkers and the average time worked in this function was 18 years in the unvaccinated individuals and 32 in vaccinated patients. None of these individuals reported having prior infection by VACV. It was observed that the clinical symptoms (fever, headache, muscle pain, nausea, lymphadenopathy, headache, and others) occurred in a milder form in the vaccinated individuals. Analysis of the clinical symptoms showed that in unvaccinated patients the mean was six symptoms, ranging from 4 to 7; in the vaccinated individual the mean was 2.5 symptoms, ranging from 1 to 7. As for the features of the lesions, the vaccinated individuals had an average of 2.5 injuries and the unvaccinated individuals an average of eight lesions. In relation to the place of occurrence of these lesions, in the vaccinated group they concentrated largely on the hands (100%) and small events in other regions (17%) (arms, nose and legs), while in the unvaccinated, the primary site of involvement were the hands (100%), however, it also occurred in other regions (40%) (face, neck and legs). Assessing the days of leave of absence due to illness it was found that 25% of the vaccinated group had an average of 10 days off and in the unvaccinated 60% of individuals with an average of 15 days of sick leave.

3.2. Previously infected individuals have lower percentages of CD4⁺ T cells expressing lymph-node homing receptors cells but higher percentages of CD4 effectors T cells and CD8 T cells expressing lymph-node homing receptors

The mean percentage of T lymphocytes (CD3⁺) and its subsets (CD4⁺ and CD8⁺) (Table 2) was not different when the four groups were compared. In order to evaluate the CD4 and CD8 T cells phenotype, we used lymph node-homing receptors, L-selectin (CD62L) and CCR7 and activation markers (CD45RO, IFN- γ , TNF- α). Our data showed that the expression of CCR7 on CD4⁺ T cells, was significantly lower in the infected groups – vaccinated ($p < 0.05$) and unvaccinated ($p < 0.01$) – after *in vitro* stimulation (Fig. 1A) when compared with non-infected (vaccinated and unvaccinated). Despite this observation, the percentage of CCR7 negative CD4 T cells (CD4⁺ CCR7⁻) was significantly higher, in the infected groups, vaccinated ($p < 0.05$) and unvaccinated ($p < 0.01$), after *in vitro* stimulation (Fig. 1B), when compared with non-infected (vaccinated and unvaccinated). The results also showed that previously infected individuals had higher percentage of CD4⁺ T memory cells (CD4⁺ CD62L^{neg} CCR7⁻) when compared with non-infected subjects (vaccinated and unvaccinated) (Fig. 1C). Our data also showed that the expression of CD45RO^{High} by CD4⁺ T cells (memory lymphocytes) was statistically higher in the infected groups – vaccinated ($p < 0.01$) and unvaccinated ($p < 0.05$) – after *in vitro* stimulation with VACV, when compared to non-infected individuals (vaccinated and unvaccinated). In the non-infected individuals, there were no increases in the percentage of CD4 memory T cells (Fig.

1D).

On the other hand the expression of CCR7 in CD8⁺ T cells was higher in the infected groups (vaccinated and unvaccinated) when compared with non-infected (vaccinated and unvaccinated) subjects, after viral stimulation (Fig. 2A). The results also show that infected (vaccinated and unvaccinated) individuals have a higher percentage of CD8⁺ T cells expressing lymph node-homing receptors (CD8⁺ CD62L⁺ CCR7⁺) when compared with non-infected (vaccinated and unvaccinated) individuals (Fig. 2B). Furthermore, when we analyzed the subpopulation of CD8⁺ CD45RO^{High} memory T cells, we observed that there were a statistically higher percentage of these cells only in the infected groups (vaccinated and unvaccinated) ($p < 0.05$) after *in vitro* stimulation with VACV, when compared with non-infected (vaccinated and unvaccinated) patients.

3.3. *Vaccinia virus* exposure leads to higher percentages of IFN- γ and TNF- α expression by CD4⁺ T cells and its subsets (CD4⁺ CD45RO⁺ and CD4⁺ CD62L^{neg})

As it is well established that *Vaccinia virus* infection induces strong cellular responses capable of secreting effectors cytokines such as IFN γ and TNF- α , we evaluated the expression of these markers. In this study the expression levels of IFN- γ and TNF- α on CD4⁺ T lymphocytes were evaluated and the results showed that expression of IFN- γ and TNF- α on CD4⁺ T cells were significantly higher in the infected (vaccinated and unvaccinated) individuals and in the non-infected vaccinated subjects, after *in vitro* stimulation with VACV, when compared with non-infected unvaccinated patients (Fig. 3A and B).

Following the identification of CD4⁺ T cells expressing IFN- γ and TNF- α , the intracytoplasmatic presence of these cytokines in CD4⁺ CD45RO⁺, CD4⁺ CD62L⁻ (activated cells) and CD4⁺ CD62L^{Low} T cells was evaluated in the four groups, in the presence of *in vitro* stimulation by UV-inactivated VACV. The mean percentage T CD4 lymphocytes co-expressing CD45RO and IFN- γ showed that only the subjects who had been previously infected – both vaccinated ($p < 0.001$) and unvaccinated ($p < 0.01$) – presented a significantly higher percentages of CD4⁺ CD45RO⁺ and CD4⁺ CD45RO^{High} T memory cells expressing IFN- γ (Fig. 4A and B), when compared with non-infected (vaccinated and unvaccinated) individuals. We compared in Fig. 4C and D the production of IFN- γ by CD4 T cells that lost the selectin, CD62L, to those cells that appear to regain the marker (CD62L^{Low}), those called T_{CM} cells. Expression levels of IFN- γ were measured on CD4⁺ CD62L^{neg} T cells, and a significant increase of these cells was detected only in the infected individuals – vaccinated ($p < 0.01$) and unvaccinated ($p < 0.01$), after culture in the presence of UV-inactivated VACV, when compared with non-infected (vaccinated and unvaccinated) patients (Fig. 4C). Analysis of IFN- γ on CD4⁺ CD62L⁺ and CD4⁺ CD62L^{Low} T lymphocytes showed that there were significantly higher percentages of this CD4⁺ T cell subset only in the infected (vaccinated and unvaccinated) groups, after *in vitro* stimulation with VACV, when compared

Table 2

Mean percentage of T cells (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺) on the whole blood from individuals infected (vaccinated and unvaccinated) and noninfected (vaccinated and unvaccinated) by *Vaccinia virus*, after *in vitro* stimulation with UV-inactivated VACV.

Groups	CD3 ⁺ (%) ^a	Cell phenotype		
		CD4 ⁺ (%) ^a	CD8 ⁺ (%) ^a	
Non-infected	Unvaccinated	71.62 ± 6.31	42.9 ± 5.36	23.368 ± 5.29
	Vaccinated	65.18 ± 8.19	45.66 ± 8.78	19.828 ± 2.82
Infected	Unvaccinated	76.28 ± 7.61	40.9 ± 6.33	22.367 ± 5.04
	Vaccinated	72.18 ± 5.63	45.95 ± 7.08	20.903 ± 4.46

^a There were no statistically significant differences in the mean percentage of T cells (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺) when the four groups were compared.

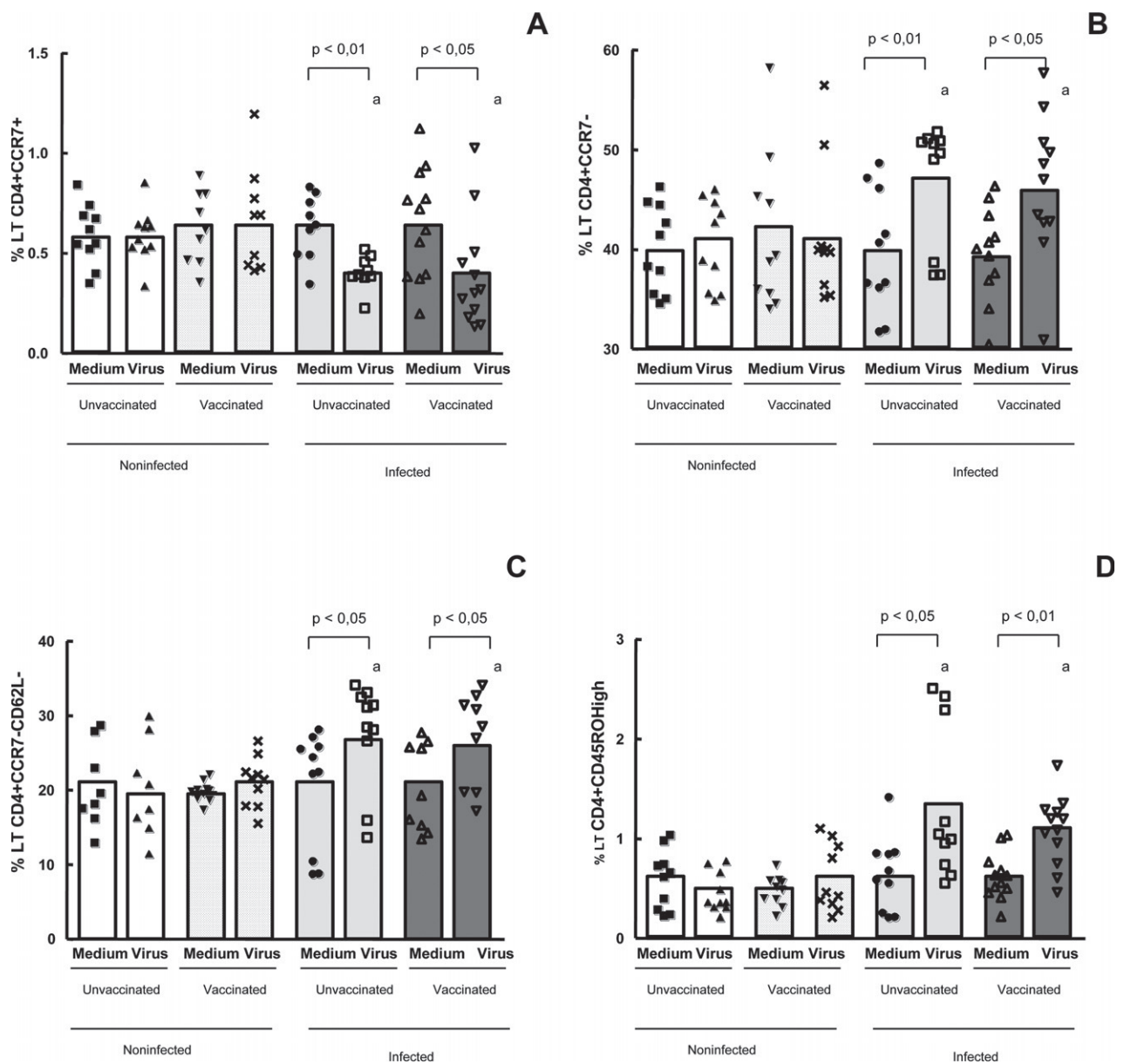


Fig. 1. Evaluation of memory and naïve TCD4⁺ cells in the whole blood cells from individuals previously infected or not by zoonotic *Vaccinia virus*. Whole blood cells from patients infected or not with zoonotic *Vaccinia virus* were stimulated in the presence of UV-inactivated VACV or mock-treated (medium). After stimulus, cells were labeled with mouse anti-human CD4, CD62L, CCR7 and CD45 antibodies. The percentages of CD4 + CCR7⁺ (A); CD4 + CCR7⁻ (B); CD4 + CCR7⁻CD62L⁻ and CD4 + CD45RO^{High} T cell subsets were determined by flow cytometry. Statistical significance (*P* values) is presented on the graphs. *a means different from non-infected unvaccinated, stimulated cultures.

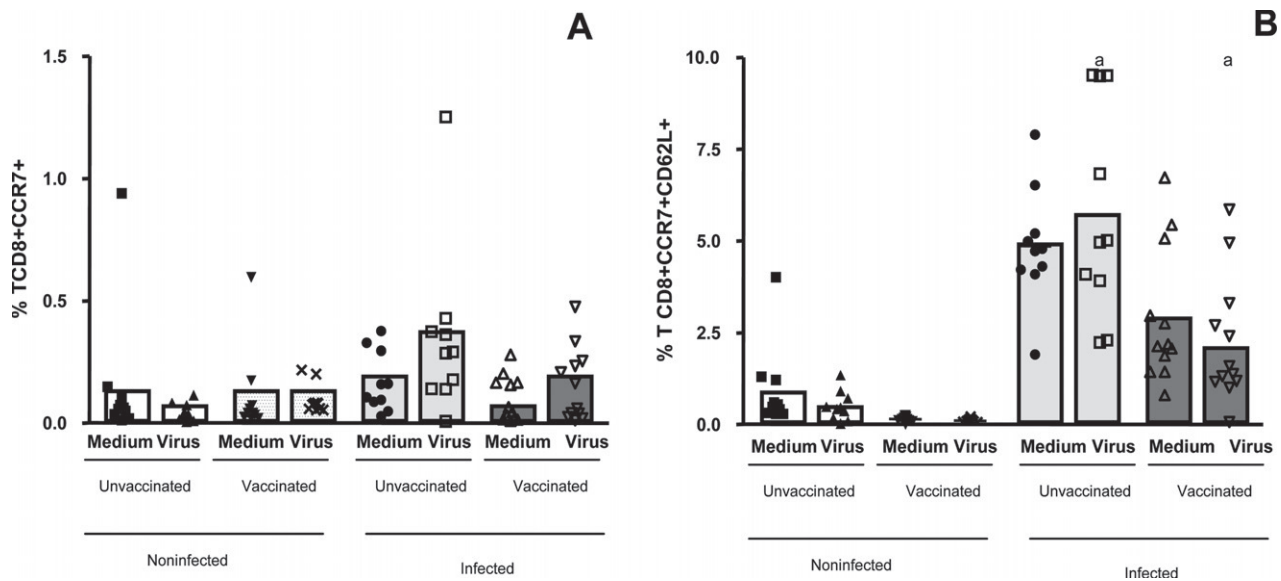


Fig. 2. Evaluation of naïve and memory TCD8 + cells in the whole blood cells from individuals previously infected or not by zoonotic *Vaccinia virus*. Whole blood cells from patients infected or not with zoonotic *Vaccinia virus* were stimulated in the presence of UV-inactivated VACV or mock-treated (medium). After stimulus, cells were labeled with mouse anti-human CD8, CD62L, CCR7 antibodies. The percentages of CD8 + CCR7 + (A) and CD8 + CCR7 + CD62L + (B) T cell subsets were determined by flow cytometry. Statistical significance (*P* values) is presented on the graphs. *a means different from non-infected unvaccinated, stimulated cultures.

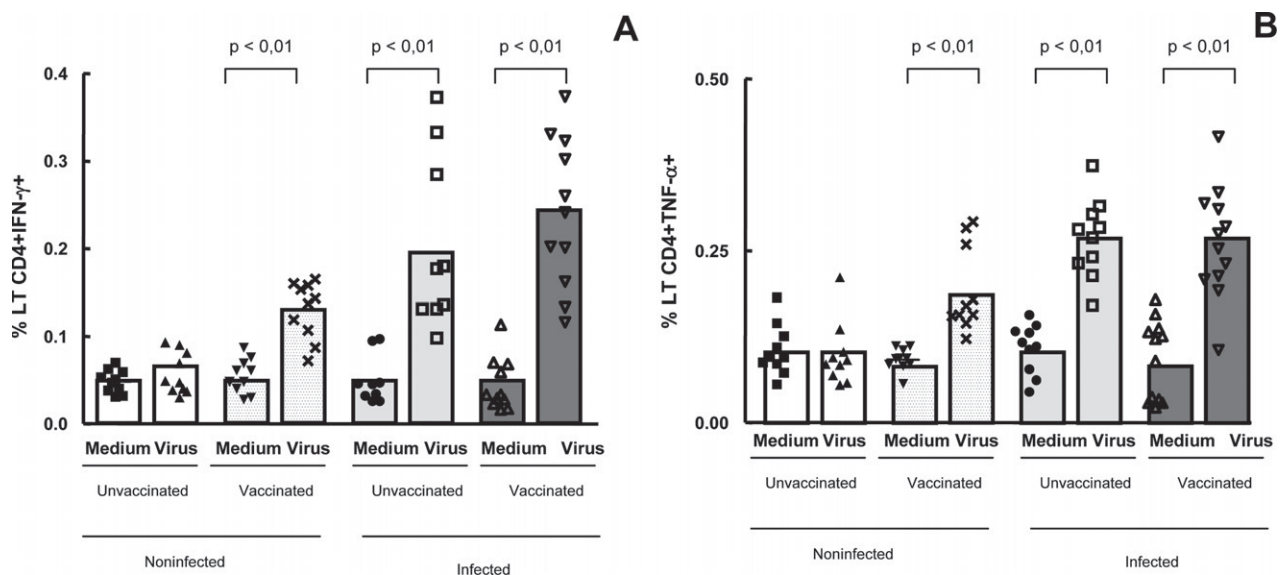


Fig. 3. Intracellular IFN- γ and TNF- α detection in the whole blood cells from individuals previously infected or not by zoonotic *Vaccinia virus*. Whole blood cells from patients infected or not with zoonotic *Vaccinia virus* were stimulated in the presence of UV-inactivated VACV or mock-treated (medium). After stimulus, cells were labeled with mouse anti-human CD4 antibodies and intracellular staining was used to measure the percentage of positive IFN- γ and TNF- α CD4 T cells. The percentages of CD4 + IFN- γ + (A) and CD4 + TNF- α + (B) T cell subsets were determined by flow cytometry. Statistical significance (*P* values) is presented on the graphs. *a means different from non-infected unvaccinated, stimulated cultures.

with non-infected (vaccinated and unvaccinated) patients (Fig. 4D).

Analysis of the expression of TNF- α on CD4⁺CD45RO⁺ and CD4⁺CD45RO^{Low} T memory cells showed that there were significantly higher percentages of these cells in the non-infected vaccinated individuals (*p* < 0.05) and in the infected (vaccinated and unvaccinated) subjects (*p* < 0.01), when compared with non-infected unvaccinated patients (Fig. 5A), after viral stimulation. The mean percentage of CD45RO^{High}CD4⁺TNF α ⁺ T memory cells was lower in the non-infected unvaccinated group (*p* < 0.01) and were not different when we compared the other groups (Fig. 5B).

In this study we compared the expression of TNF- α by CD4 effectors T cells that lost the selectin, CD62L, to those cells that appear to regain the marker. Expression levels of TNF- α on CD4⁺CD62L^{neg}

and CD4⁺CD62L^{Low} T effectors cells showed a significantly higher (*p* < 0.05) percentage of these cells in the infected (vaccinated and unvaccinated) groups and in the non-infected vaccinated individuals, after culture in the presence of UV-inactivated VACV, but not in the non-infected unvaccinated group (Fig. 5C and D).

3.4. Previous *Vaccinia virus* exposure leads to higher percentages of IFN- γ and TNF- α by CD8⁺ memory (CD8⁺CD45RO⁺) and lymph-node homing (CD8⁺CD62L⁺) T cells

Following the identification of CD8⁺ T cells expressing lymph-node homing receptors and activations markers, we evaluated the intracytoplasmic expression of the effectors cytokines IFN- γ and

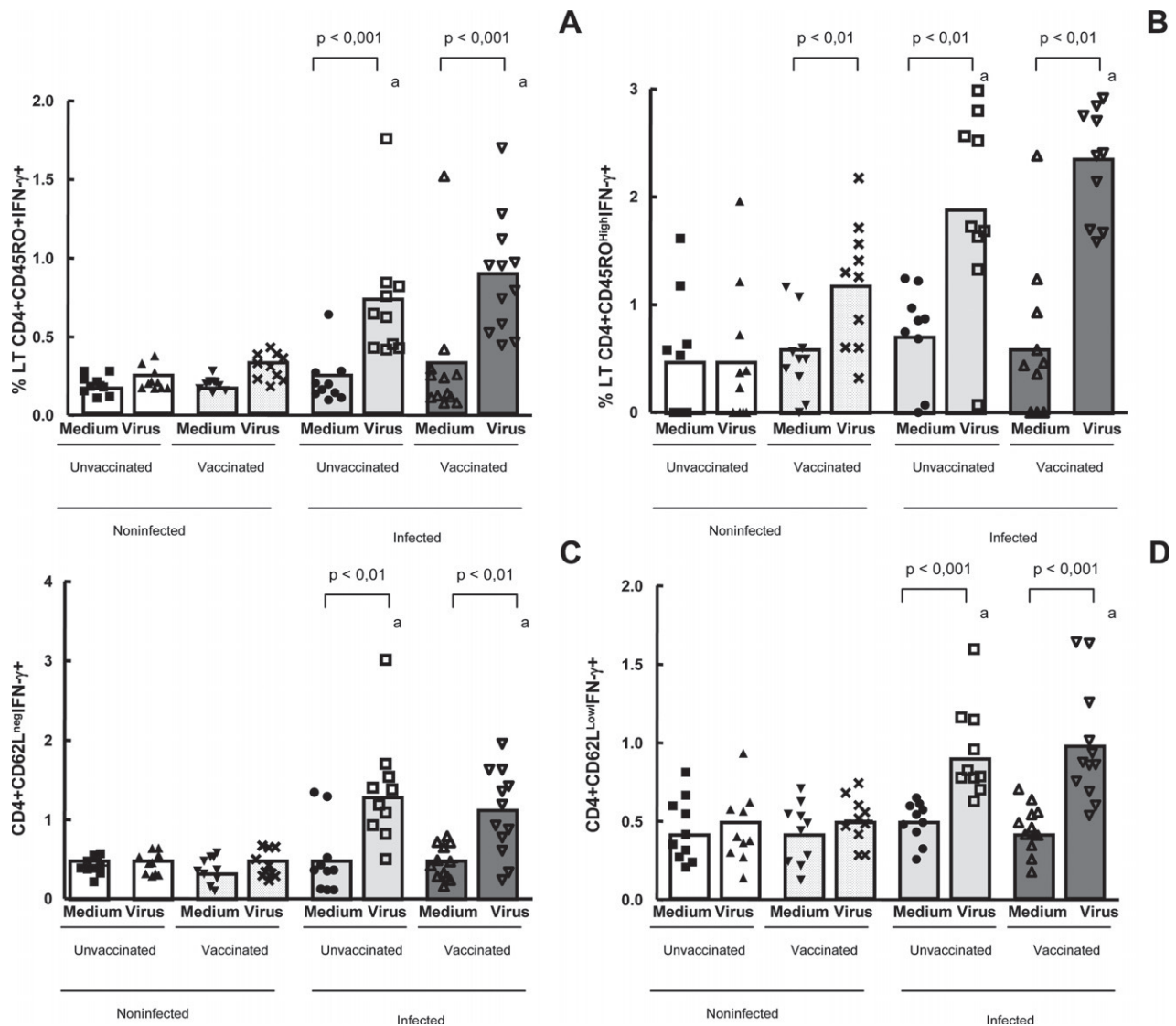


Fig. 4. Intracellular IFN- γ detection in CD4⁺ T memory cells in the whole blood cells from individuals previously infected or not by zoonotic *Vaccinia virus*. Whole blood cells from patients infected or not with zoonotic *Vaccinia virus* were stimulated in the presence of UV-inactivated VACV or mock-treated (medium). After stimulus, cells were labeled with mouse anti-human CD4, CD45RO and CD62L antibodies and intracellular staining was used to measure the percentage of positive IFN- γ cells. The percentages of CD4 + CD45RO + IFN- γ + (A); CD4 + CD45RO^{High}IFN- γ + (B); CD4 + CD62L^{neg}IFN- γ + (C) and CD4 + CD62L^{Low}IFN- γ + T cell subsets were determined by flow cytometry. Statistical significance (*P* values) is presented on the graphs. *a means different from non-infected unvaccinated, stimulated cultures.

TNF- α by these cells, in the groups of non-infected and infected individuals (vaccinated and unvaccinated), after *in vitro* stimulation by UV-inactivated VACV.

The data showed that only the infected individuals – both vaccinated ($p < 0.001$) and unvaccinated ($p < 0.01$) – presented a significantly higher percentage of IFN- γ producing activated CD8⁺ T cells (CD8⁺ CD45RO⁺ IFN- γ ⁺ and CD8⁺ CD45RO^{Low}IFN- γ ⁺), after *in vitro* stimulation (Fig. 6A and B). Analysis of CD8⁺ CD45RO^{High} T cells expressing IFN- γ did not show any significant difference when we compare the percentage of these cells in all four groups, after *in vitro* stimulation (data not shown). We also analyzed the CD8⁺ CD62L⁺ expressing IFN- γ and we observed a significantly higher percentage ($p < 0.05$) of these cells in the infected subjects and in the non-infected vaccinated individuals, after culture in the presence of UV-inactivated VACV, but not in the non-infected unvaccinated group (Fig. 6C). Analysis of CD8⁺ CD62L⁺ and CD8⁺ CD62L^{High} T cells expressing TNF- α showed that a significantly higher ($p < 0.05$) percentage of these cells was observed in the infected subjects and in the non-infected vaccinated individuals, after viral stimulation, but not in the non-infected

unvaccinated group (Fig. 7A and B). Furthermore the analysis of CD8⁺ activated cells showed that the CD8⁺ CD45RO⁺ T effectors cells expressing TNF- α were at higher percentages only in the infected individuals, when we compared the stimulated cultures (Fig. 7C).

4. Discussion

In this study the phenotype of CD4⁺ and CD8⁺ memory T cells was described following a natural *Vaccinia virus* infection and compared with the profile of CD4⁺ and CD8⁺ T memory cells induced by smallpox vaccination. Some differences were detected comparing CD4 and CD8 T cells, but the data clearly indicated that these cells are involved in the immune response to the VACV infection. In the present study, 12 (54%) of the 22 individuals previously infected by *Vaccinia virus* received a previous (childhood) smallpox vaccination. Despite their vaccination status, they acquired the VACV infection, but developed a milder form. A possible explanation for this fact is that *Vaccinia virus* infection occurred long after the vaccination, at least

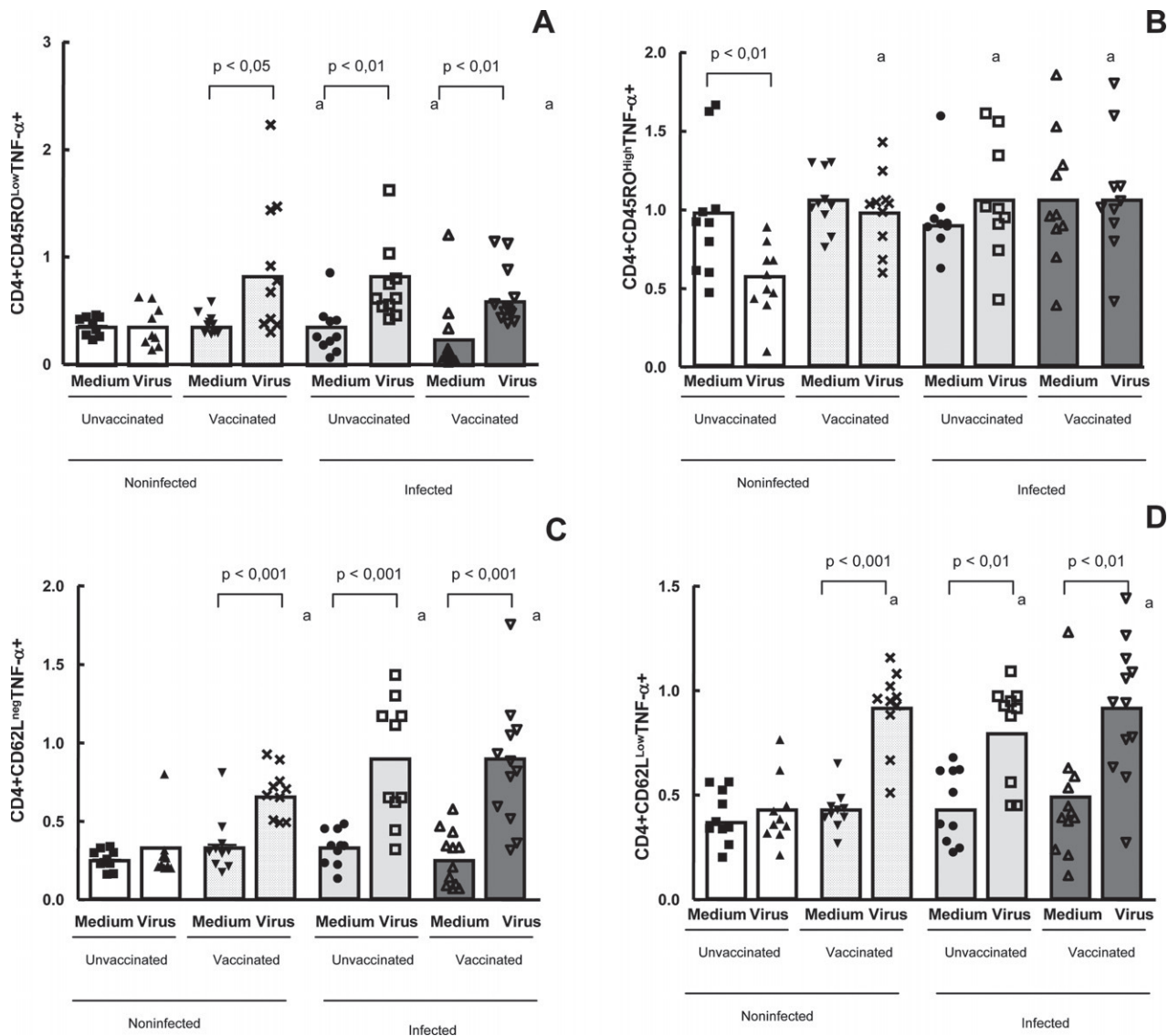


Fig. 5. Evaluation of CD4⁺ TNF- α ⁺ T memory cells, using intracellular staining in the whole blood cells from individuals previously infected or not by zoonotic *Vaccinia virus*. Whole blood cells from patients infected or not with zoonotic *Vaccinia virus* were stimulated in the presence of UV-inactivated VACV or mock-treated (medium). After stimulus, cells were labeled with mouse anti-human CD4, CD45RO and CD62L antibodies and intracellular staining was used to measure the percentage of positive TNF- α ⁺ cells. The percentages of CD4⁺CD45RO^{low} + TNF- α ⁺ (A); CD4⁺CD45RO^{high}TNF- α ⁺ (B); CD4⁺CD62L^{neg} TNF- α ⁺ (C) and CD4⁺CD62L^{low}TNF- α ⁺ T-cell subsets were determined by flow cytometry. Statistical significance (*P* values) is presented on the graphs. *a means different from non-infected unvaccinated, stimulated cultures.

30 years before the recent infection, suggesting that previous exposure to the antigen induced partial protection that was reflected on a milder symptoms. However, at this point it is not possible to elucidate what mechanisms are involved in this process. Kareem and colleagues correlated the absence of complete smallpox vaccine-derived protection during the *Monkeypox* outbreak to the longer interval in time between vaccination and the outbreak [26]. Corroborating with the data presented in this work, previous studies with human *Monkeypox* infection indicated that smallpox vaccination was not able to prevent the infection, but it seems that *Monkeypox* infection in humans that received a smallpox vaccine manifested in a milder form [27].

In this present study, we used lymph node-homing receptors, L-selectin (CD62L) and CCR7, and activation markers (CD45RO^{high}) to describe the lymph-node homing capability and the effectors functions of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. Several markers have been identified to allow for the differentiation of naive and memory T cells. Human naive cells are CD45RO⁻, CCR7⁺ and CD62L^{high} while memory cells (T_{EM}) are CD45RO⁺, CCR7⁻ and CD62L⁻. However, some

memory cells appear to regain CD62L and CCR7, especially T_{CM} cells [17–22,28,29]. Here the CD4⁺ T cell memory subsets were evaluated and the data indicated that infected individuals (vaccinated or not) have higher percentages of T memory cells (CD4⁺ CCR7⁻CD62L⁻ and CD4⁺CD45RO^{high}) when compared to non-infected individuals (both vaccinated and unvaccinated). The percentage of CD4⁺ T lymph-node homing T cells (CD4⁺ CCR7⁺CD62L⁺) did not differ between the four groups analyzed. However, when we analyzed the CD8⁺ T cells, our results showed that previously infected individuals (vaccinated or not) have higher percentage of CD8⁺ naive and/or T_{CM} cells (CD8⁺ CCR7⁺ and CD8⁺ CCR7⁺CD62L⁺) when compared with non-infected individuals (vaccinated and unvaccinated). It is also important to note is that these cells co-express IFN- γ . Similarly, a recent study identified antigen-specific CD8⁺ T cells with a central memory phenotype. These cells were CD44^{high} and CD62L⁺ virus-specific CD8⁺ T cells that constituted approximately 10% of all antigen-specific T cells and expressed high levels of CCR7 [30]. Our data suggest that effector memory is predominantly composed

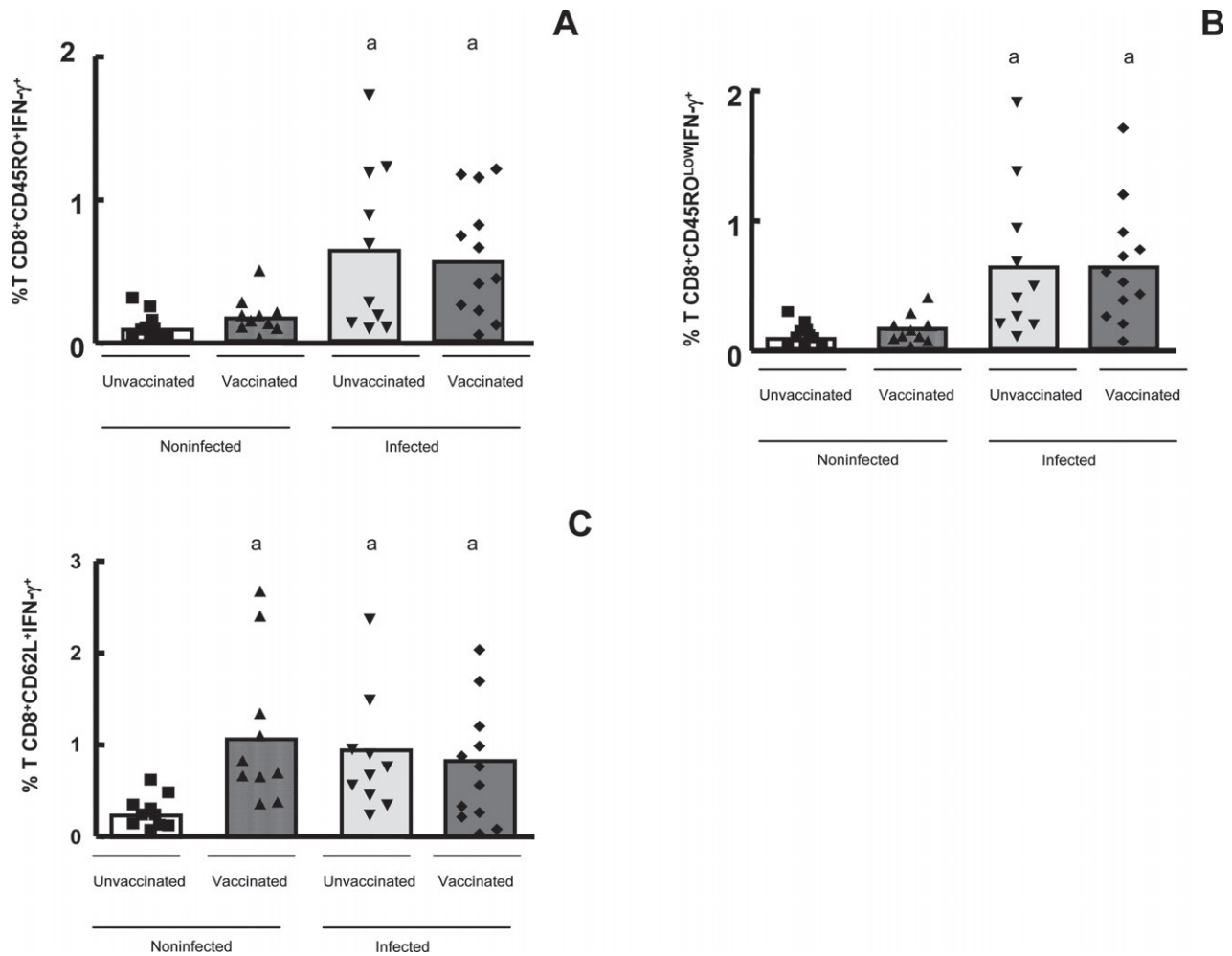


Fig. 6. Intracellular IFN- γ detection in CD8⁺ memory and naïve T cells in the whole blood cells from individuals previously infected or not by zoonotic *Vaccinia virus*, after viral stimulation. Whole blood cells from patients infected or not with zoonotic *Vaccinia virus* were stimulated in the presence of UV-inactivated VACV. After stimulus, cells were labeled with mouse anti-human CD8, CD45RO and CD62L antibodies and intracellular staining was used to measure the percentage of positive IFN- γ cells. The percentages of CD8 + CD45RO + IFN- γ + (A); CD8 + CD45RO^{Low}IFN- γ + (B); and CD8 + CD62L + IFN- γ + (C) T cell subsets were determined by flow cytometry. Statistical significance (*P* values) is presented on the graphs. *a means different from non-infected unvaccinated, stimulated cultures.

by CD4⁺ T cells and these cells are at higher levels only in previously infected individuals, since this increase was not observed in non-infected vaccinated and unvaccinated patients.

In order to further study the population of CD4⁺ and CD8⁺ effectors memory T cells, *in vitro* stimulation was performed with UV-inactivated VACV and intracellular cytokine staining to identify virus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells that expressed either IFN- γ or TNF- α . We observed that the percentage of CD4⁺ T cells expressing IFN- γ was higher in individuals previously infected by *Vaccinia virus* (vaccinated and unvaccinated) and in non-infected vaccinated when compared with non-infected unvaccinated subjects. Puissant-Lubrano and colleagues also found that the frequency of VACV-specific IFN- γ -producing cells and of VACV-specific proliferating cells in previously vaccinated volunteers was significantly higher than that of unvaccinated healthy volunteers [12]. In the present study, it was noted that the CD4⁺ IFN- γ -producing T cells were composed of CD4⁺ CD45RO⁺ (CD4⁺ CD45RO^{Low} and CD4⁺ CD45RO^{High}), CD4⁺ CD62^{Low} and CD4⁺ CD62⁺ T cells. It was also detected that just the infected individuals (vaccinated and unvaccinated) presented higher percentages of CD4⁺ CD62⁺ and CD4⁺ CD45RO^{High} T cells co-expressing IFN- γ -which are the effector-memory T cells (T_{EM}). In the non-infected individuals (vaccinated and unvaccinated), this increase

in the mean percentage of CD4 memory lymphocytes expressing IFN- γ was not observed. Our data reinforce the idea that cellular memory to VACV predominantly involves CD4⁺ Th1 IFN- γ producing cells, as previously described [9,31,32]. In our studies, we also observed that recent infection by VACV induced a more significant CD4 effector memory response when we compared previously infected individuals (vaccinated and unvaccinated) to non-infected vaccinated patients.

Similarly, an increase on the percentage of the CD8⁺ memory T cells (CD8⁺ CD45RO^{High}) was detected only in individuals previously infected by *Vaccinia virus* (vaccinated and unvaccinated), but not in the non-infected (vaccinated or not) subjects. Similar results were observed in the CD4 compartment where an increase in the percentage of the CD4⁺ CD45RO⁺ memory T cells expressing IFN- γ was identified only in the previously infected individuals (vaccinated and unvaccinated), after *in vitro* stimulation with UV-inactivated VACV, when compared with non-infected (vaccinated and unvaccinated) patients. Analysis of T CD8⁺ CD62L⁺ memory cells expressing IFN- γ showed an increase in the percentage of these cells in individuals previously exposed to *Vaccinia virus* (infected vaccinated or not and non-infected vaccinated), but not in the non-infected unvaccinated group, after viral stimulation. In the present study, it was observed that the CD8⁺ IFN- γ -producing T cells were composed of CD8⁺ CD45RO⁺, CD8⁺ CD45RO^{Low}, and CD8⁺ CD62L⁺ T cells. These results suggest

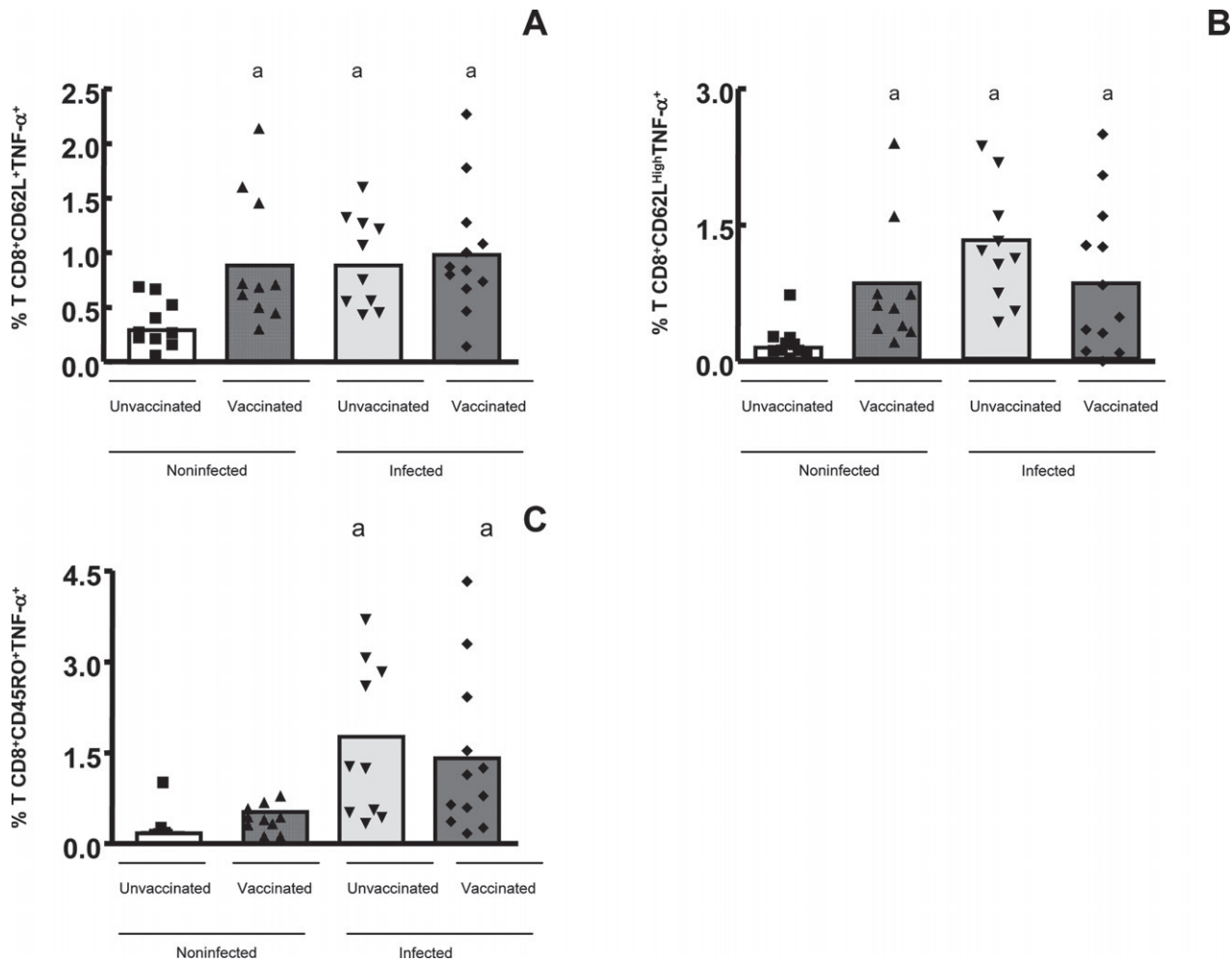


Fig. 7. Intracellular TNF- α ⁺ detection in CD8⁺ naïve and memory T cells in the whole blood cells from individuals previously infected or not by zoonotic *Vaccinia virus*, after viral stimulation. Whole blood cells from patients infected or not with zoonotic *Vaccinia virus* were stimulated in the presence of UV-inactivated VACV. After stimulus, cells were labeled with mouse anti-human CD8, CD45RO and CD62L antibodies and intracellular staining was used to measure the percentage of positive TNF- α ⁺ cells. The percentages of CD8 + CD62L + TNF- α ⁺ (A); CD8 + CD62^{Low}TNF- α ⁺ (B) and CD8 + CD45RO + TNF- α ⁺ (C) T-cell subsets were determined by flow cytometry. Statistical significance (*P* values) is presented on the graphs. *a means different from non-infected unvaccinated, stimulated cultures.

that previous smallpox vaccination during childhood does not lead to a complete protection against VACV infection, but there is still a residual immunity. We also noted that previous infection leads to a more significant CD8 memory response when we compared previously infected individuals (vaccinated and unvaccinated) to non-infected vaccinated patients.

Moreover, it was demonstrated that CD4⁺ T cells from individuals who were once exposed to *Vaccinia virus* (either by smallpox vaccination or *Vaccinia virus* infection) were able to produce TNF- α . Our data showed that the *Vaccinia*-specific TNF- α producing T cells were composed mainly of CD4⁺CD45RO^{Low}, CD4⁺CD62L^{Low} and CD4⁺CD62L^{Low}. Other studies have already demonstrated that smallpox vaccination induces TNF- α expression by CD4⁺ memory T cells [5,12]. Similar results were observed when CD8⁺ T memory cells (CD8⁺CD62L⁺ and CD8⁺CD62L^{High}) co-expressing TNF- α were analyzed. The results showed an increase in the percentage of these cells in individuals previously exposed to VACV (either by infection or vaccination) but not in the non-infected unvaccinated group. Our data also demonstrated an increase in the percentage of the CD8⁺CD45RO⁺TNF- α ⁺ memory T cells only in the previously infected individuals (vaccinated and unvaccinated), when compared with non-infected (vaccinated and unvaccinated) individuals. It is important to note that in this study both CD4⁺ and CD8⁺ T memory

cells were expressing TNF- α . One study, using cell cultures and ICCS, demonstrated that in response to VACV infection, the large majority of the cytokine secreting cells produce only TNF- α (52–95% depending on the clone) [23]. Our results corroborates with this study, since we detected that CD4 and CD8 T memory cells are expressing TNF- α , an important molecule involved in the resistance against VACV infections.

Finally, our findings suggest that vaccinated individuals, even long after vaccination for smallpox, maintain a residual beneficial immune response to the virus. It induces partial long-term protection that in our study was clearly reflected on the fact that milder symptoms were developed and on the presence of memory cells. Our study, however, has some limitations such as the size of the analyzed group, which comprises 42 individuals, being 22 *Vaccinia virus* infected individuals and 20 non-infected individuals. As we previously described in another study the notification of human *Poxvirus* infections is not mandatory in Brazil, and identification of patients is done through active random search [24]. This fact impaired our ability to enroll a larger number of patients and we cannot elucidate at this time the mechanisms involved in the immune memory response against *Vaccinia virus* infection.

5. Conclusions

In this study we observed that previous smallpox vaccination does not lead to a complete protection against VACV infection, since previously vaccinated individuals acquired the infection; however it lead to partial protection that is reflected on a milder clinical form. This fact is probably related to the fact that only previously infected individuals had higher percentages of CD4 and CD8 T memory cells when compared to non-infected subjects, vaccinated or not. Furthermore, it was found that CD4⁺ and CD8⁺ T memory cells expressing IFN- γ ⁺ are at higher percentages only in previously infected individuals that may lead to faster elimination of the virus.

Financial support

CAPES/CNPQ/FAPEMIG.

Supplementary Material

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.rinim.2013.10.002.

REFERENCES

- [1] Trindade GS, Lobato ZI, Drumond BP. Short report: isolation of two Vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75(3):486–90.
- [2] Amanna IJ, Carlson NE, Slifka MK. Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *N Engl J Med* 2007;357:1903–15.
- [3] Amara R R, Nigam P, Sharma S, Liu J, Bostik V. Long-lived poxvirus immunity, robust CD4 help, and better persistence of CD4 than CD8 T cells. *J Virol* 2004;78:3811–16.
- [4] Crotty S, Ahmed R. Immunological memory in humans. *Semin Immunol* 2004;16:197–203.
- [5] Hammarlund E, Lewis MW, Hansen SG, Strelow LI, Nelson JA, Sexton GJ, et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med* 2003;9:1131–7.
- [6] Putz MM, Alberini I, Midgley CM, Manini I, Montomoli E, Smith GL. Prevalence of antibodies to Vaccinia virus after smallpox vaccination in Italy. *J Gen Virol* 2005;86:2955–60.
- [7] Taub DD, Ershler WB, Janowski M, Artz A, Key ML, McKelvey J, et al. Immunity from smallpox vaccine persists for decades: a longitudinal study. *Am J Med* 2008;121:1058–64.
- [8] Demkowicz WE Jr, Littau RA, Wang J, Ennis FA. Human cytotoxic T-cell memory: long-lived responses to vaccinia virus. *J Virol* 1996;70(4):2627–31.
- [9] Sivapalasingam S, Kennedy JS, Borkowsky W, Valentine F, Zhan MX, Pazes P, et al. Immunological memory after exposure to Variola virus, Monkeypox virus, and Vaccinia virus. *J Infect Dis* 2007;195:1151–9.
- [10] Amanna IJ, Slifka MK, Crotty S. Immunity and immunological memory following smallpox vaccination. *Immunol Rev* 2006;211:320–37.
- [11] Combadiere B, Boissonnas A, Carcelain G, Lefranc E, Samri A, Bricaire F, et al. Distinct time effects of vaccination on long-term proliferative and IFN- γ -producing T cell memory to smallpox in humans. *J Exp Med* 2004;199(11):1585–93.
- [12] Puissant-Lubrano B, Bossi P, Gay F, Crance JM, Bonduelle O, Garin D, et al. Control of Vaccinia virus skin lesions by long-term-maintained IFN- γ + TNF- α + effector/memory CD4 + lymphocytes in humans. *J Clin Invest* 2010;120(5):1636–44.
- [13] Hammarlund E, Lewis MW, Hanifin JM, Mori Mi, Koudelka CW, Slifka MK. Antiviral immunity following Smallpox Virus infection: a case-control study. *J Virol* 2010; 84(24):12754–60.
- [14] Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999;401:708–12.
- [15] Masopust D, Vezyz V, Marzo AL, Lefrancois L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 2001;291:2413–17.
- [16] Reinhardt RL, Khoruts R, Merica A, Zell T, Jenkins MK. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 2001;410:101–5.
- [17] Lanzavecchia A, Sallusto F. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nat Rev Immunol* 2002;2(12):982–7.
- [18] Lanzavecchia A, Sallusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol* 2005;17(3):326–32.
- [19] Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naïve, central memory and effector memory CD4 + T cells. *Pathol Biol (Paris)* 2003;51(2):64–6.
- [20] Campbell JJ, Bowman EP, Murphy K, Youngman KR, Siani MA. 6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3beta receptor CCR7. *J Cell Biol* 1998;141:1053–9.
- [21] Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999;99:23–33.
- [22] Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004;22:745–63.
- [23] Judkowski V, Bunyng A, Ge F, Appel JR, Law K, Sharma A, et al. GM-CSF production allows the identification of immunoprevalent antigens recognized by human CD4 + T cells following smallpox vaccination. *PLoS One* 2011;6(9):e24091.
- [24] Silva Gomes JA, de Araújo FF, de Souza Trindade G, Quinan BR, Drumond BP, Ferreira JM, et al. Immune modulation in primary Vaccinia virus zoonotic human infections. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:974067.
- [25] Campos MAS, Kroon EG. Critical period for irreversible block of Vaccinia virus replication. *Rev Microbiol* 1993;24:104–10.
- [26] Karem KL, Reynolds M, Hughes C, Braden Z, Nigam P, Crotty S, et al. Monkeypox-induced immunity and failure of childhood smallpox vaccination to provide complete protection. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:1318–27.
- [27] Heymann DL, Szczeniowski M, Esteves K. Re-emergence of monkeypox in Africa: a review of the past six years. *Br Med Bull.* 1998;54(3):693–702.
- [28] Bunce C, Bell EB. CD45RC isoforms define two types of CD4 memory T cells, one of which depends on persisting antigen. *J Exp Med* 1997;185:767–76.
- [29] Bradley LM, Duncan DD, Tonkonogy SL, Swain SL. Characterization of antigen-specific CD4 + effector T cells in vivo: immunization results in a transient population of MEL-14-, CD45RB- helper cells that secretes IL-2, IL-3 and IL-4. *J Exp Med* 1991;174:547–59.
- [30] Laouar A, Manocha M, Haridas V, Manjunath N. Concurrent generation of effector and central memory CD8 T cells during vaccinia virus infection. *PLoS One* 2008;3(12):e4089.

ANEXO D – ARTIGO 3

Clinical signs, diagnosis, and case reports of *Vaccinia virus* infections

ABSTRACT

Vaccinia virus is responsible for a zoonosis that usually affects cattle and human beings in Brazil. The initial clinical signs of the infection are focal red skin areas, fever, and general symptoms similar to those of a cold. Then, pustules and ulcerated lesions surrounded by edema and erythema follow, as well as local lymphadenopathy that can last for weeks. Cure and healing of the lesions occur over several weeks, leaving a typical scar in the skin of people and animals affected. The infection definitive diagnosis is made through morphological characterization of the virus by use of electron microscopy, followed by PCR for specific viral genes. Since 1963, circulating orthopoxviruses in infectious outbreaks in several regions of Brazil have been reported. Later, the etiological agent of those infections was characterized as samples of *Vaccinia virus*. In addition, the widespread use of those viruses in research laboratories and mass vaccination of militaries have contributed to increase the cases of those infections worldwide. Thus, several epidemiological and clinical studies are required, as well as studies of viral immunology, public health, and economic impact, because little is known about those *Vaccinia virus* outbreaks in Brazil.

Keywords: Poxviridae infections, virology, outbreaks, zoonoses, *Vaccinia virus*.

[Braz J Infect Dis 2010;14(2):129-134]©Elsevier Editora Ltda.

INTRODUCTION

Poxviruses are epitheliotropic viruses that have in common the tendency to cause skin lesions. They are complex viruses that replicate in cell cytoplasm of vertebrate and invertebrate hosts.¹

Virions are constituted by a membrane, a nucleus, and lateral bodies, with or without an envelope. They have an ovoid or rectangular shape, and their genetic material is a linear double-strand DNA molecule, which can encode approximately 200 proteins (Figure 1).¹⁻⁴

Of the known poxviruses, a genus stands out due to its medical importance and because it serves as a model for studying the *Orthopoxvirus* viral family, which comprises the smallpox virus and *Vaccinia virus* (VACV).¹⁻⁴

Smallpox was eradicated worldwide in 1980, after a large vaccination campaign, in which *Vaccinia virus* was used as a vaccinal vector, due to its high genetic similarity with the smallpox virus.⁵

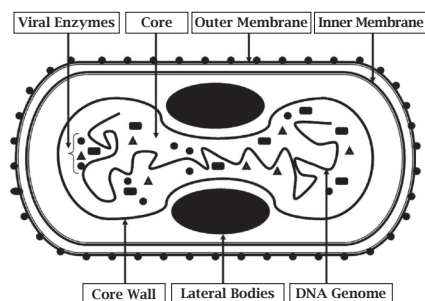
Vaccinia virus is responsible for an important zoonotic disease affecting cattle and hu-

man beings in Brazil. The human zoonotic infections caused by poxviruses are relatively rare.⁶

However, zoonoses caused by poxviruses have occurred in regions far from their endemic areas, such as the outbreak of Monkeypox (MPXV) in central North-American states during May and June 2003, which was the first identified out of Africa.⁷⁻⁹

In Brazil, since 1960, innumerable outbreaks related to *Vaccinia virus* have been documented by several research groups in different regions. Based on molecular studies, some

Figure 1: Illustration of the morphology of the *Vaccinia virus*.



Authors

Daniela Carla Medeiros-Silva^{1,2}

Eduardo Augusto dos Santos Moreira-Silva^{1,2}

Juliana de Assis Silva Gomes^{1,3}

Flávio Guimarães da Fonseca^{1,4}

Rodrigo Correa-Oliveira¹

¹Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), MG, Brazil, Ministério da Saúde.

²Department of Biochemistry and Immunology, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

³Department of Morphology, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

⁴Department of Microbiology, Biological Sciences Institute (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Submitted on: 01/20/2009

Approved on: 08/28/2009

Correspondence to:

Eduardo Augusto dos Santos Moreira Silva
Av. Dom Orione, 75
– São Luiz;
Belo Horizonte – MG
– Brazil
CEP: 31310-020
Phone: 55 31 88079591
E-mail: duduaugusto1@cpqrr.fiocruz.br

We declare no conflict of interest.

genetic variations have already been identified in the viruses isolated. An especially relevant finding was the isolation of two genetically different samples of *Vaccinia virus* from a single outbreak in the town of Guarani, in the Brazilian state of Minas Gerais.¹⁰

The number of human cases and new viruses isolated should increase because new epidemic foci have been reported in different areas. It has not been possible to deter-

mine whether *Vaccinia virus* infections are actually increasing or if reports have only recently begun.¹¹

Episodes of *Vaccinia virus* infection in people who work at research laboratories have already been reported by the Center for Disease Control and Prevention (CDC), contributing to increase the number of infection cases.¹² The virus infection has occurred both in individuals previously vaccinated in childhood,¹³⁻¹⁴ and in people never vaccinated

Table 1. Clinical manifestations, viral diagnosis, and transmission of *Vaccinia virus*

Clinical manifestations		Viral diagnosis		Transmission	
Local	<p>Start: focal red areas</p> <p>In a few days: pustules, edema and erythema in hands and forearms.^{6,11,25}</p> <p>After approximately 12 days: ulcerated, necrotic and painful lesions.^{6,11,25}</p> <p>A few days later, most lesions heal forming crusts.</p> <p>Approximately four weeks after lesion start: cure.</p> <p>Local lymphadenopathy that can last 20 days.^{6,11,25}</p> <p>Secondary bacterial infections can occur in sites of original lesions.²⁶</p>	Morphologic	<p>Inoculation of samples of lesions and crusts into allantochorionic membrane.</p> <p>Viral propagation in VERO cells and visualization of the viral particles through transmission electron microscopy.^{11,23,27-28}</p>	Animals	<p>Transmission among animals occurs mainly through the milker's hands or mechanical milking equipment. Viral penetration occurs through preexisting lesions in cows' teats.^{11,27,32}</p>
Systemic	<p>Fever, headache, muscle ache, nausea (occasionally) that begin eight days after the appearance of the lesions.^{6,11,25}</p>	Molecular	<p>PCR of marking genes: thymidine kinase (TK), vaccinia virus growth factor (VGF), hemagglutinin (HA).^{11,27,29}</p> <p>Polymorphism of the restriction profile of <i>ati</i> gene.^{6,30} Real-time PCR of <i>ha</i> gene, by using SYBR Green.³¹</p>	Human beings	<p>The disease is transmitted from animals to humans through contact with the lesions in cow's teats.³³</p>

before.¹⁵ Transmission usually occurs through accidental inoculation of *Vaccinia virus* through lesions in fingers and eyes, or through auto-inoculation.¹³⁻¹⁶

In addition to the cases of laboratory infection, cases from person-to-person contamination have been reported. Such cases are closely related to the vaccination of militaries against *Smallpoxvirus*.¹⁷⁻¹⁸ Ten cases of infection by those viruses presumably transmitted through sexual contact have been reported in association with vaccination programs in the USA and Israel.¹⁹⁻²¹

Moreover, one case of vaccinia infection has been reported in a pregnant woman bitten by a dog previously vaccinated against rabies with a recombinant *Vaccinia virus*.²²

Clinical signs, transmission, and viral diagnosis

Vaccinia virus infections can be characterized as occupational zoonotic infections because they occur in human beings who work directly with cattle, the milkers.²³ A fact of great relevance for public health is that physicians and other health care professionals have difficulty in diagnosing and managing these infections.²⁴

The clinical manifestations, transmission, and viral diagnosis are shown in Table 1.

Vaccinia virus outbreaks in Brazil

Vaccinia virus outbreaks usually occur in small rural properties, with little infrastructure, and surrounded by woods. In most of these places, milking is performed manually, without the adoption of biosafety measures. These factors are believed to contribute to virus dissemination from cattle to milkers and vice-versa.²³

This zoonosis seems to occur seasonally, mainly in the dry season, from July to September. Dry weather conditions seem to favor disease appearance and dissemination, since it contributes to dry cows' teats and milkers' hands, enabling the occurrence of lesions that cause the virus transmission from animals to men and vice-versa.³³

Poxviruses isolated in Brazil

In South America a few studies on the isolation of *poxvirus* have been published since the eradication of smallpox. Some have reported outbreaks caused by *Parapoxvirus* in sheep and goats, and the virus isolation from wild or domestic animals.¹¹

However indications that members of the *Orthopoxvirus* genus could be circulating actively in wild regions have been reported in Brazil since 1963.²⁸⁻²⁹ In the 1960s and 1970s, the Brazilian govern carried out several campaigns of epidemiological surveillance in several rural areas of the country aiming at investigating the circulation of unknown viral agents and also the isolation of such new agents.²⁹

Studies conducted from 1999 to 2007 in municipalities of Cantagalo, Cordeiro, Aperibé, Santo Antonio de Pádua, Cambuci, and Miracema have reported several cases of *Vaccinia virus* infection affecting both bovine animals and human beings.³⁴

Several viruses isolated in Brazil in different regions after outbreaks of bovine smallpox are listed below. A summary containing viral samples isolated, hosts, and places of the outbreaks of *Vaccinia virus* infection are shown in Figure 2.

BeAn virus 58058: Belém Vaccinia virus

The *BeAN virus 58058* (BAV) was isolated in 1963 from the blood of a rodent of the *Oryzomis* genus in the tropical rain forest, in the region of Belém-do-Pará. After morphologic and molecular analyses, BAV was included in the *Poxviridae* family, considered a member of the *Orthopoxvirus* genus and a variant of *Vaccinia virus*, and denominated Belém *Vaccinia virus*.²⁸⁻²⁹

In addition, the type-A inclusion body (*ati*) gene could not be amplified through PCR, indicating its probable deletion. The IFN-IFN- α/β R gene was identified in the BAV genome, which showed a 99% identity with the B18R gene of the VACV-WR sample, a gene related to the evasion of the host immune system.³⁵

Figure 2: Isolated viral samples, hosts, and places of the outbreaks of *Vaccinia virus* infection. *The SPAn232 virus was initially isolated in 1965 and classified as *Cotia virus* (LOPES *et al.* 1965).²³

	1961	1693	1979	1993	1999	2000	2001	2003	
Viral Sample	<i>Cotia Virus</i>	<i>BeAn virus 58058</i>	<i>SPAn232 Virus</i>	<i>Belo Horizonte Virus</i>	<i>Cantagalo Virus</i>	<i>Araçatuba Virus</i>	<i>Muriaé Virus</i>	<i>Guarani P1 virus</i> <i>Guarani P1 virus</i>	<i>Passatempo Virus</i>
Infected hosts	sentinel rats	<i>Oryzomis</i> sp Rodent	sentinel rats	Swiss mice	Cows and milkers	Cows and milkers	Cows and milkers	Cows and milkers	Cows and milkers
Place of occurrence	Cotia forest, São Paulo State	Tropical Rain Forests, Belém-do-Pará	Cotia forest, São Paulo State	Biological Sciences Institute of UFMG	Municipality of Cantagalo, Rio de Janeiro State	Araçatuba town, São Paulo State	Muriaé town, Minas Gerais State	Guarani town, Minas Gerais State	Passa-Tempo town, Minas Gerais State
References	LOPES <i>et al.</i> , 1965 [23]	DAFONSECA <i>et al.</i> , 1998 [15]	DA FONSECA <i>et al.</i> ,2002 [16]	TRINDADE <i>et al.</i> , 2004 [29]	DAMASO <i>et al.</i> , 2000 [14]	TRINDADE <i>et al.</i> ,2003 [11]	TRINDADE <i>et al.</i> , 2007b [19]	TRINDADE <i>et al.</i> , 2006 [10]	LEITE <i>et al.</i> , 2005 [13]

SPAN232 virus (SPANv)

The *SPAN232 virus* (SPANv) was initially isolated in 1961 from sentinel rats in the Cotia forest in the state of São Paulo.³⁶ The virus was re-isolated several times and suggested to be a recombinant of *Leporipoxvirus* and *Orthopoxvirus*.³⁷⁻³⁹ It was originally grouped among the *Cotia virus*, but, after genetic analyses, it was considered a variant of *Vaccinia virus*. The *tk*, *vgf*, and *ati* genes were amplified and identified in genome of SPANv, and showed a 99% similarity with correlate genes in VACV-WR.²⁹

Cantagalo virus

The *Cantagalo virus* (CTGV) was isolated from cattle and milkers in 1999, during an exanthematic outbreak, in farms of the municipality of Cantagalo, southwestern region of the state of Rio de Janeiro. Morphologic and molecular evidence has confirmed that CTGV was a *Vaccinia virus* variant.^{27,40}

After molecular analyses of the *ha* gene, a close relation of *Cantagalo virus* and VACV used in vaccination campaigns against smallpox in Brazil has been demonstrated.²⁷ It has been suggested that this sample escaped into the wild, establishing several cycles of transmission in one or more hosts, accumulating polymorphisms, reemerging, then, as *Cantagalo virus* in cattle and milkers.^{27,40}

From October 2001 to July 2003, the Instituto Adolfo Lutz received 74 samples suggesting *Vaccinia virus* infection, from regions of the Brazilian states of São Paulo, Minas Gerais, and Goiás. Molecular analyses have categorized them as 99.9% similar to *Cantagalo virus*, differing only by a single nucleotide in position 616.⁴¹

Muriaé virus

In August 2000, an outbreak affecting cattle and milkers occurred in several farms of dairy cattle in the state of Minas Gerais. One virus was isolated and denominated *Muriaé virus* (MURV).²⁴

During molecular characterization, when amplifying the *ha* gene, a deletion of 18 nucleotides was observed, allowing this virus introduction in the group of PSTV,²³ ARAV,¹¹ GP2V,¹⁰ and CTGV.²⁷ Despite these similarities, *Muriaé virus* had unique characteristics that allowed its differentiation from other samples of VACV.²⁴

Passatempo virus

The *Passatempo virus* (PSTV) was isolated and identified after an outbreak in 2003, in the town of Passa-Tempo, Minas Gerais. During that outbreak, cows and milkers had lesions similar to those observed during other *Vaccinia virus* outbreaks in Brazil. When analyzing the blood of patients, antibodies against VACV-WR were identified.²³

That *Vaccinia virus* variant, denominated *Passatempo virus*, has a deletion of 18 nucleotides in *ha* gene, which represents a genetic signature of some samples found in Brazil.²³

Belo Horizonte virus

The *Belo Horizonte virus* (VBH) was isolated from an outbreak in mice of the facilities of the Biological Sciences Institute (ICB) of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), in the state of Minas Gerais. The mice were brought from the University of Campinas, São Paulo, and seemed healthy upon their arrival at the UFMG. A few days later, some animals died and others showed skin lesions. The virus isolated from the clinical samples was a variant of *Vaccinia virus*, denominated *Belo Horizonte virus*.⁴²

The origin of the *Belo Horizonte virus* remains unknown, since there is no research in the city of Campinas involving poxvirus. Those mice might have been contaminated by other animals of the nursery of ICB of UFMG, where some colonies of mice from other places are received. However, it is practically impossible to discover the virus actual origin. However, the ubiquitous circulation of different *Vaccinia virus* strains in Brazil, both from wild or veterinary origins, suggests that epidemiological studies are extremely important.⁴²

Araçatuba virus

In 1999, in the city of Araçatuba, São Paulo, a virus was isolated after an exanthematic outbreak. The infection affected cattle and one milker, who developed approximately 10 lesions in his hands and arms. No similar episode had previously occurred in that farm.¹¹

The isolated virus was a *Vaccinia virus* variant, and was called *Araçatuba virus* (ARAV). It had a deletion identical to that of *Cantagalo virus*.¹¹ It is worth emphasizing that similar genetic signatures occurred in the municipality of Cantagalo, located approximately 850 km to the east of Araçatuba, and in the town of Muriaé, 850 km to the north of Araçatuba, creating speculations about the origin of these viruses.¹¹

Guarani virus

In October 2001, there was an outbreak in the town of Guarani, Minas Gerais, in the southeastern region of the country. An epidemiological study was carried out in the affected region and involved 72 properties. The study reported that 1,020 milking cows had lesions in their teats. Human cases of this disease were identified in 83% of the farms, and approximately 110 individuals were infected. In some farms, the milkers reported person-to-person transmission.¹⁰

For laboratory diagnosis and viral isolation, samples from the dry crusted lesions of two cows were collected. Each cow belonged to a different farm, approximately 10 km apart. Two viruses were isolated and denominated *Guarani P1 virus* (GP1V) and *Guarani P2 virus* (GP2V). Although isolated during the same outbreak and at the same time in neighboring farms, the GP1V and GP2V showed sufficient genetic divergences to be placed at different sites in the phy-

logenetic tree. While GP2V was placed with other samples of VACV isolated from bovine outbreaks of *Vaccinia virus* (ARAV, CTGV e PSTV), GP1V was placed with VACV-WR and VBH that are not associated with bovine outbreaks.¹⁰

These results indicate that there are genetically different populations of VACV circulating in the country and even in the same infectious outbreak. There are no conclusive studies on the actual origin of the Brazilian *Vaccinia virus*.

FINAL CONSIDERATIONS

Vaccinia virus infections are extremely relevant for public health and dairy economy in Brazil, although little is known about the virus flow in the wild and its natural hosts. It is difficult to define whether such infections have actually been increasing or if reporting has only recently started. In addition, health care professionals have difficulty in diagnosing and managing such infections.

Thus, implementation of educational strategies with health professionals and milkers who work in affected regions is required. For health care professionals, these strategies should be directed to the clinical identification and therapeutic management of infected patients. For milkers, the educational practices should emphasize biosafety aiming at preventing their contamination with the *Vaccinia virus* and reducing crossed infection in cattle. In addition, geoprocessing studies aiming at outlining the virus infectious flow are extremely important for the creation of health care strategies to decrease infection propagation, both among cattle and from cattle to human beings. Furthermore, several epidemiological and clinical studies are required, as well as studies of viral immunology, public health, and economic impact, because little is known about *Vaccinia virus* outbreaks in Brazil.

REFERENCES

- Moss B. *Poxviridae: the viruses and their replication*. In: Knipe, DM; Howley, PM *Fields Virology*. 4.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- ICTVdB Management (2006). 00.058.1.01.001. *Vaccinia virus*. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA, 2006.
- Buller RM, Palumbo GJ. Poxvirus pathogenesis. *Microbiol Rev*. 1991; 55(1):80-122.
- Condit RC, Moussatche N, Traktman P. In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion. *Adv Virus Res*. 2006; 66:31-124.
- Fenner F, Henderson DA, Arita I, Jezek Z, Ladnyi ID. *Smallpox and its eradication*. Geneva: World Health Organization, 1988.
- Lewis-Jones S. Zoonotic poxvirus infections in humans. *Curr Opin Infect Dis*. 2004; 17(2):81-9.
- Reed KD, Melski JW, Graham MB *et al.* The detection of monkeypox in humans in the Western Hemisphere. *N Engl J Med*. 2004; 350(4):342-50.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate outbreak of monkeypox--Illinois, Indiana, and Wisconsin, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2003; 52(23):537-40.
- Likos AM, Sammons SA, Olson VA *et al.* A tale of two clades: monkeypox viruses. *J Gen Virol*. 2005; 86(Pt 10):2661-72.
- Trindade GS, Lobato ZI, Drumond BP *et al.* Short report: Isolation of two *vaccinia virus* strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: Implications on the emergence of zoonotic *orthopoxviruses*. *Am J Trop Med Hyg*. 2006; 75(3):486-90.
- de Souza Trindade G, da Fonseca FG, Marques JT *et al.* *Araçatuba virus*: a vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9(2):155-60.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Laboratory-acquired vaccinia exposures and infections--United States, 2005-2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2008; 57(15):401-4.
- Moussatché N, Tuyama M, Kato SE *et al.* Accidental infection of laboratory worker with *vaccinia virus*. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9(6):724-6.
- Loeb M, Zando I, Orvidas MC *et al.* Laboratory-acquired vaccinia infection. *Can Commun Dis Rep*. 2003; 29(15):134-6.
- Wlodaver CG, Palumbo GJ, Waner JL. Laboratory-acquired vaccinia infection. *J Clin Virol*. 2004; 29(3):167-70.
- Lewis FM, Chernak E, Goldman E *et al.* Ocular vaccinia infection in laboratory worker, Philadelphia, 2004. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12(1):134-7.
- Hu G, Wang MJ, Miller MJ *et al.* Ocular vaccinia following exposure to a smallpox vaccinee. *Am J Ophthalmol*. 2004; 137(3):554-6.
- Egan C, Kelly CD, Rush-Wilson K *et al.* Laboratory-confirmed transmission of *vaccinia virus* infection through sexual contact with a military vaccinee. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(11):5409-11.
- Andreev VC, Lachapelle JM, Rook AJ. An outbreak of accidental vaccinia in a family. *Dermatol Int*. 1969; 8(1):5-9.
- Humphrey, DC. Localized accidental vaccinia infection of the vulva: report of 3 cases and a review of the world literature. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 1963; 86:460-469.
- Lane JM, Fulginiti VA. Transmission of *vaccinia virus* and rationale for measures of prevention. *Clin Infect Dis*. 2003; 37(2):281-4.
- Rupprecht CE, Blass L, Smith K *et al.* Human infection due to recombinant vaccinia-rabies glycoprotein virus. *N Engl J Med*. 2001; 345(8):582-6.
- Leite JA, Drumond BP, Trindade GS *et al.* *Passatempo virus*, a *vaccinia virus* strain, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11(12):1935-8.
- Trindade GS, Drumond BP, Guedes MI *et al.* Zoonotic *vaccinia virus* infection in Brazil: clinical description and implications for health professionals. *J Clin Microbiol*. 2007b; 45(4):1370-2.
- Trindade GS, Guedes MI, Drumond BP *et al.* Zoonotic *Vaccinia Virus*: Clinical and Immunological Characteristics in a Naturally Infected Patient. *Clin Infect Dis*. 2009; 48(3):37-40.
- Trindade GS, Emerson GL, Carroll DS, Kroon EG, Damon IK. Brazilian *vaccinia viruses* and their origins. *Emerg Infect Dis*. 2007a; 13(7):965-72.
- Damaso CR, Esposito JJ, Condit RC, Moussatché N. An emergent Poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: *Cantagalo virus* may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology*. 2000; 277(2):439-49.
- Fonseca FG, Lanna MC, Campos MA *et al.* Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. *Arch Virol*. 1998; 143(6):1171-86.

29. da Fonseca FG, Trindade GS, Silva RL *et al.* Characterization of a vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. *J Gen Virol.* 2002; 83(Pt 1):223-8.
30. Meyer H, Ropp SL, Esposito JJ. Gene for A-type inclusion body protein is useful for a polymerase chain reaction assay to differentiate *orthopoxviruses*. *J Virol Methods.* 1997; 64(2):217-21.
31. de Souza Trindade G, Li Y, Olson VA *et al.* Real-time PCR assay to identify variants of *Vaccinia virus*: Implications for the diagnosis of bovine vaccinia in Brazil. *J Virol Methods.* 2008; 152(1-2):63-71.
32. Schatzmayr HG, Lemos ER, Mazur C *et al.* Detection of poxvirus in cattle associated with human cases in the State of Rio de Janeiro: preliminary report. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000; 95(5):625-7.
33. Lobato ZIP, Trindade GS, Frois MCM *et al.* Surto de varíola bovina causada pelo vírus *Vaccinia* na região da Zona da Mata Mineira. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2005; 57(4):423-9.
34. Simonetti BR, Abreu DC, Simonetti JP *et al.* Animal infections by vaccinia-like viruses in the state of Rio de Janeiro 1-North-western region. *Virus Reviews and Research* 2007; 12:32-36.
35. Marques JT, Trindade GD, Da Fonseca FG *et al.* Characterization of ATI, TK and IFN-alpha/betaR genes in the genome of the BeAn 58058 virus, a naturally attenuated wild *Orthopoxvirus*. *Virus Genes.* 2001; 23(3):291-301.
36. Lopes OS, Lacerda JP, Fonseca IE *et al.* *Cotia virus*: a new agent isolated from sentinel mice in São Paulo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1965; 14:156-7.
37. Ueda Y, Dumbell KR, Tsuruhara T, Tagaya I. Studies on *Cotia virus* an unclassified poxvirus. *J Gen Virol.* 1978; 40(2):263-76.
38. Ueda Y, Morikawa S, Watanabe T. Unclassified poxvirus: characterization and physical mapping of *Cotia virus* DNA and location of a sequence capable of encoding a thymidine kinase. *Virology.* 1995; 210(1):67-72.
39. Esposito JJ, Palmer EL, Borden EC, Harrison *et al.* Studies on the poxvirus *Cotia*. *J Gen Virol.* 1980; 47(1):37-46.
40. Damaso CR, Reis SA, Jesus DM, Lima PS, Moussatché N. A PCR-based assay for detection of emerging vaccinia-like viruses isolated in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007; 57(1):39-46.
41. Nagasse-Sugahara TK, Kisielius JJ, Ueda-Ito M *et al.* Human vaccinia-like virus outbreaks in São Paulo and Goiás States, Brazil: virus detection, isolation and identification. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2004; 46(6):315-22.
42. Trindade GS, da Fonseca FG, Marques JT *et al.* *Belo Horizonte virus*: a vaccinia-like virus lacking the A-type inclusion body gene isolated from infected mice. *J Gen Virol.* 2004; 85(Pt 7):2015-21.