

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

LINFÓCITOS T CD4<sup>+</sup> E CD8<sup>+</sup> PARTICIPAM DA  
RESPOSTA IMUNE DE MEMÓRIA CONTRA A  
INFECÇÃO HUMANA NATURAL PELO  
*VACCINIA VIRUS*

DANIELA CARLA MEDEIROS

Belo Horizonte

2013

DANIELA CARLA MEDEIROS

LINFÓCITOS T CD4<sup>+</sup> E CD8<sup>+</sup> PARTICIPAM DA  
RESPOSTA IMUNE DE MEMÓRIA CONTRA A  
INFECÇÃO HUMANA NATURAL 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 Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Correa Oliveira

Doutoranda: Daniela Carla Medeiros Silva

Belo Horizonte

2013

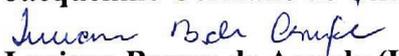


Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE DANIELA CARLA MEDEIROS SILVA.** Aos dezoito dias do mês de dezembro de 2013 às 14:00 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 "Linfócitos T CD4+ e CD8+ participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural 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 à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Jacqueline Germano de Oliveira (Centro de Pesquisas René Rachou-Fiocruz), aprovada; Dr. Luciana Barros de Arruda (Universidade Federal do Rio de Janeiro), aprovada; Dr. Cláudio Antonio Bonjardim (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Fabiana Simão Machado (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira - Orientador (Centro de Pesquisas Rene Rachou-FIOCRUZ-MG), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata 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, 18 de dezembro de 2013.

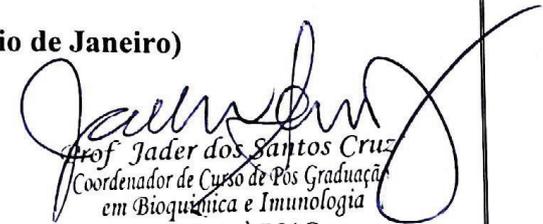
  
 Dr. Jacqueline Germano de Oliveira (Centro de Pesquisas René Rachou-Fiocruz)

  
 Dr. Luciana Barros de Arruda (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

  
 Dr. Cláudio Antonio Bonjardim (UFMG)

  
 Dr. Fabiana Simão Machado (UFMG)

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

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

Ao Du, Bianca e a Deus por tudo, pelo apoio na realização desse trabalho no laboratório.

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.

Ao Du, por toda a sua paciência, perseverança, apoio, respeito, colaboração e amor, aspectos essenciais para o sucesso desse trabalho. Obrigada 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.

*"Uma coisa que eu aprendi ao longo da vida: que toda nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil - e, ainda assim, é a coisa mais preciosa que temos."*

*(Albert Einstein)*

## RESUMO

O presente estudo avaliou a resposta imune de memória de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de pacientes após uma infecção natural pelo Vaccinia virus (VACV). Um total de 42 indivíduos participaram do estudo sendo: 22 indivíduos previamente infectados pelo VACV (destes 12 com vacinação prévia contra a varíola e 10 não vacinados) e 20 indivíduos não infectados (sendo 10 previamente vacinados e 10 não). Foi realizada uma curta estimulação *in vitro* das células do sangue total desses indivíduos com o VACV inativado por luz UV. Nosso estudo demonstrou que indivíduos previamente infectados (vacinados ou não) tinham um menor percentual de células T CD4<sup>+</sup> expressando receptores de migração e adesão linfocitária (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) e uma maior porcentagem de subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> ativadas (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>High</sup>, CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) quando comparados com indivíduos não infectados (vacinados ou não), após estimulação *in vitro* de células do sangue periférico. Também foi observado que os pacientes previamente infectados (vacinados ou não) apresentaram um maior percentual de células T de memória CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> expressando IFN- $\gamma$  quando comparados com os voluntários não infectados (vacinados ou não). Observou-se ainda que houve uma maior porcentagem de linfócitos T de memória CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> expressando TNF- $\alpha$  nos indivíduos que já haviam sido previamente expostos ao VACV, seja pela vacinação prévia ou infecção pelo VACV. Além disso, foi demonstrado que os indivíduos previamente infectados possuíam maior percentual de células T CD8<sup>+</sup> expressando marcadores de adesão e migração celular (CCR7<sup>+</sup> and CD62L<sup>+</sup>) e que essas células co-expressavam IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , após estimulação antigênica. Portanto, nossos resultados sugerem que tanto as células T CD4<sup>+</sup> como T CD8<sup>+</sup> estão envolvidas na resposta imune de memória contra a infecção pelo *Vaccinia virus*, porém mostra algumas diferenças no padrão de respostas dessas células ao vírus em questão.

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

**Apoio financeiro:** CAPES/CNPQ/FAPEMIG

## ABSTRACT

The present study evaluates the immune response of memory CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> T cells expressing lymph-node homing receptors (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) and higher percentage of memory CD4<sup>+</sup> T cells subsets (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>High</sup>) when compared with non-infected subjects, after *in vitro* viral stimulation. We also showed that infected individuals presented higher percentages of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> memory T lymphocytes expressing IFN- $\gamma$  when compared to non-infected individuals. We verified that the percentage of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T memory cells expressing TNF- $\alpha$  were 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<sup>+</sup> T cells expressing lymph-node homing receptors (CCR7<sup>+</sup> and CD62L<sup>+</sup>) and that the memory T cells expressing IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  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<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells are involved in the immune memory response against *Vaccinia virus* natural infection.

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

**Financial support:** CAPES/CNPQ/FAPEMIG

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b>	<b>Seleção da população de linfócitos T CD4+, co-expressando as moléculas CD62L e CCR7 .....</b>	<b>49</b>
<b>FIGURA 2:</b>	<b>Seleção das populações de linfócitos T CD4+, co-expressando as moléculas CD45RO, CD62L e IFN-<math>\gamma</math> .....</b>	<b>51</b>
<b>FIGURA 3:</b>	<b>Seleção de linfócitos T CD4+, expressando citocinas (IFN-<math>\gamma</math> e TNF-<math>\alpha</math>) e os marcadores de ativação celular CD69, CD28, CD40L e CD71 .....</b>	<b>53</b>

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1:	Comparação do percentual de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> expressando moléculas marcadoras de ativação celular (CD71, CTLA-4 e CD28) , entre os grupos de indivíduos infectados ou não, após estimulação <i>in vitro</i> com o VACV inativado .....	62
GRÁFICO 2	Comparação do percentual de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> expressando moléculas marcadoras de ativação celular (CD69 e CD40L) , entre os grupos de indivíduos infectados ou não, após estimulação <i>in vitro</i> com o VACV inativado .....	64
GRÁFICO 3	Avaliação do percentual de TCD4 <sup>+</sup> , co-expressando os marcadores CCR7 e CD62L de indivíduos previamente infectados ou não pelo <i>Vaccinia virus</i> , antes e após estimulação <i>in vitro</i> com o VACV inativado .....	66
GRÁFICO 4	Avaliação do percentual de TCD8 <sup>+</sup> , co-expressando os marcadores CCR7 e CD62L de indivíduos previamente infectados ou não pelo <i>Vaccinia virus</i> , antes e após estimulação <i>in vitro</i> com o VACV inativado .....	67
GRÁFICO 5	Avaliação do percentual de células T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> , expressando o marcador de superfície CD45RO de indivíduos previamente infectados ou não pelo <i>Vaccinia virus</i> , após estimulação <i>in vitro</i> com o VACV inativado .....	69
GRÁFICO 6	Avaliação do percentual de células T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> expressando o marcador de superfície CD62L de indivíduos previamente infectados ou não pelo <i>Vaccinia virus</i> , após estimulação <i>in vitro</i> com o VACV inativado .....	71
GRÁFICO 7	Avaliação do percentual de células TCD4 <sup>+</sup> -, expressando IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ de indivíduos previamente infectados ou não pelo <i>Vaccinia virus</i> , antes e após estimulação <i>in vitro</i> com o VACV inativado .....	73

	Avaliação do percentual de células TCD8 <sup>+</sup> -, expressando IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ de indivíduos previamente infectados ou não pelo <i>Vaccinia virus</i> , após estimulação <i>in vitro</i> com o VACV inativado .....	74
GRÁFICO 8		
	Avaliação do percentual de células T CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> e T CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>High</sup> expressando IFN- $\gamma$ de indivíduos previamente infectados ou não pelo <i>Vaccinia virus</i> , antes e após estimulação <i>in vitro</i> com o VACV inativado .....	75
GRÁFICO 9		
	Expressão de IFN- $\gamma$ por linfócitos T CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>High</sup> de indivíduos previamente infectados ou não pelo <i>Vaccinia virus</i> , após estimulação <i>in vitro</i> com o VACV inativado .....	76
GRÁFICO 10		
	Expressão de TNF- $\alpha$ em células T de memória CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> , antes e após estimulação <i>in vitro</i> com o VACV inativado .....	77
GRÁFICO 11		
	Expressão de IFN- $\gamma$ em linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> , após estimulação <i>in vitro</i> pelo VACV inativado .....	79
GRÁFICO 12		
	Expressão de TNF- $\alpha$ em linfócitos T virgens, após estimulação <i>in vitro</i> pelo VACV inativado .....	81
GRÁFICO 13		

## **LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1:</b>	<b>Caracterização e Distribuição absoluta da amostragem estudada ...</b>	<b>43</b>
<b>TABELA 2:</b>	<b>Distribuição relativa e absoluta dos tipos de sintomas apresentados pelos indivíduos infectados previamente submetidos ou não à vacinação contra a varíola .....</b>	<b>58</b>
<b>TABELA 3:</b>	<b>Componentes do Distribuição relativa das células T (CD3+, CD4+, CD8+) no sangue total de indivíduos pelos 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 .....</b>	<b>60</b>

## **LISTA DE QUADROS**

<b>QUADRO 1: Relação dos anticorpos usados para caracterização dos linfócitos T CD4+ e T CD8+ e suas respectivas funções .....</b>	<b>47</b>
--	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS

ARAV	Araçatuba □írus
BAV	BeAn □írus
BHV	Belo Horizonte □írus
CTGV	Cantagalo virus
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- $\gamma$	Interferon gamma
ITRs	Inverse Terminal Repeat
$\mu$ g	Microgramas
$\mu$ L	Microlitro
mL	Mililitro
$\mu$ 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 □írus
RNA	Ribonucleic acid
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
rpm	Rotações por minuto
Tab	Tabela
Th1	T helper 1
TK	Timidina kinase

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

# SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO .....	16
2) OBJETIVOS .....	39
2.1) Objetivo Geral .....	40
2.1) Objetivos Específicos .....	40
3) METODOLOGIA .....	41
3.1) População estudada .....	42
3.2) Coleta das amostras .....	43
3.3) Avaliação hematológica .....	44
3.4) Células e vírus .....	44
3.5) Ensaio de soroneutralização .....	45
3.6) Ensaio de ELISA IgG .....	45
3.7) Análise de marcadores de superfície e citocinas intracitoplasmáticas em células T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> do sangue periférico após estimulação <i>in vitro</i> .....	46
3.8) Obtenção e análise dos dados no citômetro de fluxo.....	48
3.8.1) População CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> .....	48
3.8.2) População CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ e CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ .....	50
3.8.3) População CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ , CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> CD40L <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> CD71 <sup>+</sup> e CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup> .....	52
3.9) Análise Estatística .....	54
4) RESULTADOS .....	55
4.1) Análise clínico epidemiológica .....	56
4.2) Distribuição relativa dos linfócitos T (CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> ), após estimulação <i>in vitro</i> com VACV das células presentes no sangue total de indivíduos previamente infectados submetidos ou não à vacinação contra a varíola .....	59
4.3) Estudo das subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> .....	60
4.3.1) Avaliação de moléculas marcadoras de ativação do linfócito T.....	60

<i>4.3.2) Análise de Linfócitos T expressando as moléculas de adesão e migração celular CD62L e CCR7 (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) ou não (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>).....</i>	<b>64</b>
<i>4.3.3) Análise de Linfócitos T efetores (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>).....</i>	<b>68</b>
<i>4.3.4) Análise de Linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> .....</i>	<b>70</b>
<i>4.3.5) Estudo do padrão de citocinas intracitoplasmáticas .....</i>	<b>72</b>
<b>5) DISCUSSÃO.....</b>	<b>82</b>
<b>6) CONCLUSÕES .....</b>	<b>94</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>96</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>110</b>
<b>ANEXO 2.....</b>	<b>111</b>

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

## **1) INTRODUÇÃO**

Os *Poxvirus* são vírus epiteliotrópicos que têm em comum a tendência em produzir lesões cutâneas. Eles são vírus complexos que se replicam no citoplasma celular de uma enorme variedade de hospedeiros vertebrados e invertebrados. O genoma destes vírus é constituído por DNA e potencialmente pode codificar cerca de 200 proteínas com diferentes funções, dentre elas, a replicação do DNA viral, a transcrição, a morfogênese da partícula, a interação aos hospedeiros e a evasão do sistema imune (MOSS, 2001; MOSS, 2012).

Os *Poxvirus* são os maiores e mais complexos dentre os vírus animais, apresentando-se sob a forma ovóide ou semelhante a um tijolo e medindo cerca de 350X270nm (MOSS, 2012; CONDIT; MOUSSATCHE; TRAKTMAN, 2006).

A família *Poxviridae* é constituída por vírus envelopados e também não-envelopados, sendo as duas formas virais infecciosas, denominadas vírus maduro (VM) e vírus envelopado extracelular (VE). Os vírus possuem forma ovóide ou de tijolo, contendo como material genético uma molécula de DNA de fita dupla linear ligada covalentemente nas extremidades. Além disso, os membros dessa família caracterizam-se pela capacidade de desenvolverem todo o seu ciclo replicativo no citoplasma das células infectadas, diferentemente dos outros vírus de DNA (MOSS, 2012).

As partículas virais são compostas por quatro elementos estruturais principais: cerne, corpúsculos laterais, membranas lipoprotéicas e envelope. O cerne representa a estrutura mais interna do vírus, sendo um disco ovalado, bicôncavo e envolto por uma camada composta de pequenas subunidades protéicas cilíndricas, denominada paliçada. No interior do cerne, encontra-se o material genético, associado a quatro polipetídeos em uma estrutura denominada de nucleossoma. Nas duas concavidades do cerne, encontram-se estruturas de formas ovóides denominadas corpúsculos laterais cuja composição química e função ainda são desconhecidas. O cerne pode aparecer envolvido por um número variável de membranas lipoprotéicas, de origem celular, gerando duas partículas infecciosas distintas: o vírus maduro intracelular (VM) que contém uma única membrana externa e o vírus envelopado extracelular (VE) que é basicamente um VM com uma membrana adicional chamada de envelope (MOSS, 2012).

O genoma completo dos poxvírus pode variar de 130 kb (*Parapoxvirus*) a 300 Kb (*Avipoxvirus*) e o VACV, especificamente, contém um genoma de aproximadamente 190 Kb. A molécula de DNA dupla fita linear possui em suas extremidades uma

seqüência de repetições terminais invertidas (ITRs), dispostas em direções opostas, que se localizam nas regiões variáveis do genoma. Cada porção terminal é composta de uma seqüência não pareada de 101 nucleotídeos, ligadas covalentemente, formando alças de fita simples em forma de grampo, ricas em timina e adenina (SMITH; MCFADDEN, 2002).

As ITRs são de suma importância, pois possuem regiões codificadoras de genes responsáveis tanto pela interação vírus-hospedeiro quanto por mecanismos de patogênese. Na grande maioria dos poxvírus e, principalmente, nos ortopoxvírus, as seqüências de DNA localizadas na porção central do genoma são altamente conservadas, sendo responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas na replicação viral e proteínas estruturais. As regiões externas do genoma incluem genes relacionados à interação do vírus com seus hospedeiros (MOSS, 2001; CONDIT; MOUSSATCHE; TRAKTMAN, 2006).

Os genes são divididos em três classes de acordo com o momento em quem são expressos: genes imediatamente precoces e precoces que são transcritos antes da replicação do DNA, genes intermediários que são transcritos durante a replicação do DNA, e genes tardios, são aqueles que são expressos após a replicação do DNA (TRAKTMAN, 1990).

A transcrição dos genes imediatamente precoces é realizada exclusivamente por enzimas contidas no próprio vírion como, por exemplo, a RNA polimerase dependente de DNA, enzimas responsáveis pela metilação e poliadenilação dos RNAm recém-sintetizados e fatores de transcrição precoces responsáveis pela ativação dos genes precoces (MOSS, 1996).

A maioria dos genes tardios codifica os polipeptídeos estruturais ou enzimas que farão parte do vírion. Estes genes apresentam em suas regiões promotoras a seqüência conservada TAAAT, onde se ligam os fatores ativadores transcricionais tardios associados às polimerases virais. Existe ainda uma terceira classe de proteínas sintetizadas durante e após a duplicação do DNA viral, constituída principalmente por fatores de transcrição, denominadas de proteínas intermediárias (MOSS, 1996).

A expressão gênica é controlada por um mecanismo em cascata e ocorre na etapa de iniciação da transcrição, ou seja, os fatores transcricionais necessários para a expressão dos genes intermediários são codificados por genes precoces; já os fatores necessários para a expressão dos genes tardios são, por sua vez, produtos de genes intermediários, e aqueles fatores responsáveis pela transcrição de genes precoces são

produtos dos genes tardios, que são alocados no interior da partícula viral para serem utilizados no próximo ciclo de multiplicação (BROYLES, 2003).

O ciclo de multiplicação dos *Poxvirus* ocorre no citoplasma das células hospedeiras, sendo independente do núcleo celular. Esse ciclo pode apresentar diferentes tempos de duração de acordo com o tipo de vírus e a célula infectada. A maior parte das informações sobre o ciclo de replicação dos *Poxvirus* é obtida através de estudos da infecção do *Vaccinia virus* em culturas de células de linhagem contínua. (MOSS, 2012). A primeira etapa do ciclo de multiplicação dos poxvírus inicia-se com a adsorção da partícula viral à superfície da célula hospedeira, seguida da penetração dessa partícula. Devido às diferentes partículas infecciosas existentes, VM e VE, constituídas por diferentes números de membranas e proteínas diversas, o processo de penetração é bastante complexo. Acredita-se que existam mecanismos distintos de ligação e adsorção à célula, dependendo do tipo de partícula viral. (LOCKER *et al.*, 2000; MCFADDEN, 2005; SCHMIDT *et al.*, 2012).

Os mecanismos precisos da penetração dessas partículas infecciosas na célula hospedeira são pouco conhecidos, pois os poxvírus constituem uma família cujos receptores celulares ainda não foram identificados. Sugere-se que esses vírus podem se ligar a glicosaminoglicanos (GAGs), compostos por cadeias lineares de polissacarídeos constituídas por unidades de dissacarídeos sulfatados, localizados na superfície celular (CARTER *et al.*, 2005; SCHMIDT *et al.*, 2012). Na adsorção foi observado que a proteína viral D8 se liga ao condroitin sulfato e as proteínas virais A27 e H3 se ligam ao heparan sulfato (MOSS, 2006).

A penetração do VM se dá pela fusão da membrana viral externa com a membrana plasmática da célula hospedeira. Foi observado que proteínas da membrana viral como A21, A28, H2 e L5, são responsáveis pela penetração do vírus na célula hospedeira e que na ausência destas proteínas pode ocorrer à adsorção viral, mas não sua penetração. (MOSS, 2006; CARTER *et al.*, 2005; SCHMIDT *et al.*, 2011).

Já no que diz respeito à forma VE, o mecanismo de penetração não se dá de forma tão simples, pois o VE possui uma membrana adicional. (CARTER *et al.*, 2005; SCHMIDT *et al.*, 2012). Foi demonstrado que o VE tem seu envelope rompido em uma reação não fusogênica dependente da ligação com poliânions presentes na superfície celular. A dissolução do envelope permitiria a liberação de uma forma VM na superfície celular que penetraria por fusão (LAW *et al.*, 2006). Outro mecanismo proposto refere-se à entrada normal através da fusão de seu envelope e dissolução da membrana restante

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

via endossomos. Para promover sua internalização o VE seria capaz de induzir ativamente uma macropinocitose. (MOSS, 2006; SCHMIDT *et al.*, 2011).

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 (FENNER *et al.*, 2002).

A replicação do DNA viral ocorre entre 2 a 5 horas após a infecção, dependendo dos diferentes membros da família Poxviridae, da multiplicidade da infecção (MOI) e do tipo celular envolvido. O desmembramento do cerne promove a liberação do genoma viral no citoplasma, permitindo a ação de enzimas envolvidas na replicação do DNA. Este processo é realizado, exclusivamente, no citoplasma da célula hospedeira, em regiões granulares, eletrodensas denominadas fábricas virais ou virossomos. Portanto, este processo parece ser independente do núcleo celular e, a maioria das proteínas necessárias à replicação do DNA viral são codificadas pelo próprio vírus. As proteínas envolvidas na replicação do DNA são sintetizadas nos estágios precoces da infecção. (MOSS, 2001; TOLONEN *et al.*, 2001).

A replicação do DNA viral inicia-se com a clivagem das ITRs em sítios específicos na fita parental. Dessa forma, as alças terminais são desfeitas, expondo uma extremidade 3'-OH que irá servir como iniciadora para a síntese da nova cadeia complementar. O DNA recém-sintetizado volta a dobrar-se através do pareamento das ITRs, formando novas alças, dando continuidade à replicação da fita nascente, formando então moléculas concatâmeras. Estas são posteriormente clivadas em moléculas maduras de DNA e empacotadas nas novas partículas virais (TRAKTMAN; BOYLE, 2004).

A montagem das partículas virais começa 5 a 6 horas após a infecção, sendo a sua produção máxima obtida entre 12 e 24 horas. Durante a morfogênese, várias estruturas são formadas: vírus crescentes, vírus imaturo (IV), vírus maduro intracelular (IMV), vírus envelopado intracelular (IEV), vírus envelopado associado à célula (CEV) e o vírus envelopado extracelular (EEV) (TOLONEN *et al.*, 2001; ROBERTS; SMITH, 2008).

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 (HOLLINSHEAD *et al.*, 2001; 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).

Recentemente, foi proposta uma nova nomenclatura para as partículas virais, tendo como base os avanços acerca da estrutura e composição das membranas dos poxvírus. 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

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

são denominadas vírus extracelulares (EV), e possuem uma membrana a menos que os VE. (RESCH *et al.*, 2006).

De acordo com hospedeiro viral, os *Poxvirus* são divididos em duas subfamílias: *Entomopoxvirinae*, cujos membros infectam insetos, e *Chordopoxvirinae*, que compreende os vírus que infectam vertebrados. Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV), a subfamília *Chordopoxvirinae* é constituída de oito gêneros: *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Yatapoxvirus* e *Molluscipoxvirus* (ICTVdB, 2011). Dentre esses, o gênero *Orthopoxvirus* é o de maior interesse para o desenvolvimento desse trabalho.

Dentre os membros do gênero *Orthopoxvirus* destacam-se o *Variola virus* (VARV) e o *Vaccinia virus* (VACV) considerado protótipo não só desse gênero como também da família *Poxviridae*. Muitos estudos são realizados com o VACV pelo fato desse vírus apresentar características básicas que se aplicam aos outros membros da família (MOSS, 2012; CONDIT; MOUSSATCHE; TRAKTMAN, 2006).

O *Vaccinia virus* foi utilizado como vacina para a campanha mundial de erradicação da varíola, devido à semelhança genética e antigênica entre os dois vírus. Além disso, foi o primeiro vírus a ser detalhado por microscopia eletrônica e a ser multiplicado e isolado em cultura de tecidos. Atualmente, o VACV tem sido muito utilizado para a construção de vacinas e vetores de expressão recombinantes (TRAKTMAN, 1990; FENNER, 2000; WALSH; DOLIN, 2011; VERARDI *et al.*, 2012).

Infecções zoonóticas humanas causadas por *Poxvirus* são relativamente raras. A maioria dos casos é ocupacional, auto-limitada, com poucas lesões cutâneas e baixa morbidade (LEWIS-JONES, 2004). Entretanto, zoonoses causadas por *Poxvirus* têm ocorrido frequentemente em regiões distantes de suas áreas endêmicas, como exemplificadas pelo surto de *Monkeypox virus* nos estados centrais americanos, em 2003. Tais ocorrências têm causado preocupação entre autoridades de saúde pública em todo mundo.

No Brasil, em todas as regiões, um número alarmante de vírus geneticamente relacionados ao *Vaccinia virus* tem sido isolados de animais e seres humanos infectados (DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2003). O número de casos humanos e isolamento de novos vírus deverão crescer, uma vez que relatos de novos focos epidêmicos continuam surgindo de diferentes áreas. No entanto, não é possível definir

se essas infecções por *Vaccinia virus* estão aumentando ou se só recentemente, elas têm sido regularmente relatadas (TRINDADE *et al.*, 2003).

As áreas de surto são bastante semelhantes entre si, caracterizadas por pequenas propriedades rurais, com diversos cultivos, pastagens e, de um modo geral, com pouca infra-estrutura e cercadas por florestas. Na maioria desses locais, as ordenhas são realizadas manualmente, sem o uso de equipamentos de proteção individual, como luvas, e sem a adoção de medidas de biossegurança. Acredita-se, portanto, que essa ausência de assepsia possa contribuir para a disseminação do vírus entre o rebanho e os ordenhadores (LEITE *et al.*, 2005).

Desde 1963, todos os *Orthopoxvirus* isolados, no Brasil, foram caracterizados como amostras do *Vaccinia virus*. Essas infecções pelo *Vaccinia virus* podem ser caracterizadas como infecções zoonóticas ocupacionais pelo fato de acometerem seres humanos que trabalham diretamente com o gado, os ordenhadores. O ser humano adquire a doença após entrar em contato com as lesões presentes nas tetas das vacas infectadas, durante o processo manual de ordenha (LEITE *et al.*, 2005).

Além disso, parece que essa zoonose trata-se uma doença sazonal, ocorrendo em determinadas épocas do ano, principalmente no período da seca, entre os meses de julho a setembro. Acredita-se que as condições climáticas desse período favoreçam o aparecimento e disseminação da doença, por tornar as tetas e as mãos dos ordenhadores mais ressecadas, facilitando o aparecimento de lesões e formação de soluções de continuidade que promoveriam a transmissão do vírus dos animais para o homem e deste para o gado (LOBATO *et al.*, 2005). Esse fato é ainda exacerbado pela ausência ou desconhecimento de medidas de biossegurança, como o uso de luvas, no manejo do gado infectado.

Os sinais clínicos destas infecções 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. 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. 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

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

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).

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).

Após a varíola ter sido declarada como erradicada no final dos anos 70, o interesse clínico e científico nos *Poxvirus* decaiu substancialmente. Infecções causadas por ortopoxvírus são relativamente raras. A maioria dos casos são zoonóticos, ocupacionais, auto-limitados, com poucas lesões cutâneas e baixa morbidade, embora o *Monkeypox virus* também possa ser transmitido de pessoa a pessoa. As infecções pelo *Monkeypox virus* assemelham-se clinicamente à infecção pelo *Variola virus* e apresentam uma taxa de mortalidade de 9,8% em pessoas não vacinadas contra a varíola (HUTIN *et al.*, 2001).

No Brasil, até 1999 a maioria das infecções por *Poxvirus* documentadas foi causada 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

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

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 *Cotia virus* e o *BeAn virus 58058* (BAV) foram isolados durante essas campanhas. O *Cotia virus* foi isolado diversas vezes a partir de camundongos sentinelas, na estação florestal de Cotia, São Paulo, durante períodos chuvosos, em 1961 (DA FONSECA *et al.*, 2002).

O *BeAn virus 58058* (BAV) foi isolado em 1963 do sangue de um roedor do gênero *Oryzomys*, numa floresta tropical, na região de Belém-do-Pará. (DA FONSECA *et al.*, 2002).

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 originalmente agrupado entre os *Cotia virus*, mas após análises genéticas ele foi considerado uma variante do *Vaccinia virus* (DA FONSECA *et al.*, 2002).

Em 1999, na cidade de Araçatuba, no Estado de São Paulo, foi isolado um vírus após um surto exantemático, denominado *Araçatuba virus* (ARAV) que, segundo as análises moleculares, tratava-se de uma amostra do *Vaccinia virus* (TRINDADE *et al.*, 2003).

O *Cantagalo virus* (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 (DAMASO *et al.*, 2000).

Em agosto de 2000, um surto afetando o gado e ordenhadores ocorreu em diversas fazendas de gado leiteiro do Estado de Minas Gerais e um vírus foi isolado, sendo denominado de *Muriae virus* (TRINDADE *et al.*, 2007b). Foi realizada a caracterização morfológica, através da inoculação das amostras em membrana corioalantóideia 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 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

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

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).

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. 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) (TRINDADE *et al.*, 2006). 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). 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. Assim, esses vírus teriam não apenas uma origem, mas múltiplas. Isso não exclui a possibilidade de que esses vírus tenham evoluído de uma origem comum, derivados de uma amostra vacinal que escapou para o meio ambiente, sofrendo várias mutações e/ou recombinações genéticas, durante o estabelecimento e a circulação na natureza. Contudo, esses resultados sugerem que a existência de eventos multifatoriais é a melhor explicação para a diversidade genética de VACV encontrada no Brasil, incluindo a pré-existência e circulação de possíveis poxvírus autóctones. (TRINDADE *et al.*, 2006).

O *Passatempo virus* (PSTV) foi isolado e identificado após um surto que se iniciou em 2003, na cidade de Passa-Tempo, no Estado de Minas Gerais (LEITE *et al.*, 2005).

O *Belo Horizonte virus* (VBH) 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. Após análises morfológicas e moleculares, detectou-se que se tratava de uma variante do *Vaccinia virus* (TRINDADE *et al.*, 2004).

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 (DE SOUZA TRINDADE *et al.*, 2003; 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 *ati* 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*

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

*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

O problema relacionado a esses surtos de *Vaccinia virus* não é só uma questão de saúde pública, mas também um problema econômico. As perdas econômicas advindas dessa zoonose não são somente a redução da produção de leite, mas também os gastos veterinários decorrentes de infecções secundárias nas tetas das vacas que levam à mastite. A redução na produção de leite tem um impacto muito grande na economia do país, uma vez que o Brasil é um dos principais exportadores de leite do mundo (LEITE *et al.*, 2005).

Além disso, a ocorrência desses surtos é um fato especialmente relevante, visto que um número cada vez maior de pessoas não tem imunidade contra esses vírus, pois não foram vacinadas durante a campanha de vacinação contra a varíola, promovida pela

Organização Mundial de Saúde (OMS), que terminou há cerca de 30 anos. Essa ausência de imunidade pode criar uma oportunidade para a disseminação desses vírus, no Brasil. (LEITE *et al.*, 2005).

Em relação a estudos de resposta contra os Poxvírus, 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).

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

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).

Em relação à resposta humoral, sabe-se que uma forte resposta anti-poxvírus 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<sup>o</sup>) 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

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

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).

Sabe-se, até o momento, 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).

Atualmente, a maioria dos estudos voltados para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na manutenção da memória imunológica é realizada em pessoas imunizadas contra a varíola. Esses estudos têm como objetivo elucidar a duração da

memória imunológica, o perfil das células de memória e a funcionalidade dessas células.

A memória imune após a vacinação contra a varíola é uma importante referência para entender a cinética e a longevidade da memória de células B e T na ausência de re-exposição ao antígeno, uma vez que a varíola foi declarada erradicada no mundo em 1980 (CROTTY *et al.*, 2003; TAUB *et al.*, 2008).

O *Vaccinia virus*, agente utilizado na vacinação contra a varíola, tem sido um excelente modelo não só para estudar a duração da memória imunológica, mas também para auxiliar a decifrar os mecanismos básicos envolvidos na memória em longo prazo das células de memória B e T e da resposta por anticorpos (AMANNA; SLIFKA; CROTTY, 2006).

Células B de memória específicas para o *Vaccinia virus* são geradas após a imunização e aproximadamente 1,5% das células B de memória IgG<sup>+</sup> circulantes são específicas para o *Vaccinia virus*, um mês após a vacinação (CROTTY *et al.*, 2003).

Crotty e colaboradores (2003) detectaram células B de memória específicas para o *Vaccinia virus* na maioria das pessoas vacinadas, até mesmo naquelas que haviam sido vacinadas há mais de 60 anos. De acordo com esses autores, o número de células B de memória cresce exponencialmente, após a imunização, com uma meia vida menor que um ano. Após os primeiros meses/ano, ocorre um declínio de cerca de 90% no número de células B até atingir um platô e se estabilizar por mais de 50 anos, com uma frequência de células B de memória IgG<sup>+</sup> circulantes de aproximadamente 0,1% do total de células.

Segundo Crotty e colaboradores (2003), as células B de memória específicas em pessoas vacinadas, são mantidas por mais de 50 anos, após a vacinação. Além disso, esses autores detectaram anticorpos vírus-específicos no soro de pessoas vacinadas, observando que os níveis de anticorpos circulantes também se mantinham por mais de 50 anos e correlacionavam-se aos níveis de células B de memória. Esses dados demonstram que a memória imunológica humoral é duradoura, após uma forte exposição inicial ao antígeno.

Crotty e colaboradores (2003), também relataram que após a revacinação desses indivíduos, previamente imunizados, ocorreu uma rápida produção de anticorpos, demonstrando que as células B de tais indivíduos encontravam-se funcionais.

Os níveis de células B de memória específicas para vacina contra a varíola aparentam manterem-se estáveis de 10 a 60 anos após a vacinação, indicando que a

população de células B de memória antígeno-específicas são mantidas por complexos mecanismos. Sabe-se que o nível das células B de memória não sofre o mesmo declínio evidenciado para as células T de memória (HAMMARLUND *et al.*, 2003).

A persistência de uma memória imunológica de longa vida contra o *Vaccinia virus* e o *Variola virus* tem sido amplamente debatida e não se sabe ao certo qual é a sua eficácia em promover a proteção na ausência da circulação e exposição ao *Variola virus* (AMANNA; SLIFKA; CROTTY, 2006; AMANNA; CARLSON; SLIFKA, 2007; PUISSANT; COMBADIÈRE, 2006).

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<sup>+</sup> quanto as células TCD8<sup>+</sup>, de memória, podem persistir na ausência de exposição ao antígeno (SLIFKA, 2004; CROTTY; AHMED, 2004; TOUGH; SPRENT, 2003).

Já foi demonstrado em murinos que as células TCD8<sup>+</sup> de memória não são estáticas. Elas normalmente iniciam uma proliferação homeostática para restabelecer o número de células. Essa proliferação não é dependente de estimulação antigênica ou de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade da classe I (MHC I). Em camundongos, a população de células TCD8<sup>+</sup> de memória mantém-se estável, enquanto o número de células TCD4<sup>+</sup> declina lentamente. Já foi observado que as citocinas estão envolvidas na manutenção de células T de memória. Assim, a IL-15 e a IL-7 são importantes na manutenção da população de células TCD8<sup>+</sup> de memória e das células TCD4<sup>+</sup> (AMANNA; SLIFKA; CROTTY, 2006; BECKER *et al.*, 2005; LENZ *et al.*; 2004).

Em seres humanos duas subpopulações de células T de memória (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) foram descritas de acordo com sua capacidade migratória e função efetora: as células T de memória central (T<sub>CM</sub>) e as células T de memória efetora (T<sub>EM</sub>) (SALLUSTO *et al.*, 1999; MASOPUST *et al.*, 2001; REINHARDT *et al.*, 2001; RICHARDS *et al.*, 2007).

Essas células de memória distinguem entre si pela expressão ou não de moléculas em sua superfície, como as moléculas CD45RO, CD62L e CCR7. A molécula CD45, um antígeno comum de leucócitos, é uma tirosina fosfatase transmembrana que está diretamente envolvida na ativação e adesão de linfócitos. Essa molécula é expressa em diferentes isoformas, através do splicing alternativo do RNAm. Nos seres humanos, a maioria das células T inativas expressa uma isoforma de 200kD da molécula de superfície CD45 que contém um segmento codificado por um éxon de

designado como A, sendo essa isoforma designada como CD45RA. Por outro lado, a maioria das células T de memória ativadas expressa a isoforma de 180kD do CD45 na qual o RNA do éxon A foi retirado, sendo essa isoforma denominada de CD45RO (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Portanto, células T virgens expressam CD45RA e células de memória expressam CD45RO. Outras duas moléculas importantes na diferenciação de células T virgens e de memória são uma L-selectina (CD62L) e a quimiocina CCR7. A molécula CD62L pertence à família das selectinas e trata-se de uma molécula de adesão altamente expressa em linfócitos T virgens responsável pela migração desses linfócitos para o tecido linfóide (SWAIN *et al.*, 1996; KUNKEL *et al.*, 1998; SALMI; JALKANEN, 1998). Esta molécula se une a CD34 e GlyCAM-1 nas vênulas endoteliais altas, iniciando a migração de linfócitos virgens para o tecido linfóide (SWAIN *et al.*, 1996; KUNKEL *et al.*, 1998; SALMI *et al.*, 1998). A molécula CCR7 pertence à classe das quimiocinas, tem papel importante no rolamento e posicionamento de células T virgens nos linfonodos. A quimiocina CCR7 é altamente expressa por células dendríticas maduras, assim como por células T virgens e de memória central (SALLUSTO, 1999). Portanto, além de marcador da ativação celular, a molécula CD62L é essencial para migração de linfócitos para os linfonodos, juntamente com a expressão de CCR7 (BRADLEY; WATSON; SWAIN, 1994; BUTCHER; PICKER, 1996; GUNN *et al.*, 1999; GUARDA *et al.*, 2007).

Como as células T virgens e de memória são identificadas pela expressão das isoformas CD45RA e CD45RO, respectivamente, e sendo as moléculas CCR7 e CD62L, essenciais para migração e adesão de linfócitos, a co-expressão dessas moléculas pode identificar subpopulações de memória das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Dessa forma, as células T<sub>CM</sub> são do fenótipo CD45RO<sup>+</sup> que expressam constitutivamente CCR7 e CD62L (T<sub>CM</sub>: CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>). As T<sub>CM</sub> migram para os linfonodos, produzem pequenas quantidades de IFN- $\gamma$  e tem função efetora limitada, porém elas têm capacidade proliferativa e podem ser tornar células efetoras após estimulação secundária. Por outro lado, as células T<sub>EM</sub> são aquelas que perderam a expressão de CCR7 e são heterogêneas para CD62L (T<sub>EM</sub>: CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>+/-</sup>). As T<sub>EM</sub> migram para tecidos periféricos e podem rapidamente produzir citocinas efetoras, como o IFN- $\gamma$ , após estimulação antigênica, mas tem limitada capacidade proliferativa (RICHARDS *et al.*, 2007; LANZAVECCHI; SALLUSTO, 2002; LANZAVECCHI; SALLUSTO, 2005; GEGINAT; SALLUSTO; LANZAVECCHIA,

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

2003; CAMPBELL *et al.*, 1998; FORSTER *et al.*, 1999; SALLUSTO; GEGINAT; LANZAVECCHIA, 2004)

Em relação à memória imunológica contra o *Vaccinia virus* já foi demonstrado que esta depende desses vários tipos de células de memória que podem ser diferenciadas em: rápida reposta imune efetora mensurada pela produção de IFN- $\gamma$  pelas células T (memória efetora) e células T de memória com capacidade proliferativa (memória central) (COMBADIÈRE *et al.*, 2004).

Estudos prévios já demonstraram que a memória celular contra o *Vaccinia virus* é composta, predominantemente, por células T CD4<sup>+</sup> do tipo Th1 (PUISSANT-LUBRANO, 2010; COMBADIÈRE *et al.*, 2004; AMARA *et al.*, 2004). As células Th1 produzem predominantemente citocinas efetoras como o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  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<sup>+</sup> de memória efetora, ou seja, produtoras de IFN- $\gamma$  e/ou TNF- $\alpha$  foram detectadas até 30 anos depois da vacinação (PUISSANT-LUBRANO, 2010; COMBADIÈRE *et al.*, 2004; AMARA *et al.*, 2004).

Além disso, Puissant-Lubrano e colaboradores (2010) observaram que altos níveis de linfócitos efetores T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, em indivíduos vacinados, estão correlacionados com a formação de uma lesão cutânea menor, após a revacinação. Entre essas células T efetoras, somente os linfócitos T CD4<sup>+</sup> com fenótipo IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> ou IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> estavam envolvidos no controle das lesões cutâneas, mas não as células T CD8<sup>+</sup> de memória efetora.

Em relação às células T CD4 de memória, após a infecção pelo *Vaccinia virus*, Combadiere *et al* (2004) observaram que estas eram produtoras de IFN- $\gamma$  e específicas para o *Vaccinia virus* com o seguinte fenótipo: CD4<sup>+</sup>, CD45RA<sup>-</sup>, CD11a<sup>High</sup>, CD27<sup>+</sup> e CCR7. A frequência dessas células era pequena, mas podia ser expandida *in vitro* em 7 dias. Os autores ainda observaram que apenas 20% dos indivíduos vacinados apresentavam uma resposta de memória rápida tanto efetora – produtora de IFN- $\gamma$  – quanto proliferativa. A resposta era mediada tanto por células T CD4<sup>+</sup> quanto CD8<sup>+</sup>. Além disso, 27,5% dos indivíduos vacinados não apresentaram nenhum tipo de resposta (COMBADIÈRE *et al.*, 2004).

Essa ausência de resposta encontrada por Combadiere *et al* (2004) nos ajuda a entender a ocorrência de surtos de *Vaccinia virus* em indivíduos previamente vacinados

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

contra a varíola. Parece que a vacinação não foi capaz de gerar memória imunológica celular de longa duração, uma vez que a maioria dos indivíduos previamente vacinados, acometidos pela infecção pelo *Vaccinia virus*, tinham sido vacinados há mais de 30 anos, na infância, durante as campanhas de vacinação promovidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

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<sup>+</sup> é mais prolongada que a das células T CD8<sup>+</sup>, sendo observado que alguns indivíduos perdem preferencialmente, as células de memória T CD8<sup>+</sup>, enquanto o compartimento de células T CD4<sup>+</sup> permanece intacto. Em raros casos, as células T CD8<sup>+</sup> mantêm-se em níveis elevados enquanto as células T CD4<sup>+</sup> têm seu número bastante reduzido (HAMMARLUND *et al.*, 2003).

Hammarlund e colaboradores (2003) demonstraram que as células de memória T CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> não são absolutamente necessárias para a proteção e que as células de memória T CD4<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> terem desaparecido.

Um estudo recente de Hammarlund e colaboradores (2010) com pacientes que sobreviveram à infecção pelo *Variola virus* demonstrou que uma resposta de células T CD4 e T CD8 podia ser encontrada até 83 anos após a infecção pelo *Variola virus*, porém a memória das células T vai sofrendo um declínio gradativo ao longo do tempo. Esse declínio é semelhante àquele encontrado em indivíduos que receberam a vacina contra a varíola.

Sivapalasingam *et al.* (2007) detectaram altos títulos de anticorpos neutralizantes contra *Vaccinia virus* em 4 de 5 sobreviventes da infecção pela varíola, não vacinados, 40 anos a infecção, sugerindo que a resposta de anticorpos após a infecção natural por varíola é duradoura. Em contraste nenhuma dessas cinco pessoas, não vacinadas, com história de infecção pelo *Variola virus*, produziram IFN- $\gamma$  avaliada pelo ensaio de ELISPOT e apenas um teve resposta linfoproliferativa quando desafiados com o *Vaccinia virus*. A estimulação com o VacAg, desnaturado pelo calor, levou a uma expansão mais robusta das células CD4 específicas para o *Vaccinia virus*; essas células

não eram detectadas quando o *Vaccinia virus* era utilizado inteiro. Essa resposta ao VacAg foi caracterizada pela detecção de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ . Vale ressaltar que as células T CD8<sup>+</sup> não foram detectadas.

De acordo com o exposto podemos observar que a maioria dos estudos com o *Vaccinia virus* foram realizados em pacientes vacinados contra a varíola, em condições controladas. Existem poucos estudos acerca da resposta imune e da memória imunológica contra esse vírus, após infecção humana em condições naturais. Portanto, os surtos de *Vaccinia virus* que vêm ocorrendo no Brasil representam uma oportunidade única de se estudar a resposta imune contra esse vírus.

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.

A manutenção de células de memória apropriadamente reativas pode ou não ocorrer após a imunização com a vacina contra a varíola, visto que já foi observado 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. Especula-se que a imunização com a vacina contra a varíola gera células de memória que são apropriadamente reativas contra uma subsequente exposição ao *Vaccinia virus*, porém o perfil fenotípico dos linfócitos T de memória de indivíduos que foram previamente infectados pelo *Vaccinia virus* é provavelmente diferente do perfil fenotípico de indivíduos não infectados, mas que foram vacinados contra a varíola.

No entanto, essa questão da reatividade das células de memória é ainda controversa, necessitando de mais estudos acerca da memória imunológica, tanto de indivíduos vacinados que foram ou não infectados pelo *Vaccinia virus* quanto de indivíduos não vacinados que foram infectados. Dessa forma, poderemos traçar um perfil de células de memória de indivíduos residentes nos locais de surtos do *Vaccinia virus*, bem como analisar o impacto da estimulação com o antígeno viral nessas células.

Acredita-se que a proteção após a imunização contra a varíola se dê pela interação entre as respostas dos linfócitos B, linfócitos T citotóxicos e linfócitos T

auxiliares. Porém, ainda não se sabe ao certo os mecanismos de manutenção da memória imunológica, nem o papel de cada célula nessa proteção.

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*, assim como entender que tipo de eventos moleculares permite que uma cepa vacinal se adapte a outros hospedeiros na natureza. 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 ameaça do bio-terrorismo.

Esperamos obter informações detalhadas com relação à memória imunológica humoral e celular dos pacientes, residentes em áreas afetadas pelo vírus, contra infecções pelo *Vaccinia virus*, em condições naturais. Os prognósticos para o alcance de nossos objetivos propostos são excelentes, uma vez que a equipe de pesquisadores já tem ampla experiência de campo e laboratório, contamos com uma população com índice de participação voluntária significativa e todas as técnicas propostas já estão padronizadas e em uso em nossos laboratórios.

A importância dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> no controle da infecção pelo *Vaccinia virus* e na manutenção da memória de longo prazo está bem estabelecida (JUDKOWSKI *et al.*, 2011), porém o fenótipo dessas células não foi bem descrito, até o

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

momento. No presente estudo, avaliamos o perfil fenotípico de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> expressando os marcadores de ativação (CD45RO), as sobpopulações apresentando ou não os marcadores de adesão e migração linfocitária (CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> e CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>) e a produção de citocinas efetoras (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), após estimulação *in vitro* com o VACV inativado por luz UV. Portanto, diante do exposto, o principal objetivo do trabalho foi avaliar a resposta celular, T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, de indivíduos após uma infecção por *Vaccinia virus* ocorrida em 2005, em diferentes regiões do estado de Minas Gerais.

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

## **2) OBJETIVOS**

## 2.1) Objetivo Geral:

- Caracterizar o perfil de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, ativadas ou não, de indivíduos previamente infectados ou não pelo *Vaccinia virus* submetidos ou não a vacinação contra varíola

## 2.2) Objetivos Específicos

- Avaliar a frequência relativa de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> totais presentes no sangue periférico de indivíduos infectados pelo *Vaccinia virus*, após estímulo *in vitro* pelo VACV WR inativado por luz UV;

- Avaliar o perfil de ativação dos linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), utilizando os marcadores CD28, CD69, CD40L, CD71 e CTLA-4.

- Avaliar o perfil de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, co-expressando os marcadores de adesão e migração CD62L e CCR7;

- Analisar o perfil de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, co-expressando CD45RO, um marcador presente em células T ativadas;

- Identificar linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> expressando as citocinas intracitoplasmáticas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ;

- Analisar subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (CD45RO<sup>+</sup> e CD62L<sup>+</sup>) expressando as citocinas intracitoplasmáticas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

### **3) METODOLOGIA**

### 3.1) População estudada

A amostra foi constituída por indivíduos residentes em propriedades rurais afetadas pelo surto de *Vaccinia virus* no ano de 2005. Durante 2005, foi realizado um estudo do perfil fenotípico das células do sistema imune dos indivíduos infectados pelo *Vaccinia virus*, durante a fase aguda da doença. Naquele estudo pôde-se verificar que alguns indivíduos infectados haviam sido vacinados contra a varíola, durante a campanha de vacinação da OMS que se estendeu até a década de 70, mas que haviam contraído a infecção pelo *Vaccinia virus*, como confirmado pelo exame clínico e laboratorial.

Dessa forma, como extensão da pesquisa realizada em 2005, foi desenvolvido esse trabalho de pesquisa com o objetivo de avaliar o perfil de memória dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, 5 anos depois do surto. Assim, amostras do sangue periférico dos indivíduos uma vez infectados pelo *Vaccinia virus* foram coletados pelo nosso grupo de pesquisa e análises fenotípicas foram realizadas para traçar o perfil da resposta imunológica desses pacientes.

Indivíduos vivendo nas áreas onde o surto do ano de 2005 ocorreu foram selecionados e contatados através da busca ativa. Os indivíduos foram entrevistados para obtenção de dados envolvendo suas atividades, comportamento e ocorrência de infecções anteriores. A estes 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.

O número de voluntários incluídos no estudo variou de acordo com os locais nos quais os surtos ocorreram. Ao todo, foram selecionados 42 pacientes, sendo 22 pacientes previamente infectados pelos *Vaccinia virus* e 20 não infectados. Dos 22 indivíduos previamente infectados, 12 haviam sido vacinados contra a varíola e 10 não tinham história vacinal positiva. Dos 20 indivíduos não infectados, 10 não eram vacinados e 10 eram previamente vacinados contra a varíola. A inclusão desse grupo de indivíduos vacinados que não foram infectados pelo *Vaccinia virus* foi de extrema importância para comparação da eficácia da vacinação em exposições subsequentes ao vírus, visto que já foi demonstrado em alguns trabalhos que a vacinação contra a varíola em determinados indivíduos não foi capaz de prevenir infecção posterior pelo *Vaccinia virus*. Por outro lado, os sintomas apresentados pelos indivíduos foram mais brandos

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

quando comparados aos indivíduos que nunca haviam sido vacinados (HEYMANN; SZCZENIOWSKI; ESTEVES, 1998). Os 10 indivíduos não infectados não vacinados compuseram o controle negativo (TAB-1).

**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.

### 3. 2) Coleta das amostras

Amostras de sangue foram colhidas através da utilização de técnicas plenamente estabelecidas em bancos de sangue. A agulha do dispositivo de coleta foi inserida na veia ante-cubital, no antebraço do voluntário e 20 a 30 mL de sangue foram coletados. A coleta foi realizada por pessoal qualificado. Todas as amostras foram codificadas e as identidades dos doadores mantidas em sigilo. Os doadores foram informados de que este tipo de coleta de sangue é realizado rotineiramente em clínicas e hospitais e que praticamente não há risco da ocorrência de grande desconforto ou lesão.

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

As análises imunológicas do pacientes aconteceram concomitantemente à obtenção do material clínico em campo, uma vez que, por razões metodológicas, estas amostras precisavam ser processadas e analisadas imediatamente após sua coleta.

### **3.3) Avaliação hematológica**

A avaliação hematológica consistiu da realização do hemograma para contagem global e diferencial de leucócitos, incluindo neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos. Para realização do procedimento, amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos de 5mL contendo anticoagulante EDTA (BD Vacutainer) e os parâmetros hematológicos avaliados em contador hematológico eletrônico de células (Coulter MD18, E.U.A.).

### **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.

### **3.5) Ensaio de soroneutralização**

Para os ensaios de neutralização, os soros dos indivíduos foi aquecido a 56°C por 30 minutos para inativação do complemento conforme previamente descrito (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**

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 a 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 na diluição de 1:100, as placas incubadas a 37°C por 30 minutos e então lavadas três vezes. As reações foram realizadas utilizando-se anticorpos de coelho anti-IgG humana conjugado a horseradish peroxidase (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 hidrogénio 0,03% foram adicionados. A reação foi terminada pela adição de ácido sulfúrico 2M a cada poço e o valor de absorvância a 492 nm determinada em num leitor automático de placas. (SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009)

### **3.7) Análise de marcadores de superfície e citocinas intracitoplasmáticas em células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico após estimulação *in vitro***

O sangue dos pacientes que participaram deste estudo foi coletado em tubo Vacutainer estéril contendo heparina. Após a coleta e realização do hemograma, o número de células utilizadas para realização dos ensaios foi ajustada para que cada tubo possuísse um total de  $1 \times 10^6$  células. Após ajuste do número de células por tubo, elas foram incubadas na presença de meio de cultura RPMI, recebendo a denominação de cultura controle (C) ou na presença do *Vaccinia virus* inativado, a uma concentração final de 0,01 vírus por célula, recebendo a denominação de cultura estímulo específico. Os tubos foram previamente incubados durante 6 horas em estufa de CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> com 5% de umidade a 37°C. A utilização da Brefeldina assegura a retenção da citocina no interior da célula, uma vez que essa substância mantém a proteína 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 CO<sub>2</sub> 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 centrifugadas a 800g por 10 minutos a 18°C. O sobrenadante foi aspirado deixando somente o precipitado de células. Posteriormente, o precipitado foi ressuspendido e transferido para tubos de poliestireno de 5ml (FALCON, E.U.A) previamente identificados e com os anticorpos correspondentes, como mostrado no Quadro 1. Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 2 ml 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 1 ml 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 1 ml de PBS-P e em seguida, com 1 ml 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
CD4-FITC	Identificação de linfócitos T auxiliares; liga-se a MHC-II.
CD8-FITC	Identificação de linfócitos T citotóxicos
CD28-APC	Marcador de ativação do linfócito T
CD71-PE	Marcador de proliferação celular
CTLA-4-PE	Marcador de inibição do linfócito T
CD69-PE	Marcador precoce de ativação celular
CD40L-APC	Ligante para a molécula CD40
CD45RO-APC	Medeia ativação do TCR e BCR, expresso em células T de memória
CD62L- APC	Medeia tráfego de linfócitos e rolamento de leucócitos para sítios inflamatórios
CCR7-PE	Quimiocina importante no rolamento e posicionamento de células T virgens nos linfonodos
IFN-γ PE	Ativa macrófagos e exerce funções críticas na imunidade inata e adquirida
TNF-α PE	Principal mediador da resposta inflamatória aguda por microrganismos infecciosos

**Quadro 1: Relação dos anticorpos usados para caracterização dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e suas respectivas funções**

**Fonte: ABBAS; LICHTMAN, 2005.**

### **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 6 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".

As análises dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> foram realizadas obedecendo cada um dos objetivos específicos, da seguinte forma:

#### **3.8. 1) População CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>**

Para caracterização da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> expressando marcadores de adesão e migração linfocitária realizamos ensaios de tripla marcação, utilizando anticorpos contra os marcadores CD4, CD8, expressando simultaneamente CD62L e CCR7.

Para realização das análises, inicialmente foi selecionada a população de linfócitos totais, baseada em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC); essa população denominada R1 (Figura 1- A). Posteriormente, gráficos de FL1 (CD4-FITC ou CD8-FITC) versus FSC foram construídos para a seleção das células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (R2) (Figura 1- B). Em seguida, gráficos de FL2 (CCR7-PE) versus FL4 (CD62L-APC), foram construídos para a seleção das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> duplo positivas (CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) e duplo negativas (CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>) (Figura 1- C).

Linfócitos T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

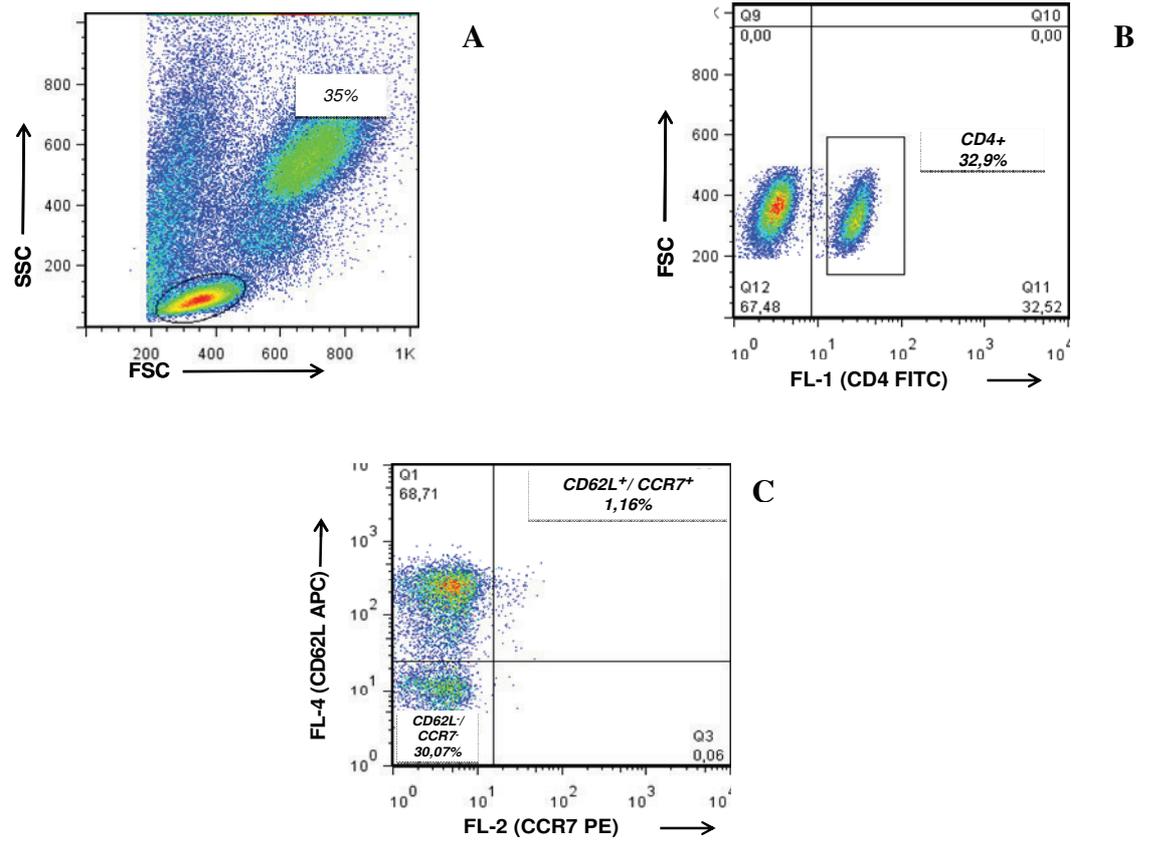


Figura 1: Seleção da população de linfócitos T  $CD4^+$ , co-expressando as moléculas  $CD62L$  e  $CCR7$

### 3.8.2) População CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+/-</sup> IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>

A fim de determinar a população de linfócitos expressando o marcador de ativação celular CD45RO, presente em células primadas, realizamos ensaios de dupla marcação nos quais foram utilizados anticorpos contra as moléculas CD4, CD8 e CD45RO. As populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, co-expressando CD45RO foram divididas em CD45RO<sup>Low</sup> e CD45RO<sup>High</sup>. Além disso, ensaios de tripla marcação foram utilizados para verificar a co-expressão do marcador de ativação CD45RO e as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>.

A análise procedeu-se da seguinte forma: inicialmente, foi selecionada a população de linfócitos totais, baseada em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC); essa população foi denominada R1 (Figura 2- A). Posteriormente, gráficos de FL1 (CD4-FITC ou CD8-FITC) versus FL4 (CD45RO-APC) foram construídos para identificar a segregação das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>: CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> (denominados R2), CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>Low</sup> (denominados R3) e CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>High</sup> (denominados R4) (Figura 2- B). Em seguida, gráficos de FSC por FL2 foram construídos com o objetivo de identificar as subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> expressando IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$  (R5) (Figura 2- D).

Realizamos também ensaios de dupla marcação utilizando a L-selectina, CD62L, um *homing receptor*, molécula presente principalmente em células T virgens e de memória central. Verificamos ainda a co-expressão de CD62L e IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$ , nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. A análise do marcador CD62L procedeu-se da mesma maneira realizada para o marcador CD45RO (Figura 2- A, C e D).

As análises dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, co-expressando os marcadores descritos acima foram realizadas com a mesma metodologia dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>.

Análise dos dados da leitura realizada no FacScalibur foi realizada com o auxílio do software Flow Jo 7.5 no qual foram identificadas e definidas as populações de interesse.

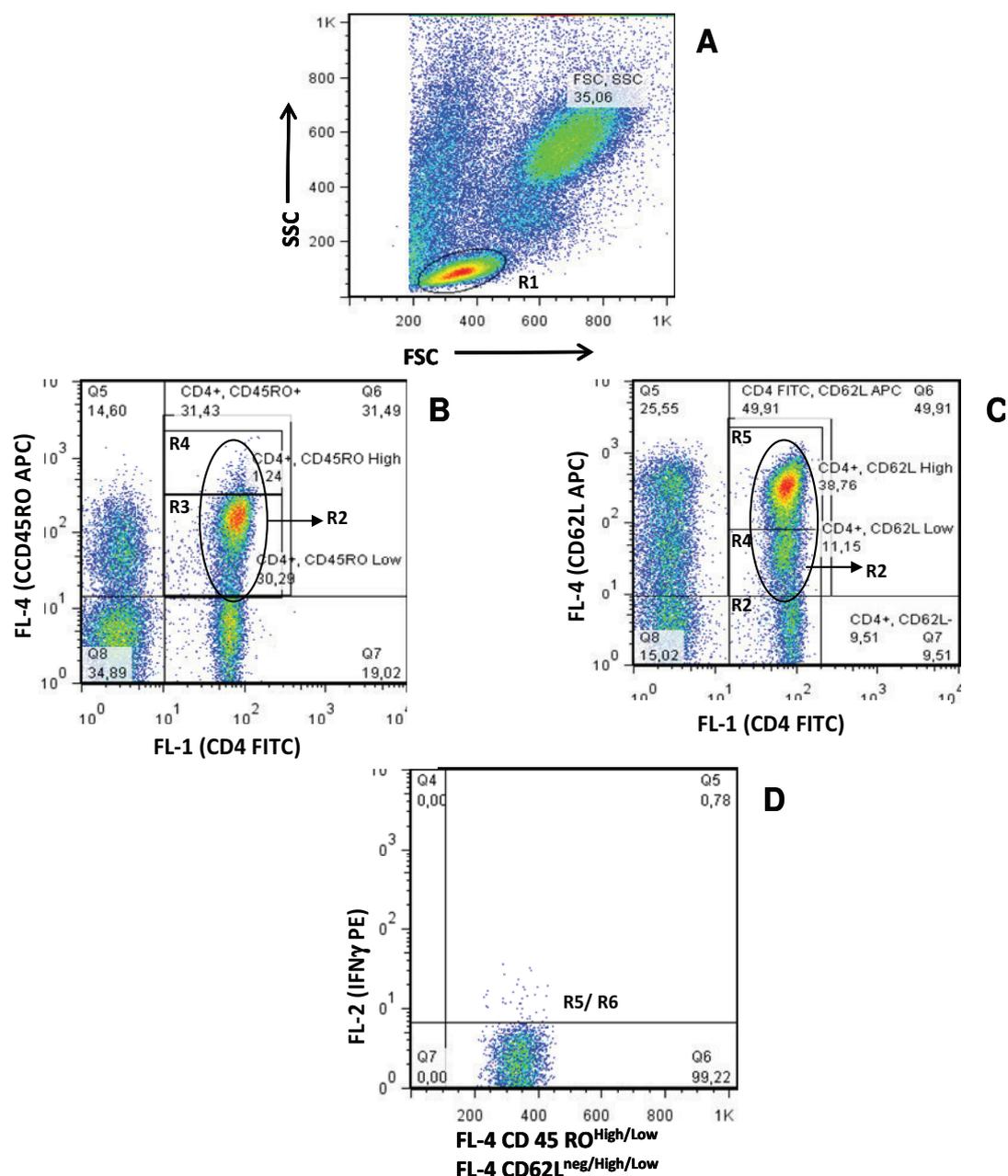


Figura 2: Análises de FACS. (A) Inicialmente identificamos a população de linfócitos periféricos em gráficos de tamanho versus granulosidade (FSC×SSC) e denominamos essa população de R1. (B) Posteriormente selecionamos a população de linfócitos em gráficos de fluorescência (FL-1×FL-4) e selecionamos as populações CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> (R2), CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>Low</sup> (R3) e CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>High</sup> (R4). (C) A mesma estratégia foi utilizada para selecionar as populações de linfócitos expressando a selectina CD62-L (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>). Gráficos de fluorescência FL-1×FL-4 foram construídos e as subpopulações de linfócitos CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>neg</sup> (R2), CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> (R3), CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>Low</sup> (R4) e CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>High</sup> (R4) foram selecionada. (D) Finalmente, construímos gráficos de fluorescência FL-4×FL-2, para selecionar as subpopulações acima selecionadas que co-expressavam IFN- $\gamma$  (R5 ou R6): CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>Low</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>High</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (R5), CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>neg</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>Low</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>High</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (R6). As análises dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> foram realizadas seguindo a mesma metodologia.

**3.8.3) População CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>**

Com o intuito de estabelecer o fenótipo das células T, após estímulo antigênico com o VACV inativado por luz UV e estabelecer o estado de ativação dessas células, realizou-se ensaios de dupla marcação contra os seguintes marcadores de ativação celular: CD28, CD69, CD71 e CD40L. Ainda avaliamos a expressão da molécula CTLA-4 marcador de inibição da ativação celular. Além disso, avaliamos também a co-expressão de IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$ , pelos linfócitos T CD4 e CD8, após estímulo antigênico.

Inicialmente foi selecionada a população de linfócitos totais, baseada em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus granulocidade (SSC); essa população foi denominada R1 (Figura 3- A). Posteriormente, gráficos de FL1 (CD4-FITC) versus FL2 (CD69-PE, CTLA-4-PE, CD71-PE, IFN- $\gamma$ -PE e TNF- $\alpha$ -PE) e gráficos FL1 (CD4-FITC) versus FL4 (CD28-APC, CD40L-APC,) foram construídos para identificar a segregação das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>: CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> (denominadas R2) (Figura 3- B).

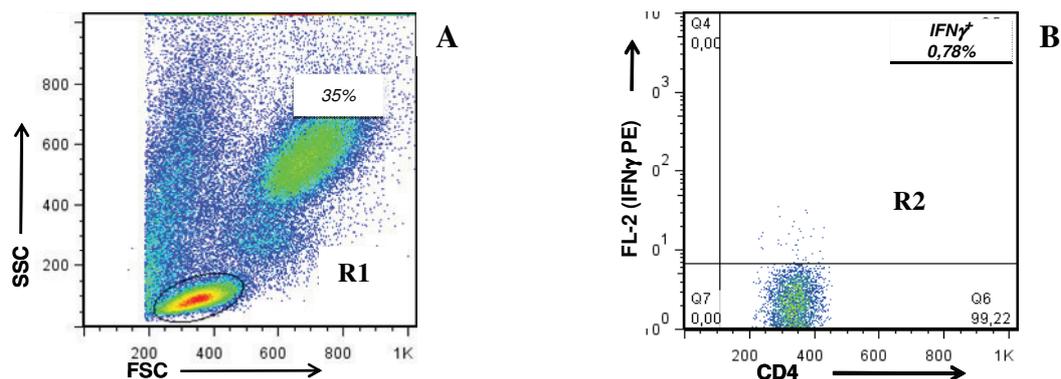


Figura 3: Seleção de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, expressando citocinas (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e os marcadores de ativação celular CD69, CD28, CD40L e CD71

(A) Inicialmente identificamos a população de linfócitos periféricos em gráficos de tamanho versus granulosidade (FSC $\times$ SSC) e denominamos essa população de R1. (B) Posteriormente selecionamos a população de linfócitos em gráficos de fluorescência (FL-1 $\times$ FL-2) e selecionamos as populações CD4<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> (R2). Gráficos FL1 X FL4 também foram construídos para identificar os linfócitos CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup> (R2) (dados não mostrados). As análises dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> foram realizadas seguindo a mesma metodologia.

### **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 *Vaccinia virus*. O nível de significância definido foi de  $p < 0.05$  e todas as análises foram realizadas utilizando-se o Software GraphPad Prim 4.0 (San Diego, CA).

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

#### **4) RESULTADOS**

#### 4.1) Análise clínico epidemiológica

Além de avaliarmos o perfil fenotípico das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de todos os indivíduos envolvidos nesse estudo, realizamos, ainda, uma análise clínico epidemiológica dos pacientes previamente infectados. Essa análise foi importante visto que percebemos que dentre os indivíduos que foram infectados pelo *Vaccinia virus*, algumas pessoas 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, realizamos uma análise clínico epidemiológica. 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.

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 faioldérmicos. Já entre os indivíduos não vacinados 8 declararam-se como leucodérmicos (80%) e 2 como faioldérmicos (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 solteiros (16,66%) e 2 divorciados (16,66%). Dentre as funções desempenhadas na fazenda na qual trabalhavam, os indivíduos eram ordenhadores (100%) e alguns também agricultores, tanto entre os indivíduos não vacinados quanto os vacinados. Quando avaliamos o total de anos que os indivíduos trabalhavam na 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 dos indivíduos não vacinados 1 (10%) não estudou, 1 (10%) possuía ensino fundamental incompleto (até a 4ª série), 2 (20%) ensino fundamental completo (da 1ª a 8ª série), 4 (40%) ensino médio incompleto (entre o 1º e o 3º ano) e 2 (20%) ensino superior incompleto. Já entre os vacinados encontramos que 3 (25%) não estudaram, 6 (50%) que tinham o ensino fundamental incompleto (até a 4ª série), 2 (16,66%) o ensino fundamental incompleto entre 4ª e 8ª série, e 1 (8,33%) 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 tabagistas 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 variou de 4 a 7 sintomas. Já entre os indivíduos vacinados a média foi de 2,5 sintomas, variando de 1 a 7, além de apresentarem menos sintomas relacionadas à infecção pelo *Vaccinia virus*, os sintomas apresentados foram mais brandos (TAB. 2).

**TABELA 2**

**Distribuição relativa e absoluta dos tipos de sintomas apresentados pelos indivíduos infectados previamente submetidos ou não à vacinação contra a varíola**

<b>Tipo de sintoma</b>	<b>Não Vacinados (n/%)</b>	<b>Vacinados (n/%)</b>
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 nenhum caso letal. Apesar de termos tido relatos em ambos os grupos de que familiares também

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

havia 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) Distribuição relativa dos linfócitos T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), após estimulação *in vitro* com VACV das células presentes no sangue total de indivíduos previamente infectados submetidos ou não à vacinação contra a varíola**

Com o objetivo de avaliar a resposta imune de memória de indivíduos uma vez infectados pelo *Vaccinia virus*, as células do sangue periférico foram estimuladas pelo VACV inativado por luz UV, durante seis horas de cultura. Após esse período, o fenótipo das células do sistema imune e a produção de citocinas intracitoplasmáticas foram avaliados.

Foram realizadas análises da porcentagem de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, do sangue periférico de indivíduos previamente infectados ou não que foram submetidos ou não à vacinação contra a varíola. Para avaliar o percentual de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, na população total de linfócitos foram realizados ensaios de dupla marcação utilizando anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8.

Dessa forma, ao avaliarmos os resultados do percentual desses linfócitos T pudemos observar que não houve diferença significativa entre o percentual de células T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, entre os grupos analisados, após estimulação *in vitro* pelo *Vaccinia virus* (TAB-3).

**TABELA 3**

**Distribuição relativa das células T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) 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**

<i>Grupos</i>		<i>Fenótipo celular</i>		
		CD3 <sup>+</sup> * (%)	CD4 <sup>+</sup> * (%)	CD8 <sup>+</sup> * (%)
Não infectados	Não vacinados	71,62 +/- 6,31	42.9 +/- 5,36	23,368 +/- 5,29
	Vacinados	65,18 +/- 8,19	45.66 +/- 8,78	19,828 +/-2,82
Infectados	Não vacinados	76,28 7,61	40.9 +/-6,33	22,367 +/-5,04
	Vacinados	72,18 5,63	45.95 +/- 7,08	20,903 +/- 4,46

\* Não foram observadas diferenças significativas na porcentagem de células T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> quando os quatros grupos foram comparados entre si.

#### 4.3) Estudo das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>

Para avaliação das subpopulações de linfócitos T envolvidos na resposta imune após uma reexposição ao *Vaccinia virus*, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> co-expressando os marcadores de superfície CD28, CTLA-4, CD71, CD69, CD40L, CD45RO, CD62L e CCR7, foram analisados.

##### 4.3.1) Avaliação de moléculas marcadoras de ativação do linfócito T

Para avaliar o perfil de ativação dos linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), foram realizados experimentos utilizando os marcadores CD28, CD69, CD40L, CD71 e CTLA-4.

Quando avaliamos as células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) co-expressando o marcador CD71, marcador de proliferação celular, notamos que há um maior percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, expressando essa molécula, nos grupos de indivíduos

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

previamente infectados pelo VACV (vacinados ou não), quando comparados com indivíduos não infectados (vacinados ou não) (Gráfico 1 – A, B). Nos indivíduos apenas vacinados contra a varíola não houve aumento no percentual dessas células quando comparados com os indivíduos controle.

No entanto, ao analisarmos nossos resultados podemos observar que não houve diferença significativa entre o percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, co-expressando os marcadores CD28 (marcador de ativação da célula T) e CTLA-4 (marcador da inibição da ativação celular), quando comparamos os grupos de indivíduos infectados e não infectados, vacinados ou não, após estimulação *in vitro* pelo VACV (Gráfico 1 – C, D, E, F).

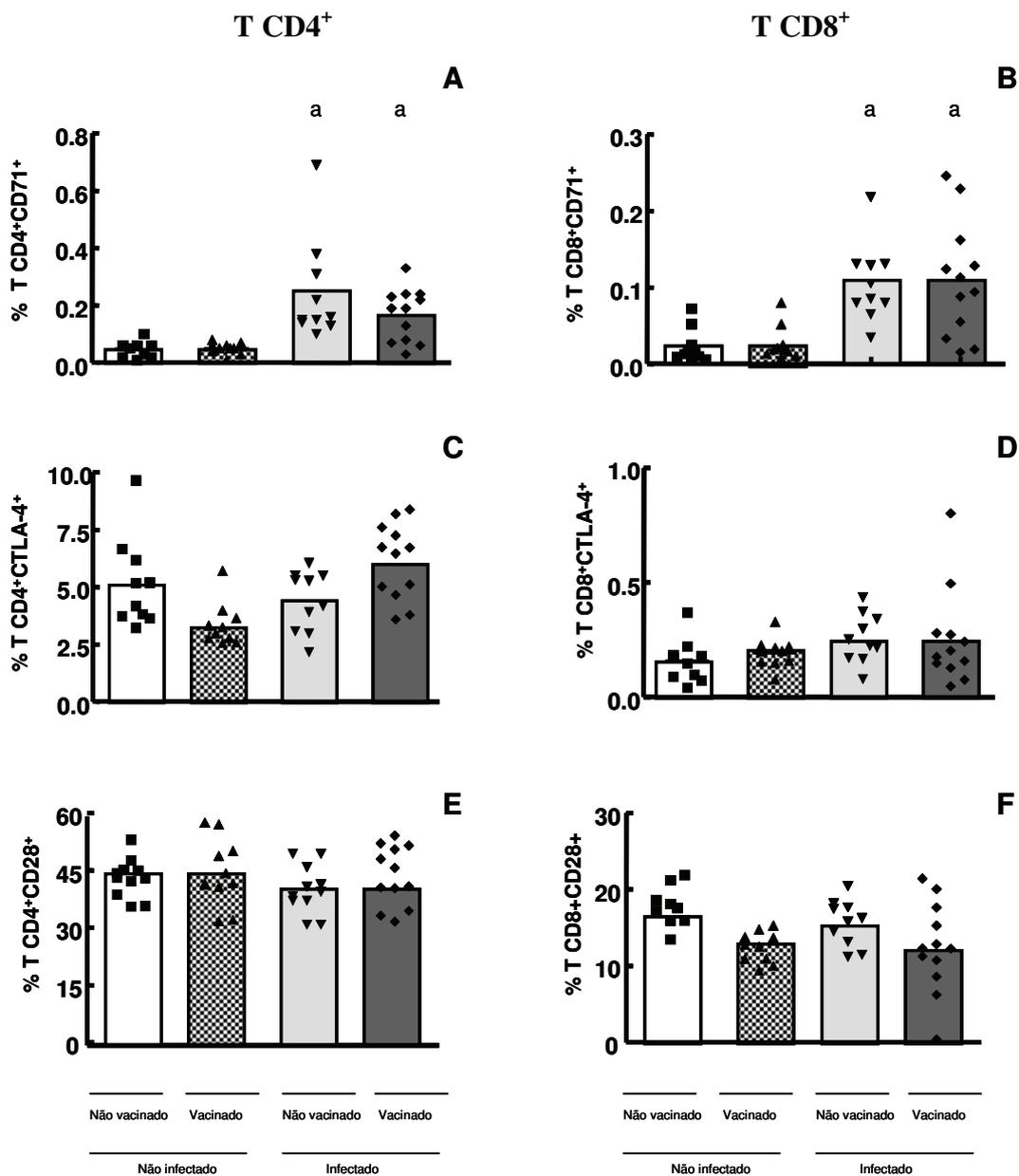
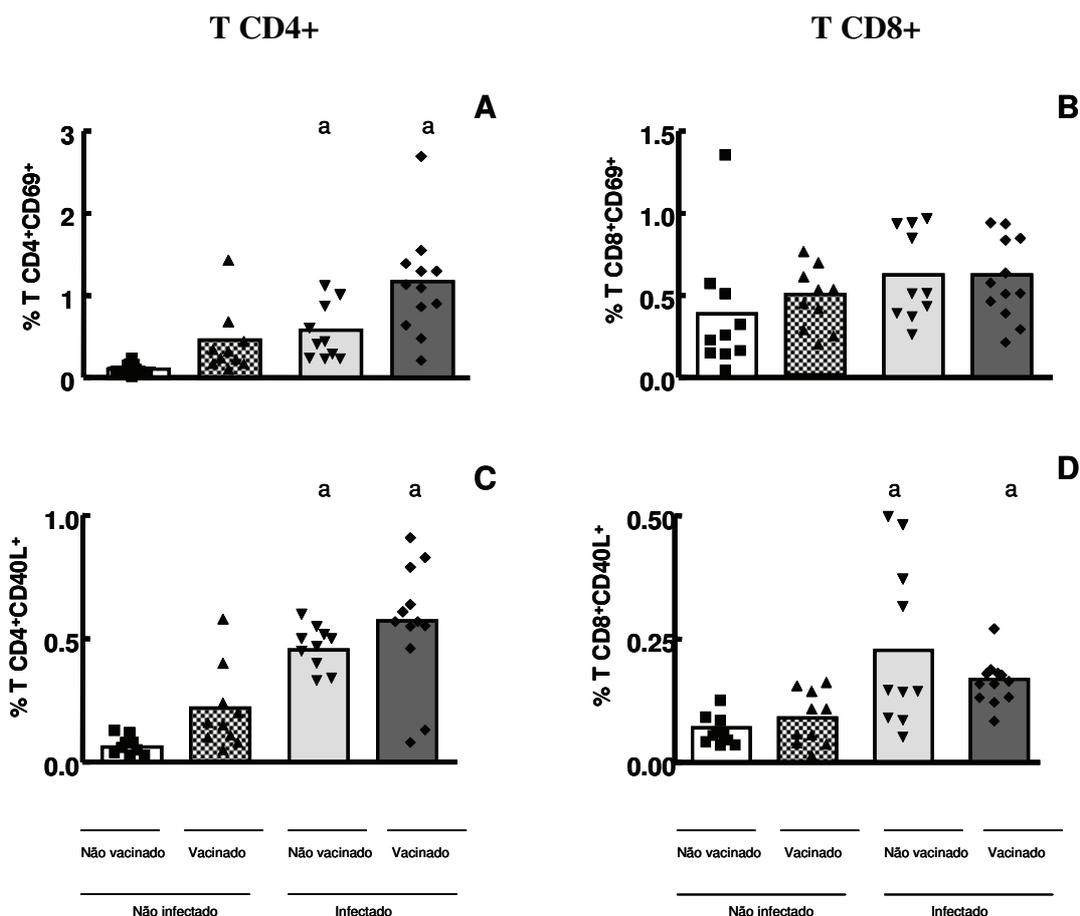


GRÁFICO 1: Comparação do percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> expressando moléculas marcadoras de ativação celular (CD71, CTLA-4 e CD28), entre os grupos de indivíduos infectados ou não, após estimulação *in vitro* com o VACV inativado. A = CD4<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>. B = CD8<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>. C = CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>. D = CD8<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>. E = CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>. F = CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>.

a = diferente de não infectado não vacinado

Em relação à molécula CD69, importante marcador de ativação, precocemente expressa, podemos notar que houve um aumento do percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> nos grupos de indivíduos previamente infectados (vacinados ou não) quando comparados aos grupos de indivíduos não infectados (vacinados ou não), após estímulo antigênico (Gráfico 2 – A). Quando analisamos os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, podemos observar que não houve diferença no percentual de células expressando esse marcador quando comparamos os grupos analisados (Gráfico 2 – B).

Quando avaliamos as células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) co-expressando o marcador CD40L, presente em células ativadas e ligante de CD40, notamos que há um maior percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, expressando essa molécula, nos grupos de indivíduos previamente infectados pelo VACV (vacinados ou não), quando comparados com indivíduos não infectados (vacinados ou não), após estimulação viral (Gráfico 2 – C, D). Nos indivíduos apenas vacinados contra a varíola não houve aumento no percentual dessas células quando comparados com os indivíduos controle.



**GRÁFICO 2:** Comparação do percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> expressando moléculas marcadoras de ativação celular (CD69 e CD40L), entre os grupos de indivíduos infectados ou não, após estimulação *in vitro* com o VACV inativado. A = CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>. B = CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>. C = CD4<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup>. D = CD8<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup>. a = diferente de não infectado não vacinado

#### 4.3.2) Análise de Linfócitos T expressando as moléculas de adesão e migração celular CD62L e CCR7 (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) ou não (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>)

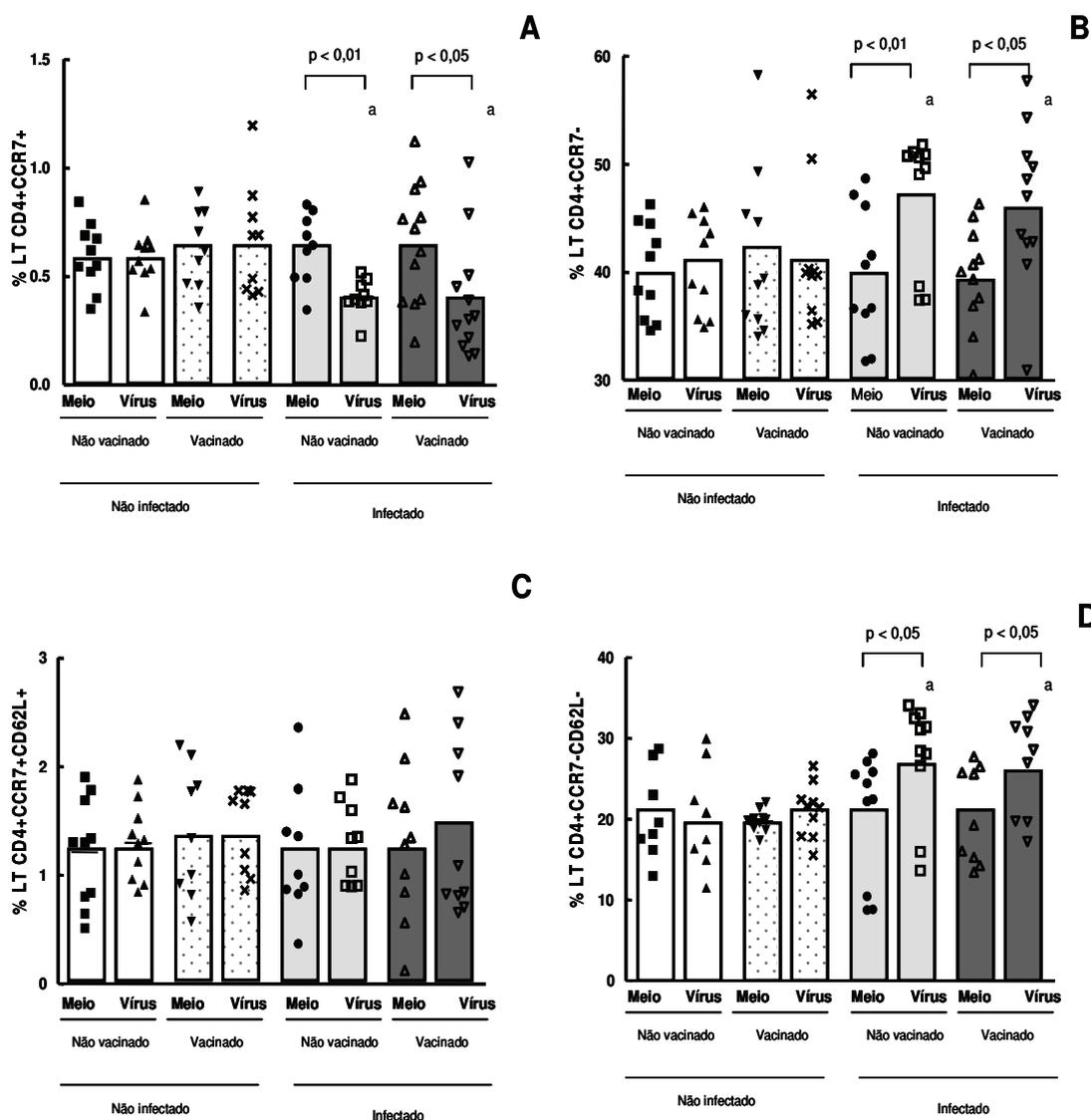
Para avaliar o percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup> na população total de linfócitos do sangue periférico foram realizados ensaios de dupla marcação e as subpopulações de linfócitos T foram analisadas individualmente. Os resultados encontram-se apresentados no Gráfico 3.

É interessante ressaltar que quando avaliamos os linfócitos T CD4<sup>+</sup> expressando apenas a quimiocina CCR7, importante na migração linfocitária para os órgãos linfóides secundários, detectamos que houve uma diminuição no percentual dessas células em

indivíduos previamente infectados (vacinados ou não) pelo VACV quando comparados aos indivíduos não infectados (vacinados ou não), após estimulação *in vitro* com o VACV (Gráfico 3 – A). Além disso, houve um aumento no percentual de células T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> apenas nos grupos de indivíduos previamente infectados (vacinados ou não), quando comparamos cultura controle e cultura após estímulo antigênico. O percentual dessas células também foi maior quando comparamos indivíduos previamente infectados e indivíduos não infectados (Gráfico 3 – B).

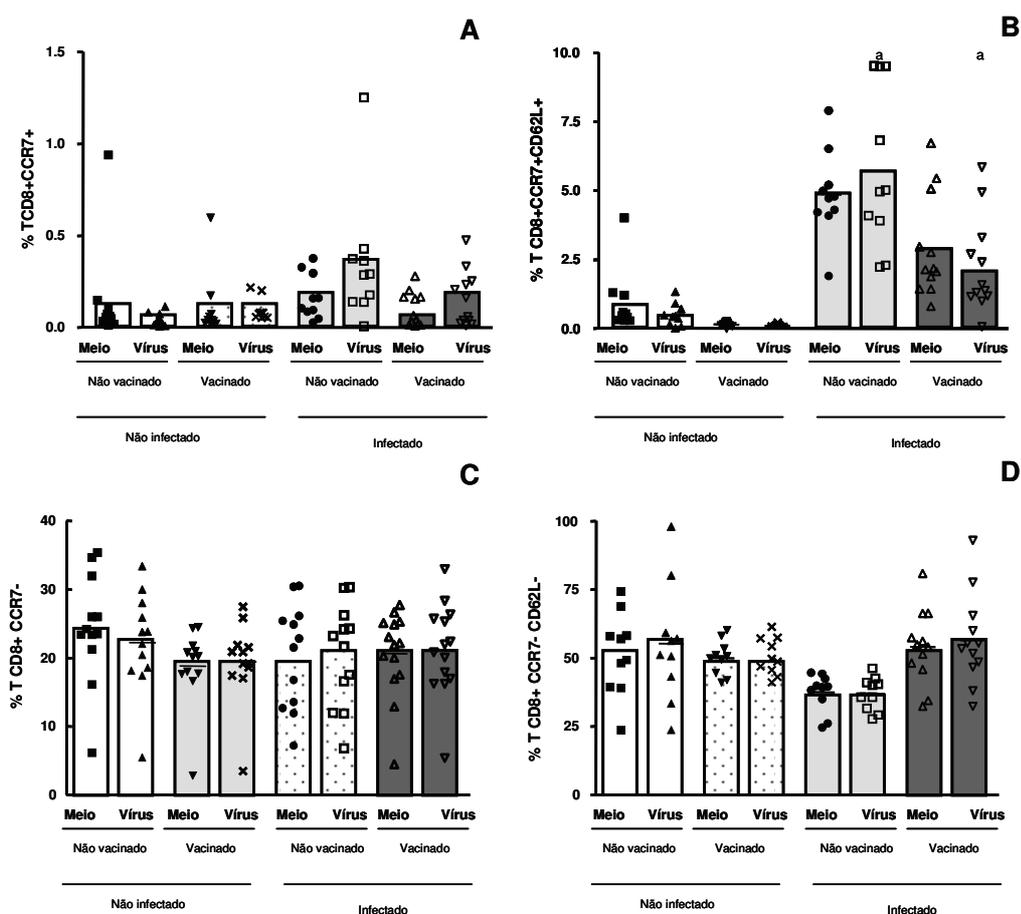
Ao avaliarmos a subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> que não apresentavam os marcadores de adesão e migração celular CD62L e CCR7 (CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>) podemos observar que houve diferença significativa na expressão desse marcador apenas nos grupos de indivíduos previamente infectados (vacinados ou não) quando comparados com os indivíduos não infectados (vacinados ou não), após estimulação antigênica (Gráfico 3 – D). Já em relação aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> expressando os marcadores de adesão e migração celular CD62L e CCR7, ou seja, T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, não houve diferença no percentual total dessa população entre os grupos analisados, após estímulo *in vitro* com o VACV (Gráfico 3 – C).

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*



**GRÁFICO 3:** Avaliação do percentual de TCD4<sup>+</sup>, co-expressando os marcadores CCR7 e CD62L de indivíduos previamente infectados ou não pelo *Vaccinia virus*, antes e após estimulação *in vitro* com o VACV inativado. A = CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>. B = CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>. C = CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>. D = CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>. a = diferente de não infectado não vacinado

Quando avaliamos a população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> expressando a molécula de adesão CD62L e a quimiocina CCR7, pôde-se observar que houve um aumento no percentual de células T CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, nos indivíduos que já haviam sido previamente expostos ao vírus, seja pela vacinação ou infecção prévia, quando comparados com indivíduos não infectados não vacinados, após estimulação antigênica. Ou seja, os dados demonstram que houve aumento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> expressando marcadores de adesão e migração celular apenas nos indivíduos com contato prévio ao VACV (Gráfico 4 – A, B). Já em relação aos linfócitos T CD8 que não apresentavam tais marcadores, ou seja, T CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>, não houve diferença no percentual total dessa população entre os grupos analisados, após estímulo antigênico (Gráfico 4– D).



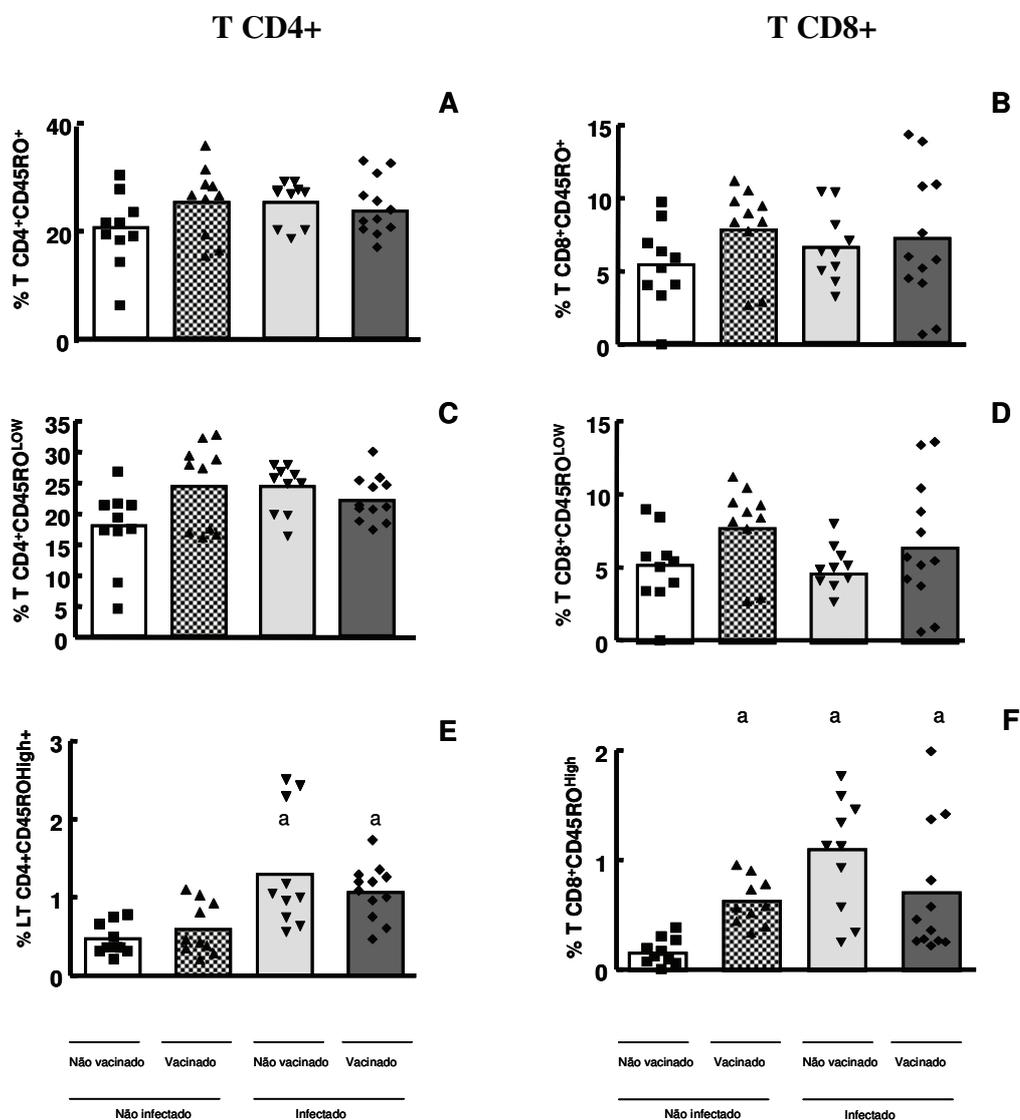
**GRÁFICO 4:** Avaliação do percentual de TCD8<sup>+</sup>, co-expressando os marcadores CCR7 e CD62L de indivíduos previamente infectados ou não pelo *Vaccinia virus*, antes e após estimulação *in vitro* com o VACV inativado. A = CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>. B = CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>. C = CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>. D CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>. a = diferente de não infectado não vacinado

#### 4.3.3) *Análise de Linfócitos T efetores (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>)*

Para avaliar o percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, co-expressando CD45RO<sup>+</sup> foram realizados ensaios de dupla marcação. Os resultados estão apresentados no Gráfico 5.

Ao avaliarmos as subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> efetores, co-expressando CD45RO<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>Low</sup>, podemos observar que não houve diferença entre o percentual dessas subpopulações de linfócitos T em relação aos indivíduos infectados e não infectados, após estímulo (Gráfico 5 – A, B, C, D). Contudo, observamos que houve diferença significativa no percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>High</sup> apenas nos grupos de indivíduos previamente infectados (vacinados ou não) pelo *Vaccinia virus* quando comparados aos indivíduos não infectados (vacinados ou não), após estímulo antigênico (Gráfico 5 – E).

Houve aumento também das subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>High</sup>, nos grupos de indivíduos que tiveram exposição prévia ao VACV, seja pela infecção ou vacinação prévia, quando comparados com indivíduos não infectados não vacinados, após estimulação *in vitro* com o VACV (Gráfico 5 – F).



**GRÁFICO 5:** Avaliação do percentual de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, expressando o marcador de superfície CD45RO de indivíduos previamente infectados ou não pelo *Vaccinia virus*, após estimulação *in vitro* com o VACV inativado. A = CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>. B = CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>. C = CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>Low</sup>. D = CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>Low</sup>. E = CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>High</sup>. F = CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>High</sup>.

a = diferente de não infectado não vacinado

#### ***4.3.4) Análise de Linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>***

Para avaliar o percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, co-expressando CD62L<sup>+</sup>, uma molécula de adesão da família das selectinas, importante na migração linfocitária para os órgãos linfóides secundários, foram realizados ensaios de dupla marcação e as subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>High</sup> e T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>Low</sup> foram analisadas. Os resultados encontram-se apresentados nos Gráfico 6.

Ao avaliarmos a expressão de linfócitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>Low</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>High</sup> e CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> podemos observar que não houve diferença significativa entre o percentual dessas células entre todos os grupos analisados, ou seja, quando comparamos indivíduos que nunca tiveram contato com o VACV (não infectados, não vacinados) com pacientes com exposição prévia ao VACV (seja por meio da vacinação e/ou infecção prévia), após estimulação antigênica.

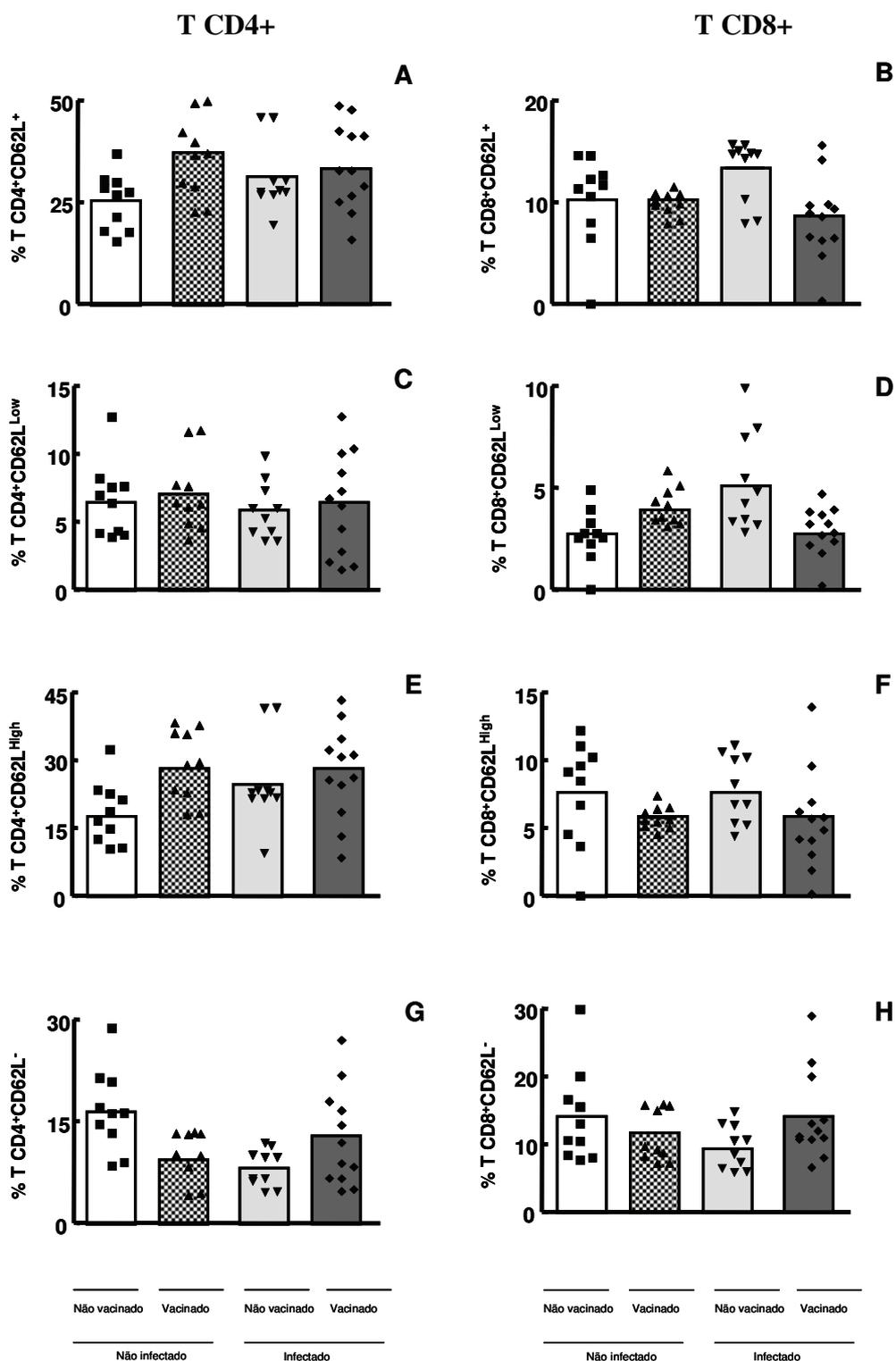


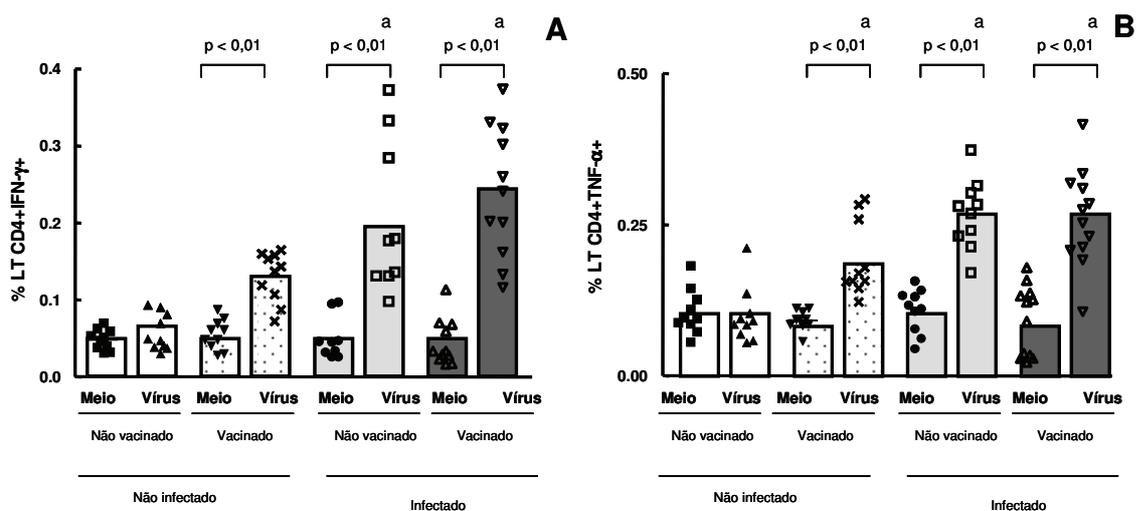
GRÁFICO 6: Avaliação do percentual de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> expressando o marcador de superfície CD62L de indivíduos previamente infectados ou não pelo *Vaccinia virus*, após estimulação *in vitro* com o VACV inativado. A = CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>. B = CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>. C = CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>Low</sup>. D = CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>Low</sup>. E = CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>High</sup>. F = CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>High</sup>. G = CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>. H = CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>. a = diferente de não infectado não vacinado

#### **4.3.5) Estudo do padrão de citocinas intracitoplasmáticas**

##### **a) Padrão de citocinas intracitoplasmáticas em Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>**

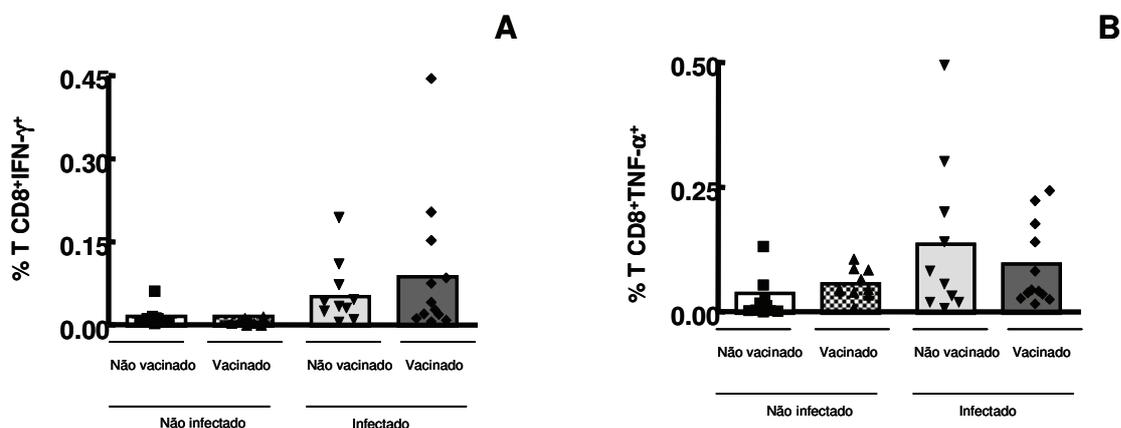
Para avaliarmos o percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> expressando IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , na população de linfócitos totais do sangue periférico, foram realizados ensaios de dupla marcação. Os resultados estão apresentados no Gráfico 7.

Ao avaliarmos a expressão de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, nos grupos de indivíduos com infecção prévia pelo VACV, observamos que houve aumento significativo da expressão de IFN- $\gamma$ , quando comparados com os indivíduos não infectados (vacinados ou não), após estímulo *in vitro* com o VACV (Gráfico 7 A). Em relação à citocina TNF- $\alpha$ , podemos observar que houve aumento no percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, co-expressando esse marcador nos grupos de indivíduos com contato prévio com o VACV, seja pela infecção ou vacinação, quando comparados com indivíduos não infectados não vacinados, após estímulo antigênico (Gráfico 7 B).



**GRÁFICO 7:** Avaliação do percentual de células TCD4<sup>+</sup>, expressando IFN-γ e TNF-α de indivíduos previamente infectados ou não pelo *Vaccinia virus*, antes e após estimulação *in vitro* com o VACV inativado A = CD4<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup>. B = CD4<sup>+</sup> TNF-α<sup>+</sup>. a = diferente de não infectado não vacinado

Ao avaliarmos a expressão de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup> observamos que não houve aumento no percentual dessas células quando comparamos indivíduos previamente infectados (vacinação ou não) com indivíduos não infectados (vacinação ou não), após estímulo *in vitro* com o VACV (Gráfico 8 A, B).



**GRÁFICO 8:** Avaliação do percentual de células TCD8<sup>+</sup>, expressando IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  de indivíduos previamente infectados ou não pelo *Vaccinia virus*, após estimulação *in vitro* com o VACV inativado. A = CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>. B = CD8<sup>+</sup> TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>.

a = diferente de não infectado não vacinado

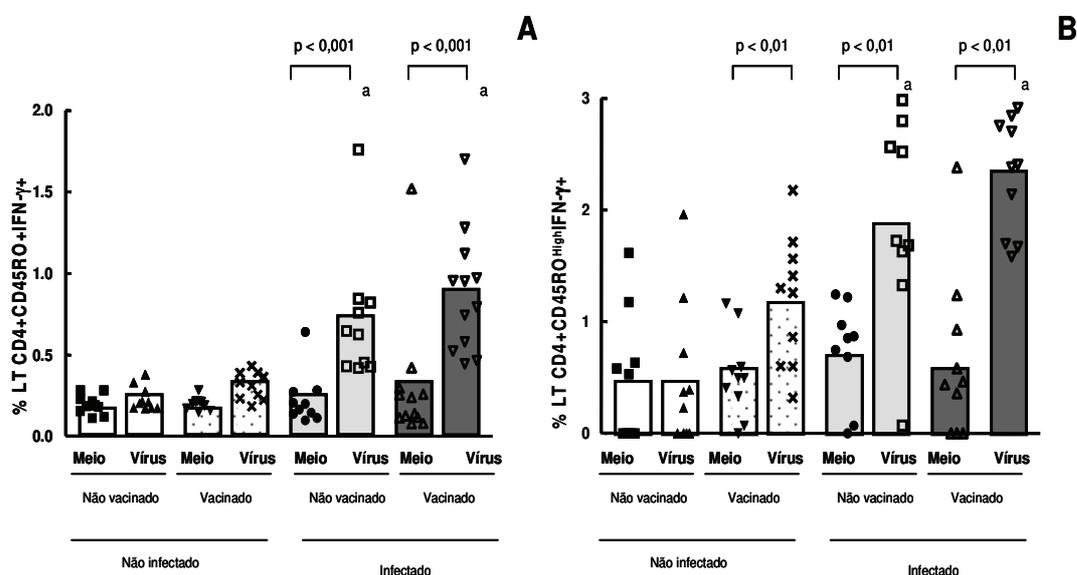
- b) Expressão de IFN- $\gamma$  por subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> apresentando o fenótipo CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>High</sup> (células de memória efetora)

Para avaliarmos o percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> expressando o marcador CD45RO, molécula encontrada em linfócitos T de memória, juntamente com IFN $\gamma$ , foram realizados ensaios de tripla marcação e as subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>High</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> foram analisadas individualmente (Gráfico 9). As células caracterizadas nesse trabalho como CD45RO<sup>High</sup> são aquelas com alta expressão da molécula CD45RO, encontrada em linfócitos de memória.

Ao avaliarmos os linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+/High</sup>, co-expressando IFN- $\gamma$  podemos observar que houve aumento no percentual dessas células apenas nos grupos

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

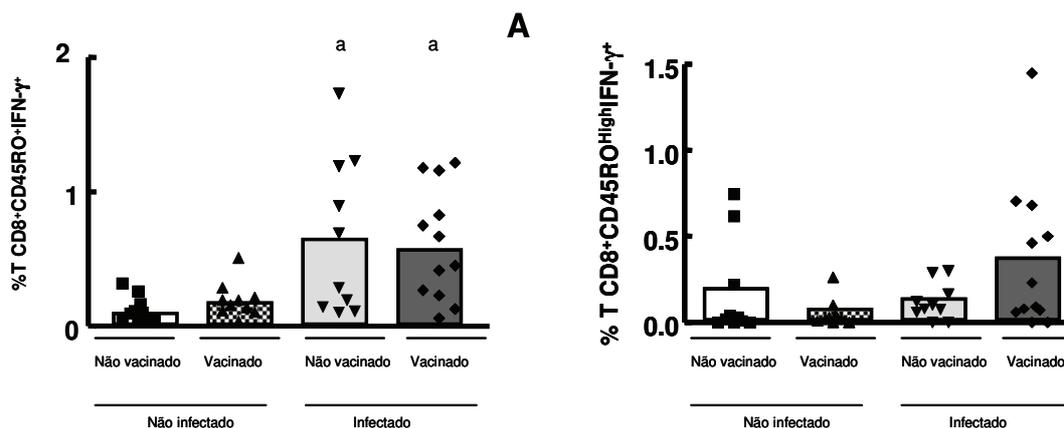
de indivíduos previamente infectados (vacinados ou não) pelo VACV. Nos indivíduos vacinados contra a varíola não foi observado aumento no percentual de células T CD4<sup>+</sup> expressando IFN- $\gamma$  quando comparados com os indivíduos controle (não infectados não vacinados) (Gráfico 9 – A<sup>a</sup>, B<sup>a</sup>).



**GRÁFICO 9:** Avaliação do percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>High</sup> expressando IFN- $\gamma$  de indivíduos previamente infectados ou não pelo *Vaccinia virus*, antes e após estimulação *in vitro* com o VACV inativado. A = CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>. B = CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>High</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>. a = diferente de não infectado não vacinado

Em relação aos linfócitos TCD8<sup>+</sup> foi observado aumento do percentual de células expressando IFN- $\gamma$  nas subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, nos grupos de indivíduos previamente infectados (vacinados ou não), quando comparados com indivíduos não infectados (vacinados ou não), após estimulação pelo VACV. Porém, na subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>High</sup> não houve diferença do percentual de células entre os grupos analisados, após estimulação antigênica (Gráfico 10 – A, B).

Linfócitos T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*



**GRÁFICO 10:** Expressão de IFN- $\gamma$  por linfócitos T  $CD8^+CD45RO^+$  e T  $CD8^+CD45RO^{High}$  de indivíduos previamente infectados ou não pelo *Vaccinia virus*, após estimulação *in vitro* com o VACV inativado. A =  $CD8^+CD45RO^+IFN-\gamma^+$ . B =  $CD8^+CD45RO^{High}IFN-\gamma^+$ . a = diferente de não infectado não vacinado

- c) Expressão de TNF- $\alpha$  por subpopulações de linfócitos T efetores  $CD4^+$  e  $CD8^+$  ( $CD4^+/CD8^+CD45RO^+$ ,  $CD4^+/CD8^+CD45RO^{High}$ )

Nesse estudo avaliamos ainda os linfócitos T efetores  $CD4^+CD45RO^{+/High}$ , co-expressando TNF- $\alpha$  e observamos que houve aumento do percentual desses linfócitos em todos os indivíduos com exposição prévia ao VACV, seja por infecção ou pela vacinação, quando comparados com indivíduos não infectados não vacinados, após estimulação *in vitro* pelo VACV (Gráfico 11 – A, B).

Já em relação aos linfócitos T  $CD8^+CD45RO^{+/High}$ , co-expressando TNF- $\alpha$ , só observamos que houve aumento do percentual desses linfócitos nos grupos de indivíduos previamente infectados (vacinados ou não), quando comparados com indivíduos não infectados (vacinados ou não), após estimulação pelo VACV (Gráfico 11 – C, D).

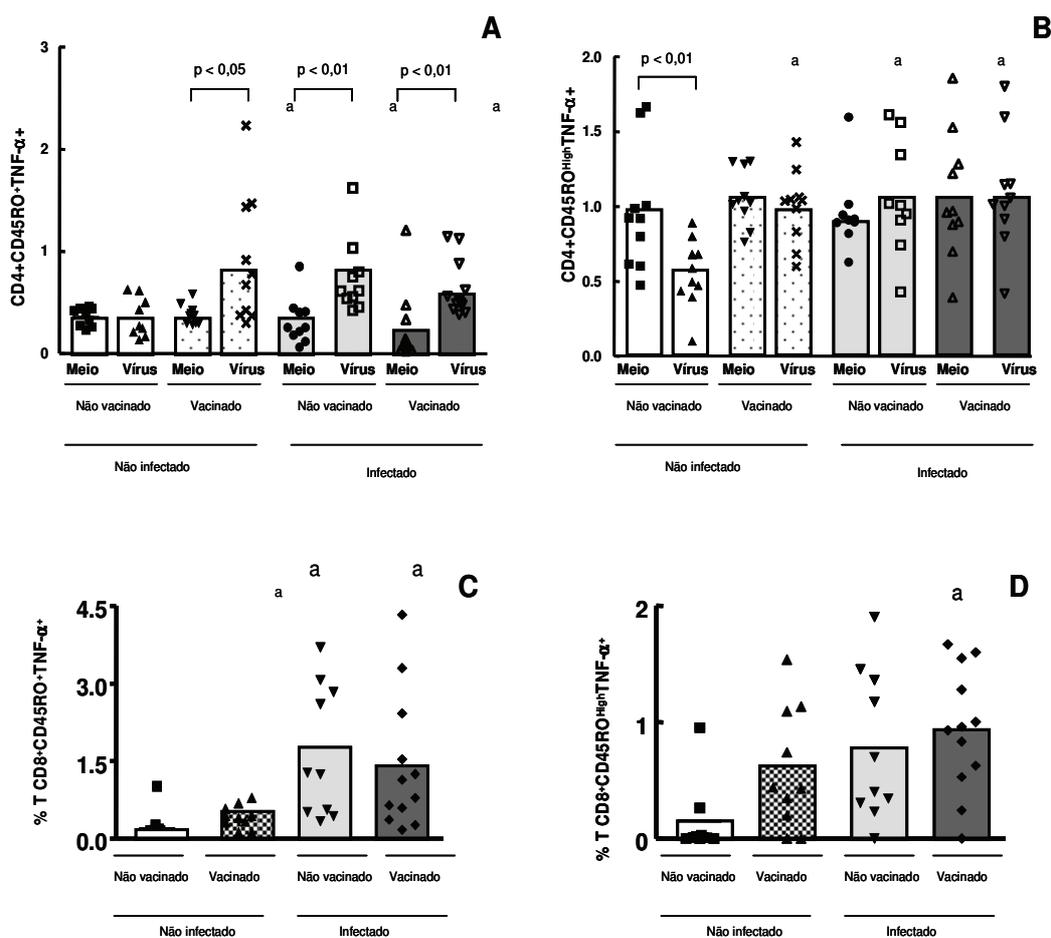


GRÁFICO 11: Expressão de TNF- $\alpha$  em células T de memória CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, antes e após estimulação *in vitro* com o VACV inativado. A = CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>. B = CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>High</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>. C = CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>. D = CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>High</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>. a = diferente de não infectado não vacinado

d) Expressão de IFN- $\gamma$  por subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> expressando ou não a selectina CD62L

Nesse estudo avaliamos ainda a expressão de CD62L por se tratar de uma molécula de adesão pertencente à família das selectinas altamente expressa em linfócitos T virgens responsável pela migração desses linfócitos para o tecido linfóide (SWAIN *et al.*, 1996; KUNKEL *et al.*, 1998; SALMI; JALKANEN, 1998). Dessa forma, células definidas como CD62L<sup>Low</sup> são aquelas que apresentam baixa expressão de tal molécula e linfócitos T CD62L<sup>High</sup> são aqueles com alta expressão. Por sua vez,

células CD62L<sup>neg</sup> são aquelas que não expressam tal marcador em sua superfície sendo considerados ativados ou de memória.

Em relação à expressão de IFN- $\gamma$  em linfócitos T CD4<sup>+</sup> com baixa ou nenhuma expressão de CD62L (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>Low/neg</sup>) observamos que houve aumento do percentual desses linfócitos em todos os indivíduos com infecção prévia pelo VACV (vacinados ou não) quando comparados com indivíduos não infectados (vacinados ou não), após estimulação *in vitro* com o VACV (Gráfico 12 – A, C, G). Na subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>High</sup> não houve aumento no percentual de células expressando IFN- $\gamma$  quando comparamos os grupos analisados, após estímulo viral (Gráfico 12 – E).

Ao analisarmos os linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, co-expressando IFN- $\gamma$  observamos que houve aumento do percentual desses linfócitos em todos os indivíduos com exposição prévia ao VACV, seja por infecção ou pela vacinação, quando comparados com indivíduos não infectados não vacinados, após estimulação com o vírus (Gráfico 12– B). Nas subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>Low/High</sup> houve aumento no percentual de células expressando IFN- $\gamma$  apenas no grupo de indivíduos infectados previamente vacinados, quando comparados com os outros três grupos: infectados não vacinados, não infectados vacinados e não infectados não vacinados. Já na subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>neg</sup> não houve aumento no percentual de células expressando IFN- $\gamma$  quando comparamos os grupos analisados, após estimulação viral.

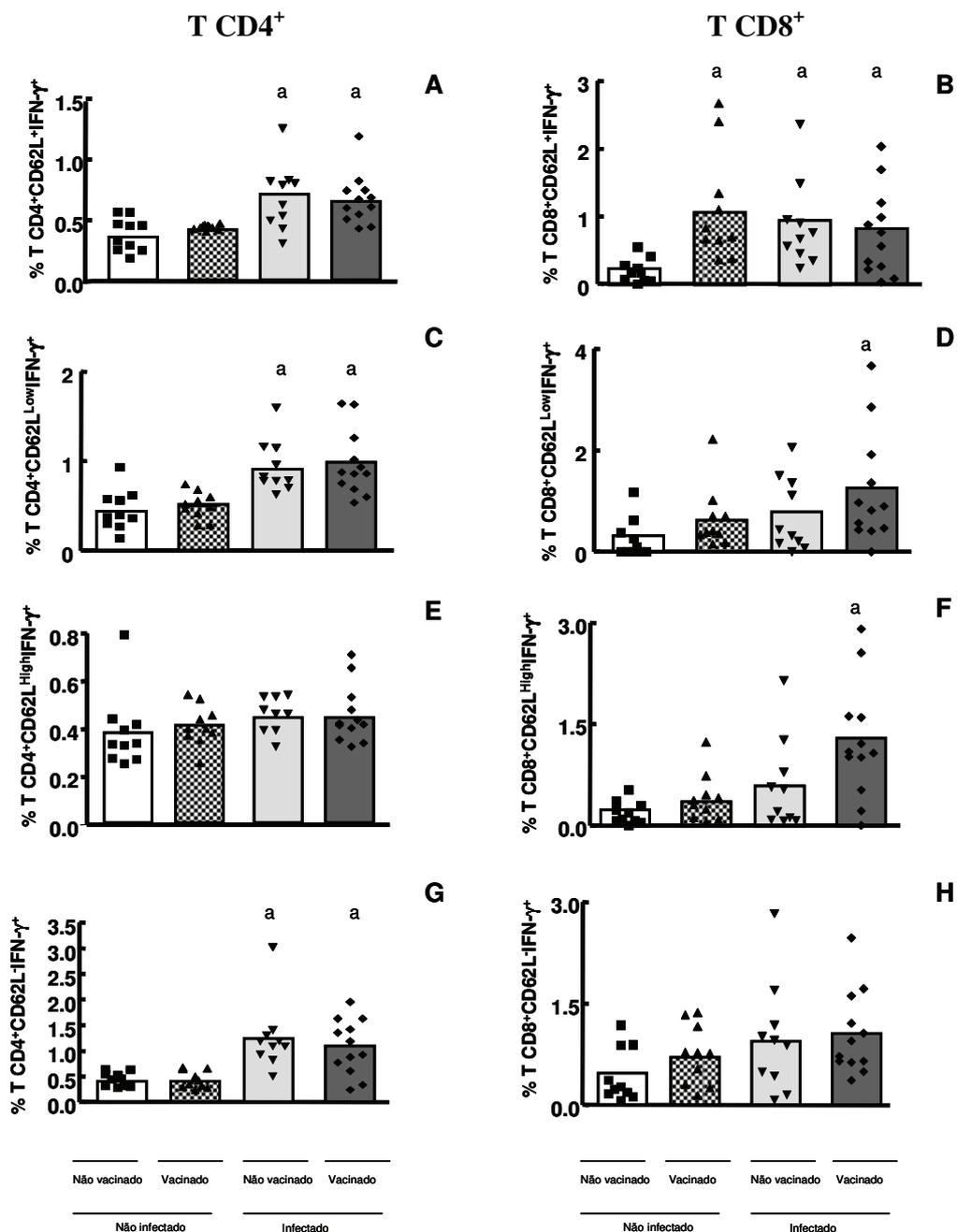


GRÁFICO 12: Expressão de IFN-γ em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, após estimulação *in vitro* pelo VACV inativado.

A = CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup>. B = CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup>. C = CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>Low</sup>IFN-γ<sup>+</sup>. D = CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>Low</sup>IFN-γ<sup>+</sup>. E = CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>High</sup>IFN-γ<sup>+</sup>. F = CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>High</sup>IFN-γ<sup>+</sup>. G = CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>neg</sup>IFN-γ<sup>+</sup>. H = CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>neg</sup>IFN-γ<sup>+</sup>.

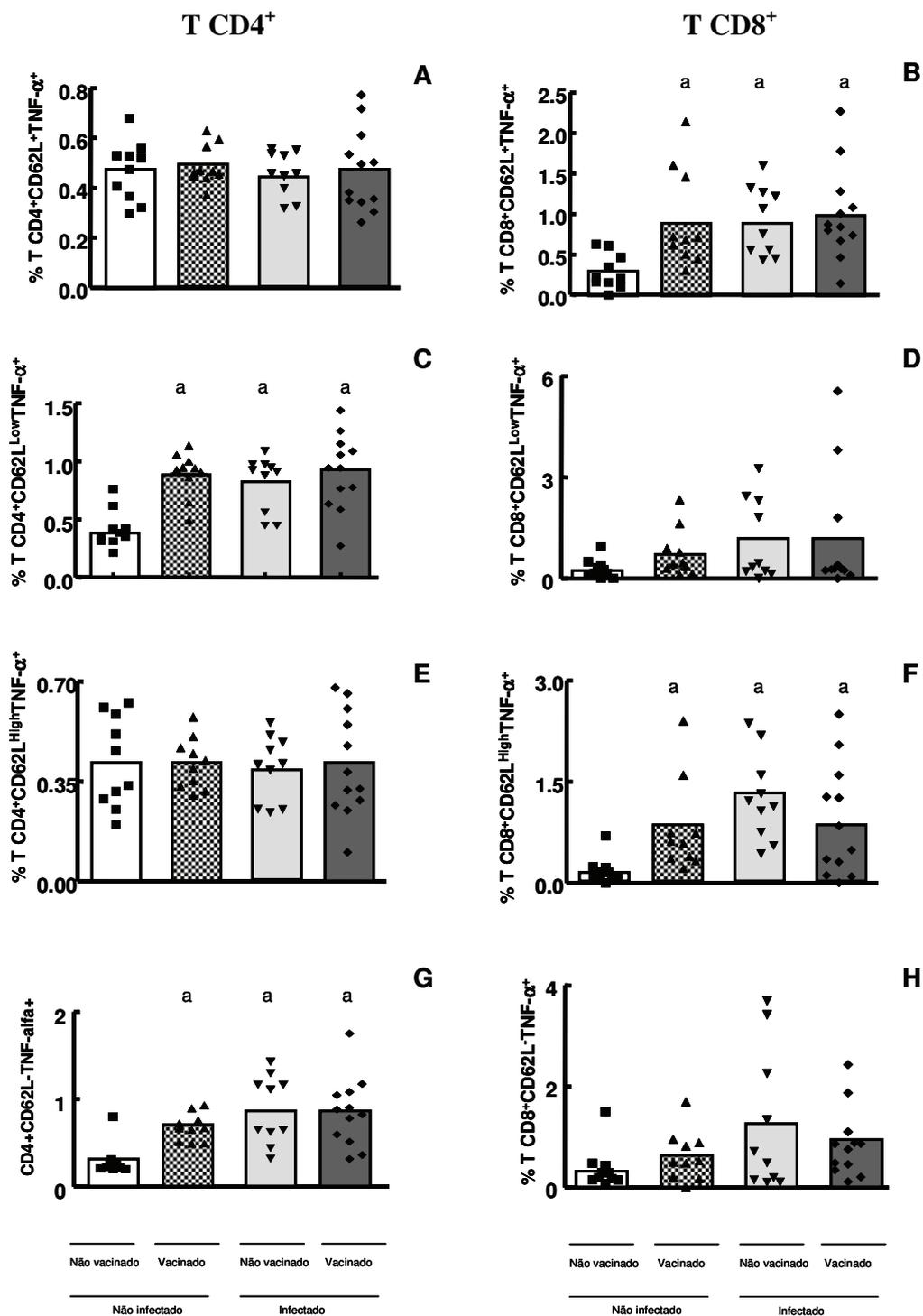
a = diferente de não infectado não vacinado

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

e) Expressão de TNF- $\alpha$  por subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> expressando ou não CD62L

Em relação aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> com alta expressão de CD62L (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+ /High</sup>) co-expressando TNF- $\alpha$  pudemos observar que não houve aumento do percentual desses linfócitos quando comparamos os grupos analisados, após estimulação viral (Gráfico 13 – A, E). Porém, ao avaliarmos os linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>neg</sup> e aqueles com baixa expressão, CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>Low</sup>, co-expressando TNF- $\alpha$  observamos que houve aumento do percentual desses linfócitos em todos os indivíduos com infecção prévia pelo VACV (vacinados ou não), quando comparados com indivíduos não infectados (vacinados ou não), após estimulação antigênica (Gráfico 13 – C, G).

Nossos resultados mostram um fenótipo diferente apresentado pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, uma vez que ao analisarmos os linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>/High</sup>, co-expressando TNF- $\alpha$  observamos que houve aumento do percentual desses linfócitos em todos os indivíduos com exposição prévia ao VACV, seja por infecção ou pela vacinação quando comparados com indivíduos não infectados não vacinados, após estímulo com o vírus (Gráfico 13– B, D). Nas subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>Low/neg</sup> não houve aumento no percentual de células expressando TNF- $\alpha$  quando comparamos os grupos analisados, após o estímulo antigênico (Gráfico 13 – F, H).



**GRÁFICO 13:** Expressão de TNF-α em linfócitos T virgens, após estimulação *in vitro* pelo VACV inativado.

A = CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>TNF-α<sup>+</sup>. B = CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>TNF-α<sup>+</sup>. C = CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>Low</sup>TNF-α<sup>+</sup>. D = CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>Low</sup>TNF-α<sup>+</sup>. E = CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>High</sup>TNF-α<sup>+</sup>. F = CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>High</sup>TNF-α<sup>+</sup>. G = CD4<sup>+</sup>Cd62L<sup>neg</sup>TNF-α<sup>+</sup>. H = CD8<sup>+</sup>Cd62L<sup>neg</sup>TNF-α<sup>+</sup>.

a = diferente de não infectado não vacinado

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

## **5) DISCUSSÃO**

Neste estudo, demonstramos o perfil de células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) de memória, após uma infecção pelo VACV ocorrida em 2005. Além disso, comparamos o fenótipo de memória induzido pela infecção natural pelo VACV com o fenótipo induzido após a vacinação contra varíola.

Em nosso 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 de 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 4 grupos de voluntários, observamos diferenças significativas no perfil de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> induzidas pela infecção por VACV, pela vacinação contra varíola e pelos controles negativos (não infectados e não vacinados). Os achados desse trabalho podem ajudar a elucidar as razões pelas quais indivíduos previamente vacinados contra varíola adquiriram a infecção por VACV, à despeito da vacinação prévia. A partir dos achados desse estudo levantamos um importante questionamento: a vacinação prévia contra varíola induz proteção para infecções pelo VACV?

Nossos dados sugerem que, para indivíduos avaliados nessa pesquisa, a vacinação contra a varíola não foi capaz de proteger contra uma infecção posterior pelo VACV, em totalidade. Vale ressaltar que essa infecção ocorreu após um longo período de pós-vacinação, cerca de 30 anos antes da ocorrência infecciosa. No entanto, a análise clínica mostrou que houve uma diminuição significativa dos sintomas nos indivíduos vacinados sugerindo que há, pelo menos vários anos após a vacinação, uma proteção parcial que é refletida na sintomatologia do indivíduo.

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 poxvírus, 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.

Além disso, em nossos estudos observamos que há um maior percentual de células de memória em indivíduos recentemente infectados (vacinados ou não) quando comparados aos indivíduos apenas vacinados contra a varíola. Tal fato pode estar relacionado com o grande intervalo de tempo decorrido desde a vacinação, uma vez que alguns estudos defendem a idéia de que a memória das células T, após a infecção pela varíola ou após a vacinação é de curto prazo, menor ou igual a 5 anos (O'TOOLE; MAIR; INGLESBY, 2002; KAREM *et al.*, 2007; CDC, 2001). No entanto, outros trabalhos defendem o contrário, que a memória estabelecida seja de longo prazo (AMANNA; CARLSON; SLIFKA, 2007; HAMMARLUND *et al.*, 2003; PUTZ *et al.*, 2005; CROTTY *et al.*, 2003). Essa memória de longo prazo pode estar relacionada com o fato de que, em nosso estudo, os indivíduos infectados que eram previamente vacinados desenvolveram uma forma mais branda da infecção pelo VACV, sugerindo uma proteção residual da vacina, uma vez que os sintomas apresentados pelos indivíduos previamente vacinados foram mais brandos do que aqueles apresentados no grupo de indivíduos infectados, mas não vacinados.

Estudos realizados com infecções pelo *Monkeypox virus* determinaram um padrão semelhante de sintomatologia pela infecção supracitada, 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; SZCZENIEWSKI; 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).

Um estudo prévio identificou um grupo de células T citotóxicas de memória de longa vida específicas para o VACV em indivíduos imunizados contra a varíola. Além disso, detectou-se uma resposta significativa de células T citotóxicas CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> contra VACV, após estimulação *in vitro*. Indicando que essas células de memória são mantidas por longo prazo e determinando sua importância (DEMKOWICZ *et al.*, 1996). Em nosso estudo, observamos que as infecções prévias e recentes pelo VACV são capazes de gerar uma resposta de memória significativa, enquanto que indivíduos

joventes sem história de infecção ou vacinação prévias não demonstraram resposta de células T específicas para o VACV, após estimulação *in vitro*.

No presente estudo foram utilizadas moléculas marcadoras de células virgens e de memória para descrever o perfil fenotípico das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Inúmeros marcadores têm sido descritos para caracterizar e distinguir as células T virgens e de memória. Dessa forma, células virgens são CD45RO negativas, CCR7 positivas e CD62L positivas; enquanto as células de memória são subdivididas em memória efetora (T<sub>EM</sub>) e memória central (T<sub>CM</sub>). As T<sub>EM</sub> são CD45RO positivas, CCR7 negativas e CD62L negativas; por sua vez, algumas T<sub>CM</sub> podem reexpressar CD62L e CCR7 (LANZAVECCHIA; SALLUSTO, 2002; LANZAVECCHIA; SALLUSTO, 2005; GEGINAT *et al.*, 2003). De acordo com Lanzavecchia e Sallusto (2005), a memória é mediada por células de memória efetora (T<sub>EM</sub>) que migram para tecidos periféricos inflamados e possuem imediata função efetora, com produção de citocinas, dentre elas o IFN- $\gamma$ ; e por células de memória central (T<sub>CM</sub>) que migram para tecidos linfóides secundários, assim como as células T virgens, e possuem pouca ou nenhuma função efetora, porém proliferam e se diferenciam em células efetoras em resposta à estimulação antigênica.

Nesse estudo, avaliamos a expressão (CD62L<sup>High</sup>) e a perda da expressão (CD62L<sup>-</sup>) da molécula CD62L. Esta molécula tem importante participação na ativação e migração das células T, juntamente com a expressão da quimiocina CCR7, como já descrito em outros estudos (SWAIN *et al.*, 1996; KUNKEL *et al.*, 1998; SALMI; JALKANEN, 1998). Além disso, avaliamos a expressão da molécula CD45RO, uma isoforma da molécula CD45, que se liga ao receptor da célula T e facilita o reconhecimento do antígeno, possibilitando a ativação da célula T (MURPHY, 2010). Dessa forma, as subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> apresentando os fenótipos CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>High</sup>, células ativadas, foram analisadas. A análise dos dados demonstrou que os indivíduos previamente infectados pelo *Vaccinia virus* vacinados ou não apresentaram aumento significativo no percentual dessas subpopulações de linfócitos após estimulação antigênica específica. O mesmo não foi observado nos grupos de indivíduos que não haviam sido infectados pelo vírus, independentemente de terem sido vacinados ou não. Os resultados encontrados no grupo de indivíduos não infectados vacinados foram semelhantes àquele do grupo de indivíduos não infectados não vacinados, ou seja, não houve aumento no percentual de células com fenótipo de memória, após estimulação com o antígeno.

De maneira similar, um aumento no percentual de células T CD8<sup>+</sup>, expressando a molécula de ativação CD45RO (CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>High</sup>), foi detectado apenas nos indivíduos previamente infectados pelo *Vaccinia virus*, vacinados ou não, mas não nos indivíduos não infectados, vacinados ou não. Em relação ao percentual de células T CD4<sup>+</sup>, expressando os marcadores de adesão e migração para linfonodos (CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>), observou-se que não houve diferença entre os grupos analisados.

No entanto, quando analisamos o compartimento de células T CD8<sup>+</sup>, nossos resultados demonstraram que indivíduos previamente infectados (vacinados ou não) tinham um maior percentual de células expressando os marcadores de adesão e migração para linfonodos (CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) quando comparados com os indivíduos não infectados, vacinados ou não. É importante ressaltar que essas células co-expressavam IFN- $\gamma$ . Esse dado é interessante, pois sugere que são células T de memória central, pois expressam CCR7 e CD62L, produzindo a citocina IFN- $\gamma$ . De maneira semelhante um estudo recente identificou células T CD8<sup>+</sup> VACV-específicas com fenótipo de memória central. Essas células eram TCD8<sup>+</sup> VACV-específicas expressando CD44<sup>High</sup> e CD62L<sup>+</sup> e constituíam aproximadamente 10% de todas as células T antígeno-específicas com altos níveis de expressão de CCR7 (LAOUAR et al., 2008).

Com o intuito de avaliar as subpopulações de linfócitos T efetores CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, foram realizados ensaios de marcação de citocinas intracitoplasmáticas antes e após estimulação *in vitro* com o VACV. Dessa forma, puderam-se identificar as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> que expressavam as citocinas IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$ .

Em relação à expressão de IFN- $\gamma$  em células T CD4<sup>+</sup> observou-se que havia um maior percentual dessas células 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. Apesar de, em todos os grupos que já tiveram contato prévio com o vírus, isto é, indivíduos previamente infectados (vacinados ou não) e indivíduos não infectados vacinados, houve uma diferença significativa entre culturas controle e estimuladas. Puissant-Lubrano e cols. (2010) detectaram que a frequência de células VACV-específicas produtoras de IFN- $\gamma$  era significativamente maior em indivíduos previamente vacinados quando comparados com indivíduos saudáveis não vacinados.

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

No presente estudo, observamos que o fenótipo das células T CD4<sup>+</sup> expressando IFN- $\gamma$  era composto de linfócitos T: CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>Low</sup> e CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>High</sup>), CD4<sup>+</sup>CD62<sup>Low</sup> e CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>. Além disso, foi observado que apenas os indivíduos previamente infectados (vacinação ou não) apresentavam maior percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>High</sup> co-expressando IFN- $\gamma$ , também chamados de células T efetoras, quando comparados com indivíduos não infectados (vacinação ou não), após estimulação *in vitro* com o VACV inativado por luz UV. Nos indivíduos não infectados (vacinação ou não) não foi observado um significativo aumento no percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados expressando IFN- $\gamma$ , após estimulação antigênica *in vitro*, quando comparados com os indivíduos não infectados não vacinados (grupo controle).

Esse resultado sugere que a pré-exposição ao *Vaccinia virus*, por meio da infecção viral, gera, em uma posterior estimulação *in vitro*, células T CD4<sup>+</sup> de memória, produtoras de IFN- $\gamma$ , uma vez que houve aumento significativo no percentual de células CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> nas culturas de pacientes que já haviam sido previamente infectados pelo VACV, quando comparados com indivíduos não infectados vacinados. Isso também pode ser observado pelo fato de que no grupo de pacientes não expostos (não infectados não vacinados) não houve diferença significativa no percentual de células CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, comparando neste grupo resposta de células com e sem o estímulo antigênico. Em estudos anteriores relacionados à produção de IFN- $\gamma$  com um grupo de pacientes vacinados contra a varíola foi observado que células T CD4<sup>+</sup> positivas, produtoras de IFN- $\gamma$ , específicas para o *Vaccinia, virus*, apareceram na circulação de pacientes vacinados, a partir do décimo primeiro dia, após a vacinação (ZAUNDERS *et al.*, 2006).

Puissant-Lubrano e colaboradores, em um estudo com voluntários vacinados, observaram que a frequência de células T produtoras de IFN- $\gamma$  era significativamente maior em indivíduos previamente vacinados quando comparados com indivíduos saudáveis não vacinados (PUISSANT-LUBRANO *et al.*, 2010).

Em um estudo prévio com pacientes vacinados contra a varíola, Combadiere e colaboradores demonstraram que as células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  apresentavam fenótipo CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD11a<sup>Hi</sup>CD27<sup>+</sup> e CCR7<sup>-</sup> T cells, ou seja, células com fenótipo de memória de modo semelhante ao encontrado em nosso trabalho (COMBADIERE *et al.*, 2004). Em nosso estudo, foi observado que as células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

apresentavam os seguintes fenótipos: CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>Low</sup>, CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>High</sup>, CD4<sup>+</sup>CD62<sup>Low</sup> e CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>. Isso demonstra que após estimulação antigênica o perfil de células produtoras de IFN- $\gamma$ , em nosso estudo, era composto principalmente de células de memória.

Foi observado ainda que apenas os indivíduos que haviam tido uma exposição recente ao *Vaccinia virus*, ou seja, os indivíduos infectados apresentavam aumento significativo no percentual de células T de memória efetora produtoras de IFN- $\gamma$  com fenótipo CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>High</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, após estimulação antigênica. Nos grupos de indivíduos não infectados, tanto vacinados quanto não vacinados, não foi observado um aumento no percentual significativo das células de memória efetora, após estimulação *in vitro* com o *Vaccinia virus*.

De maneira similar aos resultados observados no compartimento de células T CD4<sup>+</sup>, observou-se que há um maior percentual de células T de memória CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> expressando IFN- $\gamma$  nos indivíduos previamente infectados (vacinados ou não) quando comparados com os indivíduos não infectados (vacinados ou não), após estimulação *in vitro* com o VACV.

Por outro lado, ao avaliarmos os linfócitos T CD8<sup>+</sup> expressando a molécula de adesão CD62L (CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) e co-expressando IFN- $\gamma$  observamos um maior percentual de tais células nos grupos de indivíduos previamente expostos ao *Vaccinia virus*, seja por meio da vacinação e/ou pela infecção, quando comparados com indivíduos não infectados não vacinados, após estimulação antigênica. Observamos que o fenótipo dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> expressando IFN- $\gamma$  era composto de: CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>Low</sup> e CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>.

A importância de IFN- $\gamma$  na resposta imune contra o VACV já foi bastante caracterizada e detectada em vários estudos. Em um estudo prévio realizado em nosso laboratório com cultura de células mononucleares do sangue periférico, de indivíduos com a infecção ativa pelo VACV, foi observada uma maior quantidade de IFN- $\gamma$  no sobrenadante de culturas de PBMCs de indivíduos infectados quando comparados com indivíduos não infectados (GOMES *et al.*, 2012). Dando continuidade ao estudo de Gomes e colaboradores (2012), realizado com indivíduos que estavam apresentando a infecção ativa pelo *Vaccinia virus*, durante um surto que ocorreu em 2005, no estado de Minas Gerais, realizamos esse estudo com o intuito de observarmos o comportamento das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de memória desses mesmos indivíduos. No estudo de

Gomes e colaboradores (2012) foi realizada a análise de citocinas do sobrenadante de culturas de PBMCs, após estimulação antigênica. Já em nosso estudo realizamos a análise de citocinas intracitoplasmáticas, no entanto, observamos resultados semelhantes, nos quais os indivíduos previamente infectados apresentavam maior percentual de células T expressando IFN- $\gamma$  quando comparados com indivíduos não infectados, após estimulação *in vitro* com o VACV.

Outra citocina avaliada em nosso estudo foi o TNF- $\alpha$ , expressa tanto por células T CD4<sup>+</sup> quanto CD8<sup>+</sup>, também já previamente descrito como importante na resposta imune contra o VACV. Em relação à expressão de TNF- $\alpha$  pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, observou-se que os indivíduos previamente expostos ao VACV, seja pela vacinação prévia ou pela infecção recente apresentavam maior percentual de células T CD4<sup>+</sup> expressando TNF- $\alpha$ , quando comparados com indivíduos não infectados não vacinados, após estímulo *in vitro* com o VACV. Nossos dados mostraram que as células co-expressando TNF- $\alpha$  eram CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>Low</sup>, CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>Low</sup>. Como já supracitado, outros estudos já demonstraram que a vacinação contra a varíola induz a uma alta expressão de TNF- $\alpha$  pelas células T CD4<sup>+</sup> de memória (HAMMARLUND *et al.*, 2003; HAMMARLUND *et al.*, 2010; PUISSANT-LUBRANO *et al.*, 2010).

Resultados semelhantes foram encontrados quando analisamos os linfócitos T CD8<sup>+</sup> expressando a molécula de adesão CD62L (CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>High</sup>) e co-expressando TNF- $\alpha$ . Os resultados mostraram que os indivíduos previamente expostos ao VACV, seja pela vacinação prévia ou pela infecção recente, apresentavam maior percentual dessas células (CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>High</sup> TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>) quando comparados com indivíduos não infectados não vacinados, após estimulação antigênica. Observou-se ainda um aumento do percentual de linfócitos T de memória CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> apenas nos indivíduos previamente infectados (vacinados ou não) quando comparados com indivíduos não infectados (vacinados ou não), após estimulação antigênica.

É importante ressaltar que em nosso estudo a expressão de TNF- $\alpha$  foi observada tanto em linfócitos T CD4<sup>+</sup> quanto T CD8<sup>+</sup>. Tal fato está provavelmente relacionado a sua função 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

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

produtoras de citocinas, produzem apenas TNF- $\alpha$  (52% a 95%) dependendo do método utilizado e do clone de linfócito (JUDKOWSKI *et al.*, 2011).

Esses resultados são semelhantes àqueles observados no percentual de células CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, demonstrando que a pré-exposição ao *Vaccinia virus*, pela vacina ou pela infecção, gera células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> capazes de produzir TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  numa exposição posterior ao vírus. Isto sugere que tais indivíduos (previamente infectados ou vacinados), em uma segunda exposição, produzem rapidamente citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , pelas células de memória. Estas citocinas são capazes de modular a resposta à infecção pelo *Vaccinia virus* o que, por sua vez, levaria a manifestações clínicas mais brandas averiguadas nos pacientes infectados, mas que haviam sido 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 de memória efetoras capazes de responder prontamente ao antígeno, numa reexposição.

Em nosso estudo observamos que indivíduos que foram pré-expostos ao *Vaccinia virus* (pela vacinação contra a varíola ou pela infecção) apresentaram aumento no percentual de células T CD4<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> e que o fenótipo dessas células era composto por linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>Low</sup>, CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>Low</sup>. Alguns estudos já haviam demonstrado que a vacinação contra a varíola gera células T CD4 de memória que expressam TNF- $\alpha$  (HAMMARLUND *et al.*, 2003; PUISSANT-LUBRANO *et al.*, 2010; HAMMARLUND *et al.*, 2010), mas até o momento nenhum estudo havia determinado o fenótipo dessas células, após uma infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*.

Ainda com o intuito de analisar a resposta imune efetora, realizamos uma análise do estado de ativação das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, através da utilização de marcadores de ativação e inibição celular. Para tanto avaliamos a expressão da molécula CD71, CD28, CD40L, CD69 e CTLA-4.

Como já exposto anteriormente a molécula CD71 é um marcador de proliferação celular, tendo sido por esta razão escolhido para análise nesse estudo. Ao avaliarmos a expressão dessa molécula em células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, observou-se que, após estímulo com o VACV, houve um maior percentual de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>) nos grupos de indivíduos previamente infectados (vacinados ou não), quando comparados com os indivíduos não infectados, tanto vacinados como não

vacinados. Em um estudo prévio, Gomes *et al.* (2012), observaram que havia uma proliferação celular significativamente maior nas culturas de PBMCs de indivíduos previamente infectados quando comparados com indivíduos não infectados, após estimulação *in vitro* com o VACV inativado por luz UV de culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos infectados e não infectados.

Em relação à expressão de CD40L, observamos que após realizarmos a estimulação antigênica, houve um maior percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup>, apenas nos indivíduos previamente infectados pelo VACV (vacinados ou não), quando comparados com indivíduos não infectados (vacinados ou não). A molécula CD40L é expressa nas células T auxiliares após a ativação com o antígeno (ABBAS, LICHTMAN, 2005). Portanto, é interessante observar que há um maior percentual de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, expressando CD40L, presente em células ativadas, apenas nos grupos de indivíduos previamente infectados pelo VACV, quando comparados com indivíduos não infectados. Isso pode também relacionar-se a uma manifestação clínica mais branda da infecção pelo VACV, numa reexposição ao vírus, como já proposto em nosso estudo.

Em relação à molécula CD69, marcador precoce de ativação celular, a análise dos dados demonstrou que houve maior expressão dessa molécula nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos grupos de indivíduos previamente infectados (vacinados ou não), comparando-os com os indivíduos não infectados (vacinados ou não), após estímulo *in vitro* com o VACV. Já em relação aos linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> não foi verificada diferença significativa no percentual dessas células quando comparamos os grupos de indivíduos infectados versus não infectados, após cultura com estímulo antigênico.

Outro importante marcador de ativação celular, a molécula CD28, foi também avaliada nesse estudo. A CD28 é uma proteína de membrana que participa da transdução de sinais e é o principal receptor para liberar os segundos sinais para a ativação das células T (ABBAS, LICHTMAN, 2005), sendo importante, portanto, analisar sua expressão para verificar o estado de ativação das células T. Os resultados demonstraram que não houve diferença no percentual de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, expressando esse marcador, quando comparamos indivíduos infectados (vacinados ou não) com indivíduos não infectados (vacinados ou não).

Outra molécula analisada nesse estudo foi a CTLA-4 cuja função reside na inibição da ativação celular e é expressa nas células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, recentemente

ativadas (ABBAS, LICHTMAN, 2005). Resultado semelhante ao da molécula CD28 foi observado na análise de CTLA-4, não havendo diferença no percentual das células T CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>, quando comparamos os quatro grupos envolvidos na pesquisa, após a estimulação *in vitro* com o VACV.

No estudo prévio realizado pelo grupo de pesquisadores do nosso laboratório, utilizando PBMCs, de indivíduos com a infecção ativa pelo VACV um diferente padrão fenotípico foi observado. Dessa forma, Gomes *et al.* (2012), observaram que em relação à molécula CD69 havia uma menor expressão dessa molécula na superfície dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> de indivíduos infectados quando comparados com os indivíduos não infectados. Já em relação à expressão dessa molécula nas células TCD8<sup>+</sup>, Gomes *et al.* (2012) não observaram diferenças significativas comparando indivíduos infectados com não infectados. Em relação às moléculas CD28 e CTLA-4, Gomes *et al.* (2012) também não observaram diferenças significativas na expressão dessas moléculas em linfócitos T CD4<sup>+</sup> de indivíduos infectados quando comparados com não infectados, após estimulação *in vitro* de PBMCs. Por outro lado, observou-se um maior percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> nos indivíduos infectados comparados com indivíduos não infectados.

Tais resultados demonstram uma diferença na expressão das moléculas de ativação quando comparamos uma primeira exposição com a reexposição ao vírus. Padrões fenotípicos diferentes emergem quando comparamos a resposta imune frente a uma primeira infecção e a exposição subsequente ao vírus. Tais diferenças estão possivelmente relacionadas tanto com a resposta imune do indivíduo quanto à modulação viral exercida pelo VACV. No entanto, não é possível ainda definir os mecanismos envolvidos nessa resposta imune tanto primária quanto de memória.

Diante dos resultados e discussão apresentados podemos sugerir que a vacinação prévia contra a varíola realizada durante as campanhas de vacinação da OMS há mais de 30 anos não seria capaz de gerar uma proteção completa que impedisse uma infecção contra futuras exposições ao *Vaccinia virus* de longo prazo, no entanto, nossos achados sugerem fortemente que existe uma imunidade residual que provavelmente está associada a uma manifestação mais branda dos sintomas da doença que por sua vez pode ser consequência da capacidade do indivíduo de eliminar mais rapidamente a infecção viral.

Finalizando, é importante ressaltar que o nosso estudo apresentou algumas diferenças no fenótipo das células T CD4 e TCD8 quando comparamos os grupos de

indivíduos previamente infectados pelo *Vaccinia virus* com os grupos de indivíduos não infectados, mais uma vez corroborando a nossa hipótese de que a vacinação de indivíduos contra a varíola, leva a indução de uma resposta imune de memória efetora contra infecções futuras. No entanto, ainda são necessários mais estudos para o melhor entendimento do mecanismo de persistência da memória contra esses vírus. O fato de termos avaliado a resposta de indivíduos previamente infectados vacinados abriu uma janela importante de investigação quanto ao desenvolvimento de memória imunológica contra a infecção subsequente pelo *Vaccinia virus*. O fato de não termos observado reinfecção no grupo de infectados recentemente, sugere que a infecção primária induz uma resposta efetiva, pelo menos de curto prazo, nestes indivíduos. Diferentemente da vacinação, que embora tenhamos observado uma memória residual, não foi capaz de prevenir quanto à aquisição da infecção. No entanto, gerou proteção parcial, uma vez que as manifestações clínicas apresentadas pelos indivíduos previamente vacinados foram mais amenas quando comparadas com indivíduos que não haviam sido previamente vacinados.

Nossos dados demonstram a participação importante das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> na resposta imune contra o *Vaccinia virus*, no entanto sabemos que esse trabalho possui algumas limitações como o número amostral composto de 42 indivíduos sendo 22 previamente infectados e 20 não infectados. Porém, como já previamente descrito por outros trabalhos desse grupo, até o momento a notificação dessa zoonose causada pelo VACV não é compulsória gerando uma subnotificação dos casos, dificultando o acesso a tais pacientes, sendo necessária a realização de busca ativa dos mesmos (SILVA GOMES *et al.*, 2012). Tal fato dificulta a busca por um número maior de pacientes e, portanto, até o momento não é possível elucidar todos os mecanismos envolvidos na resposta imune de memória contra a infecção pelo VACV.

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

## **6) CONCLUSÕES**

Esse estudo analisou aspectos relacionados à resposta imune de memória após uma infecção natural pelo *Vaccinia virus*. Os resultados sugerem que tanto as células T CD4<sup>+</sup> quanto CD8<sup>+</sup> estão envolvidas no processo de resposta imune contra o VACV.

Nesse estudo, observamos que a vacinação prévia contra a varíola não gerou uma proteção completa contra a infecção pelo VACV, uma vez que indivíduos previamente vacinados adquiriram a doença. No entanto, pudemos observar que existe uma imunidade residual, provavelmente composta pelas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de memória efetora produtoras de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , uma vez que a sintomatologia apresentada pelos indivíduos previamente infectados vacinados foi mais branda quando comparada com os sintomas dos pacientes infectados não vacinados. Tal fato está provavelmente associado à observação de que os indivíduos previamente infectados (vacinados ou não) apresentavam maior percentual de células T de memória efetora expressando IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , quando comparados com indivíduos não infectados (vacinados ou não), após estimulação *in vitro* com o VACV inativado por luz UV. Observamos também que os indivíduos previamente infectados (vacinados ou não) apresentavam um maior percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> apresentando marcadores de ativação como CD69, CD40L, CD71 e CD45RO<sup>High</sup>, quando comparados com os indivíduos não infectados (vacinados ou não), após estimulação antigênica.

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

## **7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. *Imunologia Celular e Molecular*, 5<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

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

AMANNA, I. J.; CARLSON, N. E.; SLIFKA, M. K. Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. **N Engl J Med.**; v.357, n.19, p.1903–1915, 2007.

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.

BAHAR MW, GRAHAM SC, CHEN RA, COORAY S, SMITH GL, STUART DI, GRIMES JM. How vaccinia virus has evolved to subvert the host immune response. **J Struct Biol.**, v.175, n.2, p.127-34, 2011.

BECKER, T. C. *et al.* Bone marrow is a preferred site for homeostatic proliferation of memory CD8 T cells. **J. Immunol.**, v. 174, p. 1269-1273, 2005.

BRADLEY, L. M.; WATSON, S. R.; SWAIN, S. L. Entry of naïve CD4 T cells into peripheral lymph nodes requires L-selectin. **J Exp Med**, v. 180, p. 2401-2406, 1994.

BROYLES, S., S. Vaccinia vírus transcription. **J. Gen. Virology**, v. 84, n. 9, p. 2293-2303, 2003

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

BUTCHER, E. C.; PICKER, L. J. Lymphocyte homing and homeostasis. **Science**, v. 272, p. 60-66, 1996.

CAMPBELL JJ, BOWMAN EP, MURPHY K, YOUNGMAN KR, SIANI MA, *et al.* 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.** v.141, p. 1053–1059,1998.

CAMPOS MAS, KROON EG. Critical period for irreversible block of Vaccinia virus replication. **Rev Microbiol** v.24, p.104–10, 1993.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Vaccinia (smallpox) vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, 2001. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**; v.50, p.1-25, 2002.

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.

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

CONDIT, R. G.; MOUSSATCHE, N.; TRAKTMAN, P. In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion. **Adv. Virus Res**, v. 66, p. 31-124, 2006.

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

CROTTY, S. et al. Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. **The Journal of Immunology**, p. 4969-4973, 2003.

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

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.

DEMKOWICZ WE JR, LITTAUA RA, WANG J, ENNIS FA. Human cytotoxic T-cell memory: long-lived responses to vaccinia virus. **J Virol.** v. 70, n.4, p.2627-2631, 1996.

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.

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.

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

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

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

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

FORSTER R, SCHUBEL A, BREITFELD D, KREMMER E, RENNER-MULLER I, *et al.* CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. **Cell**; v.99, p.23–33, 1999.

GEGINAT J, SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naïve, central memory and effector memory CD4<sup>+</sup> T cells. **Pathol Biol (Paris)**. v. 51, n.2, p. 64-6, 2003.

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.

GUARDA *et al.* L-selectin-negative CCR7 effector and memory CD8<sup>+</sup> T cells enter reactive lymph nodes and kill dendritic cells. **Nat Immunol**, v. 8, p. 743-752, 2007.

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.

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

GUNN *et al.* Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. **J Exp Med**, v. 189, p. 451-460, 1999.

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

HAMMARLUND, Erika *et al.* Antiviral Immunity following Smallpox Virus Infection: a Case-Control Study. **Journal of Virology**, p. 12754–12760, 2010.

HEYMANN DL, SZCZENIOWSKI 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

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.

ICTVdB Management *Vaccinia virus*. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA, 2011.

JOKLIK WK. The purification of four strains of poxvirus. **Virology** v.18, p. 9–18, 1962

JUDKOWSKI V, BUNYING A, GE F, APPEL JR, LAW K, SHARMA A, RAJA-GABAGLIA C, NORORI P, SANTOS RG, GIULIANOTTI MA, SLIFKA MK, DOUEK DC, GRAHAM BS, PINILLA C. GM-CSF production allows the identification of immunoprevalent antigens recognized by human CD4<sup>+</sup> T cells following smallpox vaccination. **PLoS One**. v.6, n.9, p. e24091, 2011.

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

KAREM, KL, REYNOLDS M, HUGHES C, BRADEN Z, NIGAM P, CROTTY S, GLIDEWELL J, AHMED R, AMARA R, DAMON IK. Monkeypox-induced immunity and failure of childhood smallpox vaccination to provide complete protection. **Clin Vaccine Immunol.**; v.14, p. 1318–1327, 2007.

KUNKEL *et al.* The roles of L-selectin, beta 7 integrins and P-selectin in leukocyte rolling and adhesion in high endothelial venules of Peyer's patches. **J Immunol**, v. 161, p. 2449-2456, 1998.

LANZAVECCHIA A, SALLUSTO F. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. **Nat Rev Immunol.** v.2, n.12, p. 982-7, 2002.

LANZAVECCHIA A, SALLUSTO F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. **Curr Opin Immunol.**;v.17, n.3, p.326-32, 2005

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

LEITE J.A., DRUMOND B.P., DE SOUZA TRINDADE G., BONJARDIM C.A., FERREIRA P.C., KROON E.G. Brazilian Vaccinia virus strains show genetic polymorphism at the *ATI* gene. **Virus Genes.**; v. 35, n.3, p.531-9, 2007

LENZ, D. C. *et al.* IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4<sup>+</sup> T cell memory. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 101, p. 9357-9362, 2004.

LEWIS-JONES, S. Zoonotic poxvirus infections in humans. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 17, p. 81-89, 2004.

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

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.

LOBATO Z.I.P, TRINDADE G.S., FROIS M.C.M, RIBEIRO E.B.T, DIAS G.R.C., TEIXEIRA B.M., LIMA F.A., ALMEIDA G.M.F, KROON, E.G. Surto de varíola bovina causada pelo vírus *Vaccinia* na região da Zona da Mata Mineira. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**; v.57, n.4, p.423-29, 2005

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

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

MACLEODA, 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.

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

MASOPUST D, VEZYS V, MARZO AL, LEFRANCOIS L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. **Science**, v. 291, p.2413-2417, 2001

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

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

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. Poxviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 4.ed. Philadelphia: Linppincott Williams & Wilkins, 2001. v.2, p. 2849-2883.

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

MOSS, B. Poxvirus Cell Entry: How Many Proteins Does it Take? **Viruses**, v.4, p.688-707, 2012

O'TOOLE T, MAIR M, INGLESBY TV. Shining light on “dark winter”. **Clin Infect Dis.**; v.34,p.972–983, 2002.

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

PUISSANT, B.; COMBADIÈRE, B. Keeping the memory of smallpox vírus. **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

REINHARDT RL, KHORUTS A, MERICA R, ZELL T, JENKINS MK: Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. **Nature**, v.410, p.101-105, 2001

RICHARDS H, LONGHI MP, WRIGHT K, GALLIMORE A, AGER A. CD62L (L-selectin) down-regulation does not affect memory T cell distribution but failure to shed compromises anti-viral immunity. **J Immunol.** v.180, n.1, p.198-206, 2008.

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

SALLUSTO, F. The role of chemokines and chemokine receptors in T cell priming and Th1/Th2 mediated responses. **Haematologica**, v. 84. p. 28-31, 1999.

SALLUSTO F, GEGINAT J, LANZAVECCHIA A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. **Annu Rev Immunol.**; v.22, p. 745–763, 2004

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

SALLUSTO F, LENIG D, FORSTER R, LIPP M, LANZAVECCHIA A: Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, v.401, p.708-712, 1999.

SALMI, M.; JALKANEN, S. Endothelial ligands and homing of mucosal leukocytes in extraintestinal manifestations of IBD. **Inflamm Bowel Dis**, v. 4, p. 149-156, 1998.

SCHMIDT FI, BLECK CK, MERCER J. Poxvirus host cell entry. **Curr Opin Virol**. v.2, n.1, p.20-7, 2012.

SCHMIDT FI, BLECK CK, HELENIUS A, MERCER J. Vaccinia extracellular virions enter cells by macropinocytosis and acid-activated membrane rupture. **EMBO J**. Jul v.30, n.17, p.3647-61, 2011.

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

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.

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

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.

SILVA GOMES JA, DE ARAÚJO FF, DE SOUZA TRINDADE G, QUINAN BR, DRUMOND BP, FERREIRA JM, MOTA BE, NOGUEIRA ML, KROON EG, SANTOS ABRAHÃO J, CÔRREA-OLIVEIRA R, DA FONSECA FG. Immune modulation in primary vaccinia virus zoonotic human infections. **Clin Dev Immunol.**;v.2012, p.974067, 2012

SIVAPALASINGAM, S. et al. Immunological memory after exposure to *Variola virus*, *Monkeypox virus*, and *Vaccinia virus*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, p. 1151-1159, abr. 2007.

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

SMITH, G. L.; MCFADDEN. Smallpox: anything to declare?. **Nat. Rev. Immunology**, v. 2, n. 7, p. 521-527, 2002.

SWAIN, S. L. *et al.* From naive to memory T cells. **Immunol Rev**, v. 150, p. 143-167, 1996.

TAUB DD, ERSHLER WB, JANOWSKI M, ARTZ A, KEY ML, MCKELVEY J, MULLER D, MOSS B, FERRUCCI L, DUFFEY PL, LONGO DL. Immunity from smallpox vaccine persists for decades: a longitudinal study. **Am J Med.** v.121, n.12, p.1058-64, 2008.

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

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

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

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

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

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

VERARDI PH, TITONG A, HAGEN CJ. A vaccinia virus renaissance: new vaccine and immunotherapeutic uses after smallpox eradication. **Hum Vaccin Immunother.** v.8, p.7, p.961-70, 2012.

WALSH SR, DOLIN R. Vaccinia viruses: vaccines against smallpox and vectors against infectious diseases and tumors. **Expert Rev Vaccines.** v.10, n.8, p.1221-40, 2011

ZAUNDERS JJ, DYER WB, MUNIER ML, IP S, LIU J, AMYES E, RAWLINSON W, DE ROSE R, KENT SJ, SULLIVAN JS, COOPER DA, KELLEHER AD. CD127<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>CD38<sup>+++</sup> CD4<sup>+</sup> Th1 effector cells are an early component of the primary immune response to vaccinia virus and precede development of interleukin-2<sup>+</sup> memory CD4<sup>+</sup> T cells. **J Virol.** v.80, n.20, p.10151-61, 2006.

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*

**8) ANEXO 1**

# 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.<sup>1</sup>

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).<sup>1-4</sup>

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).<sup>1-4</sup>

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.<sup>5</sup>

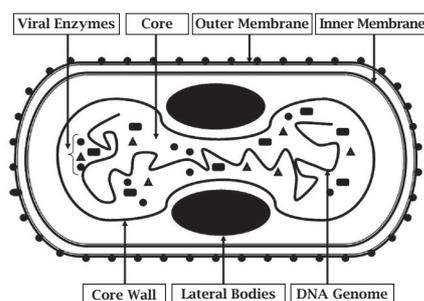
*Vaccinia virus* is responsible for an important zoonotic disease affecting cattle and hu-

man beings in Brazil. The human zoonotic infections caused by poxviruses are relatively rare.<sup>6</sup>

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.<sup>7-9</sup>

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<sup>1,2</sup>

Eduardo Augusto dos Santos Moreira-Silva<sup>1,2</sup>

Juliana de Assis Silva Gomes<sup>1,3</sup>

Flávio Guimarães da Fonseca<sup>1,4</sup>

Rodrigo Correa-Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), MG, Brazil, Ministério da Saúde.

<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Immunology, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

<sup>3</sup>Department of Morphology, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

<sup>4</sup>Department 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.<sup>10</sup>

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.<sup>11</sup>

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.<sup>12</sup> The virus infection has occurred both in individuals previously vaccinated in childhood,<sup>13-14</sup> and in people never vaccinated

**Table 1. Clinical manifestations, viral diagnosis, and transmission of *Vaccinia virus***

<b>Clinical manifestations</b>		<b>Viral diagnosis</b>		<b>Transmission</b>	
<b>Local</b>	<p>Start: focal red areas</p> <p>In a few days: pustules, edema and erythema in hands and forearms.<sup>6,11,25</sup></p> <p>After approximately 12 days: ulcerated, necrotic and painful lesions.<sup>6,11,25</sup></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.<sup>6,11,25</sup></p> <p>Secondary bacterial infections can occur in sites of original lesions.<sup>26</sup></p>	<b>Morphologic</b>	<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.<sup>11,23,27-28</sup></p>	<b>Animals</b>	<p>Transmission among animals occurs mainly through the milker's hands or mechanical milking equipment.</p> <p>Viral penetration occurs through preexisting lesions in cows' teats.<sup>11,27,32</sup></p>
<b>Systemic</b>	<p>Fever, headache, muscle ache, nausea (occasionally) that begin eight days after the appearance of the lesions.<sup>6,11,25</sup></p>	<b>Molecular</b>	<p>PCR of marking genes: thymidine kinase (TK), vaccinia virus growth factor (VGF), hemagglutinin (HA).<sup>11,27,29</sup></p> <p>Polymorphism of the restriction profile of <i>ati</i> gene.<sup>6,30</sup> Real-time PCR of <i>ha</i> gene, by using SYBR Green.<sup>31</sup></p>	<b>Human beings</b>	<p>The disease is transmitted from animals to humans through contact with the lesions in cow's teats.<sup>33</sup></p>

before.<sup>15</sup> Transmission usually occurs through accidental inoculation of *Vaccinia virus* through lesions in fingers and eyes, or through auto-inoculation.<sup>13-16</sup>

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*.<sup>17-18</sup> 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.<sup>19-21</sup>

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*.<sup>22</sup>

**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.<sup>23</sup> A fact of great relevance for public health is that physicians and other health care professionals have difficulty in diagnosing and managing these infections.<sup>24</sup>

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.<sup>23</sup>

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.<sup>33</sup>

**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.<sup>11</sup>

However indications that members of the *Orthopoxvirus* genus could be circulating actively in wild regions have been reported in Brazil since 1963.<sup>28-29</sup> 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.<sup>29</sup>

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.<sup>34</sup>

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 *Oryzomys* 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*.<sup>28-29</sup>

In addition, the type-A inclusion body (*ati*) gene could not be amplified through PCR, indicating its probable deletion. The IFN-IFN- $\alpha/\beta$ 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.<sup>35</sup>

**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).<sup>23</sup>

	1961	1693	1979	1993	1999	2000	2001	2003	
<b>Viral Sample</b>	<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 Guarani P1 virus</i>	<i>Passatempo Virus</i>
<b>Infected hosts</b>	sentinel rats	<i>Oryzomys</i> sp Rodent	sentinel rats	Swiss mice	Cows and milkers	Cows and milkers	Cows and milkers	Cows and milkers	Cows and milkers
<b>Place of occurrence</b>	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
<b>References</b>	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.<sup>36</sup> The virus was re-isolated several times and suggested to be a recombinant of *Leporipoxvirus* and *Orthopoxvirus*.<sup>37-39</sup> 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.<sup>29</sup>

***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.<sup>27,40</sup>

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.<sup>27</sup> 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.<sup>27,40</sup>

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.<sup>41</sup>

***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).<sup>24</sup>

During molecular characterization, when amplifying the *ha* gene, a deletion of 18 nucleotides was observed, allowing this virus introduction in the group of PSTV,<sup>23</sup> ARAV,<sup>11</sup> GP2V,<sup>10</sup> and CTGV.<sup>27</sup> Despite these similarities, *Muriaé virus* had unique characteristics that allowed its differentiation from other samples of VACV.<sup>24</sup>

***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.<sup>23</sup>

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.<sup>23</sup>

***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*.<sup>42</sup>

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.<sup>42</sup>

***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.<sup>11</sup>

The isolated virus was a *Vaccinia virus* variant, and was called *Araçatuba virus* (ARAV). It had a deletion identical to that of *Cantagalo virus*.<sup>11</sup> 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.<sup>11</sup>

***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.<sup>10</sup>

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.<sup>10</sup>

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-Northwestern 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.

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune de memória contra a infecção humana natural pelo *Vaccinia virus*



## CD4 and CD8 T cells participate in the immune memory response against *Vaccinia virus* after a previous natural infection<sup>☆</sup>



Daniela Carla Medeiros-Silva<sup>a,b,\*</sup>, Eduardo Augusto dos Santos Moreira-Silva<sup>a,b</sup>, Juliana de Assis Silva Gomes<sup>c</sup>, Flávio Guimarães da Fonseca<sup>d</sup>, Rodrigo Correa-Oliveira<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>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.

<sup>b</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil

<sup>d</sup>Departamento 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<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> T cells expressing lymph-node homing receptors (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) and higher percentage of memory CD4<sup>+</sup> T cells subsets (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>High</sup>) when compared with non-infected subjects, after *in vitro* viral stimulation. We also showed that infected individuals presented higher percentages of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> memory T lymphocytes expressing IFN- $\gamma$  when compared to non-infected individuals. We verified that the percentage of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T memory cells expressing TNF- $\alpha$  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<sup>+</sup> T cells expressing lymph-node homing receptors (CCR7<sup>+</sup> and CD62L<sup>+</sup>) and that the memory T cells expressing IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  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<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> 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].

<sup>☆</sup> 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](mailto:daninhamed@yahoo.com.br) (D.C. Medeiros-Silva).

Smallpox vaccine induces strong CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses that peak at 2–4 weeks post-immunization and decreasing to form a stable memory population of T cells thereafter [5,10]. Previous studies demonstrated the importance of the CD4<sup>+</sup> T cell compartment and have shown that long-term cellular memory to VACV predominantly involves CD4<sup>+</sup> Th1 IFN- $\gamma$  producing cells [3,11,12] and have observed a reduction over time of VACV-specific memory T cells in previously vaccinated individuals that retained a predominant CD4<sup>+</sup> memory T cell response [5,11]. The CD8<sup>+</sup> T cell memory population seems to decline faster than memory CD4<sup>+</sup> T cells [3]. These studies investigated the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> memory T cells against the *Orthopoxvirus* in some individuals after *smallpox* infection [9,13] or in vaccinated individuals [5,9,11,12]. In humans, two broad memory T cell subsets (CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup>) have been delineated: central memory (T<sub>CM</sub>) and effector memory (T<sub>EM</sub>) T cells [14–16]. T<sub>CM</sub> are CD45RO<sup>+</sup> memory cells that constitutively express CCR7 and CD62L (T<sub>CM</sub>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>), home to the lymph nodes, produce low levels of IFN- $\gamma$  and have limited effector function, but they proliferate and become effector cells upon secondary stimulation [17–22]. By contrast T<sub>EM</sub> are memory cells that

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- $\gamma$  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- $\gamma$ .  $T_{EM}$  expresses high levels of activation markers (such as CD45RO), lose expression of the chemokine receptor CCR7, and acquire the capacity to produce IFN- $\gamma$  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- $\gamma$  [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- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) 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% CO $_2$ . Approximately  $1 \times 10^4$  PFU of *Vaccinia virus* strain WR was added per  $1 \times 10^6$  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<sup>TM</sup> software was used for data acquisition and the FLOWJO 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- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  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- $\gamma$  $^+$ , CD4 $^+$ CD45RO $^{High}$ IFN- $\gamma$  $^+$ , CD4 $^+$ CD62L $^{neg}$ IFN- $\gamma$  $^+$ , CD4 $^+$ CD62L $^{Low}$ IFN- $\gamma$  $^+$  and CD4 $^+$ CD62L $^{High}$ IFN- $\gamma$  $^+$  (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 <sup>a</sup>	Vaccinated <sup>b</sup>	12	56 (42–68)	12	0
	Unvaccinated	10	24.5 (18–34)	10	0
Non-infected	Vaccinated <sup>c</sup>	10	46.4 (39–62)	7	3
	Unvaccinated	10	29.2 (28–31)	6	4

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

<sup>b</sup> 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.

<sup>c</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>) and its subsets (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>) (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- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ). Our data showed that the expression of CCR7 on CD4<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup>) 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<sup>+</sup> T memory cells (CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>neg</sup> CCR7<sup>-</sup>) when compared with non-infected subjects (vaccinated and unvaccinated) (Fig. 1C). Our data also showed that the expression of CD45RO<sup>High</sup> by CD4<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> T cells expressing lymph node-homing receptors (CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>) when compared with non-infected (vaccinated and unvaccinated) individuals (Fig. 2B). Furthermore, when we analyzed the subpopulation of CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>High</sup> 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- $\gamma$ and TNF- $\alpha$ expression by CD4<sup>+</sup> T cells and its subsets (CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>neg</sup>)

As it is well established that *Vaccinia virus* infection induces strong cellular responses capable of secreting effectors cytokines such as IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , we evaluated the expression of these markers. In this study the expression levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  on CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were evaluated and the results showed that expression of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  on CD4<sup>+</sup> 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).

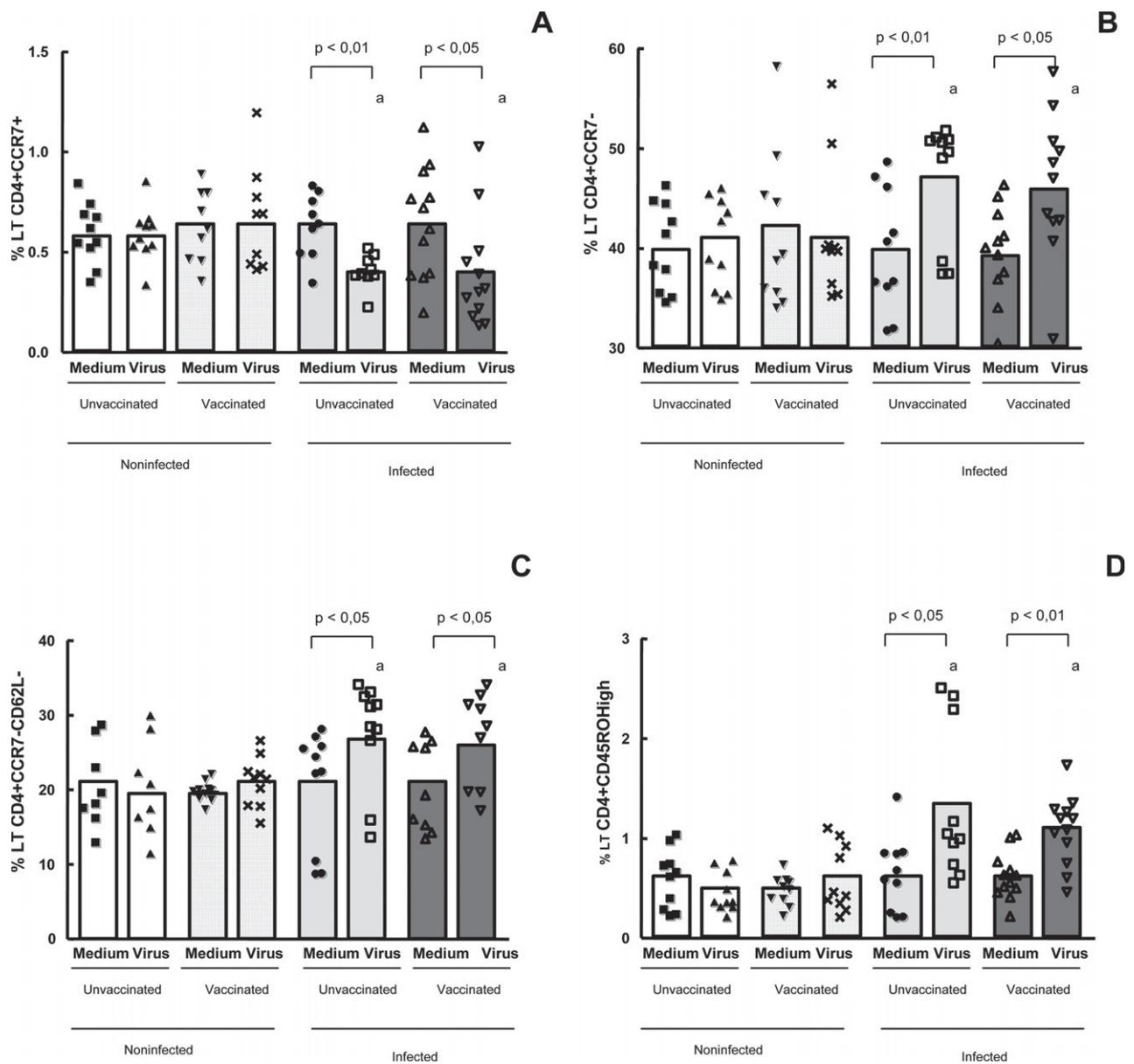
Following the identification of CD4<sup>+</sup> T cells expressing IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , the intracytoplasmatic presence of these cytokines in CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> (activated cells) and CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>Low</sup> T cells was evaluated 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- $\gamma$  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<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>High</sup> T memory cells expressing IFN- $\gamma$  (Fig. 4A and B), when compared with non-infected (vaccinated and unvaccinated) individuals. We compared in Fig. 4C and D the production of IFN- $\gamma$  by CD4 T cells that lost the selectin, CD62L, to those cells that appear to regain the marker (CD62L<sup>Low</sup>), those called T<sub>CM</sub> cells. Expression levels of IFN- $\gamma$  were measured on CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>neg</sup> 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- $\gamma$  on CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>Low</sup> T lymphocytes showed that there were significantly higher percentages of this CD4<sup>+</sup> T cell subset only in the infected (vaccinated and unvaccinated) groups, after *in vitro* stimulation with VACV, when compared

**Table 2**

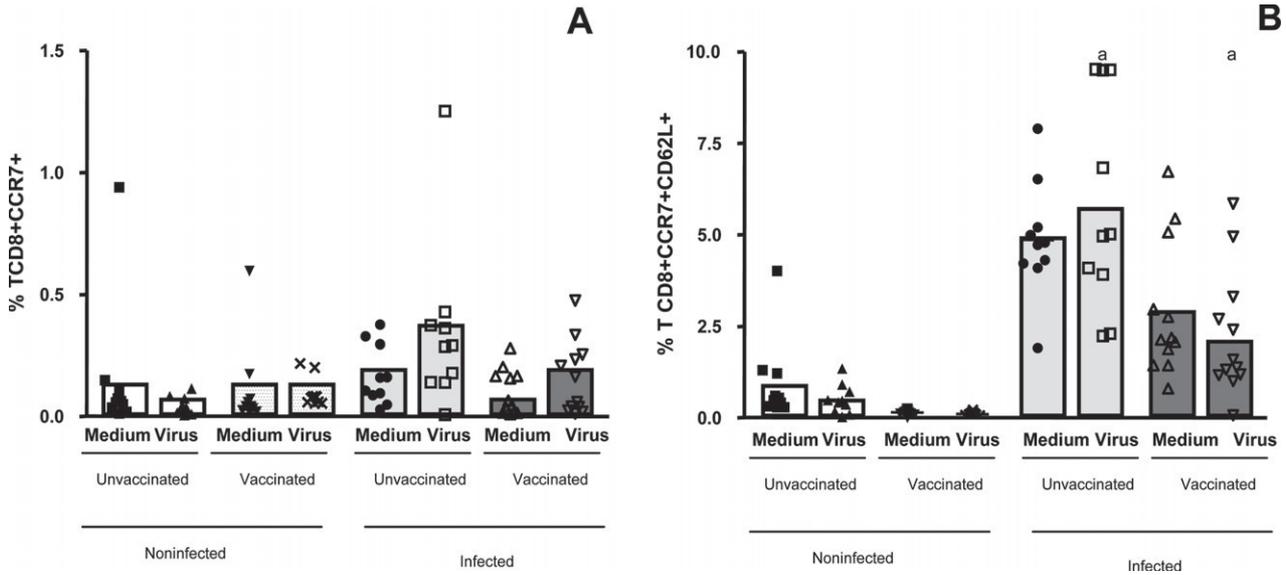
Mean percentage of T cells (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) on the whole blood from individuals infected (vaccinated and unvaccinated) and noninfected (vaccinated and unvaccinated) by *Vaccinia virus*, after *in vitro* stimulation with UV-inactivated VACV.

Groups	Cell phenotype	Cell phenotype		
		CD3 <sup>+</sup> (%) <sup>a</sup>	CD4 <sup>+</sup> (%) <sup>a</sup>	CD8 <sup>+</sup> (%) <sup>a</sup>
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

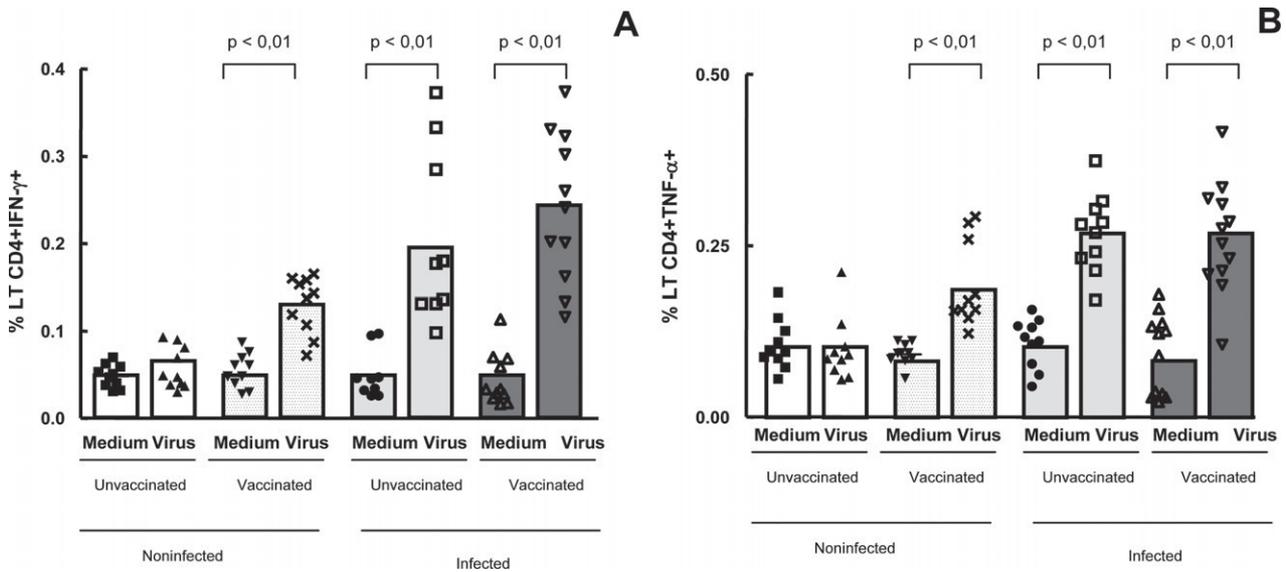
<sup>a</sup> There were no statistically significant differences in the mean percentage of T cells (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) when the four groups were compared.



**Fig. 1.** Evaluation of memory and naïve TCD4<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> (A); CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> (B); CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>High</sup> 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- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  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- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  CD4 T cells. The percentages of CD4 + IFN- $\gamma$  + (A) and CD4 + TNF- $\alpha$  + (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).

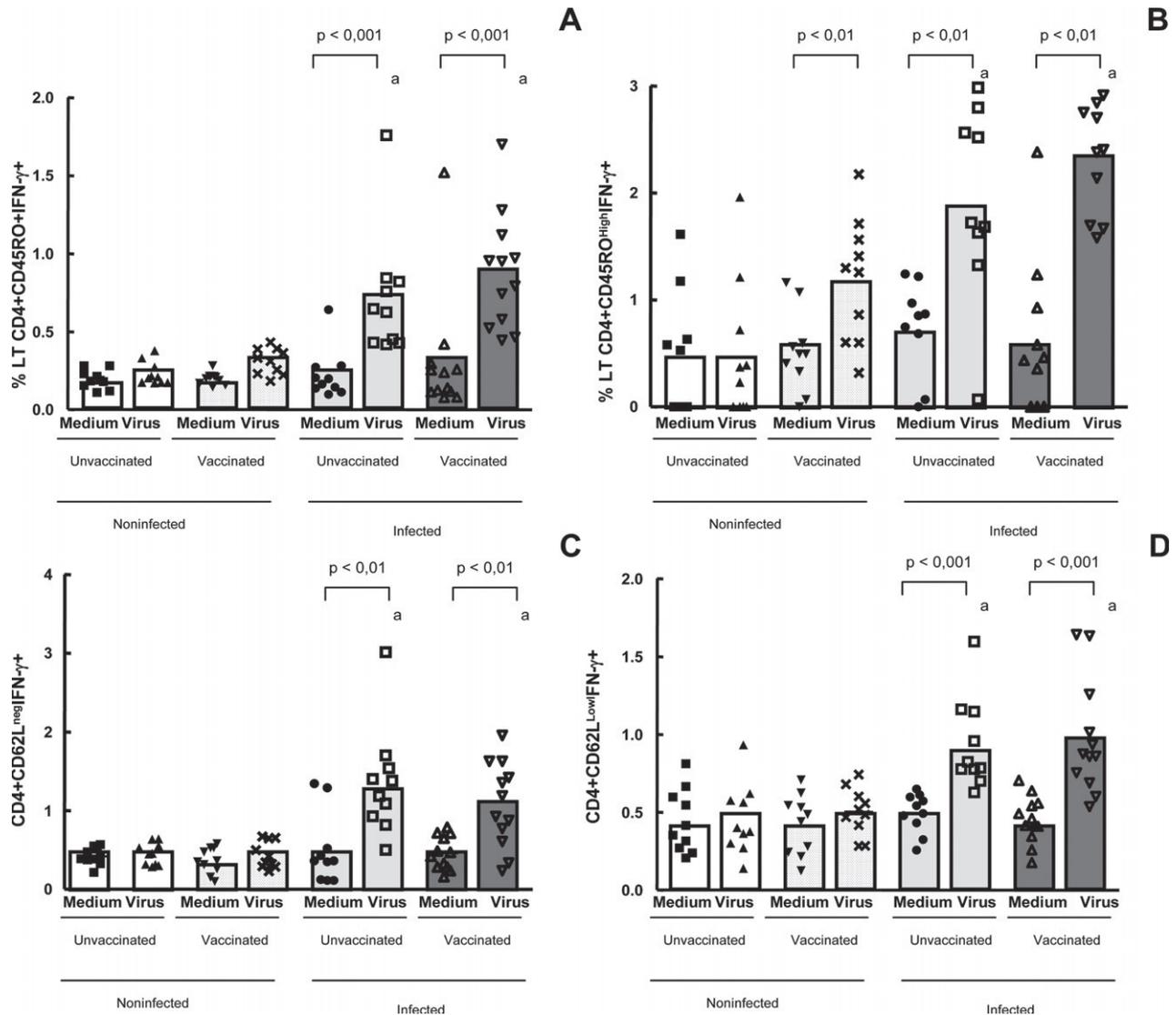
Analysis of the expression of TNF- $\alpha$  on CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>Low</sup> T memory cells showed that there were significantly higher percentages of these cells in the non-infected vaccinated individuals (*p* < 0.05) and in the infected (vaccinated and unvaccinated) subjects (*p* < 0.01), when compared with non-infected unvaccinated patients (Fig. 5A), after viral stimulation. The mean percentage of CD45RO<sup>High</sup>CD4<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> 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- $\alpha$  by CD4 effectors T cells that lost the selectin, CD62L, to those cells that appear to regain the marker. Expression levels of TNF- $\alpha$  on CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>neg</sup>

and CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>Low</sup> 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- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  by CD8<sup>+</sup> memory (CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) and lymph-node homing (CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) T cells**

Following the identification of CD8<sup>+</sup> T cells expressing lymph-node homing receptors and activations markers, we evaluated the intracytoplasmic expression of the effectors cytokines IFN- $\gamma$  and



**Fig. 4.** Intracellular IFN- $\gamma$  detection in CD4<sup>+</sup> 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- $\gamma$  cells. The percentages of CD4 + CD45RO + IFN- $\gamma$  + (A); CD4 + CD45RO<sup>High</sup>IFN- $\gamma$  + (B); CD4 + CD62L<sup>neg</sup>IFN- $\gamma$  + (C) and CD4 + CD62L<sup>Low</sup>IFN- $\gamma$  + 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.

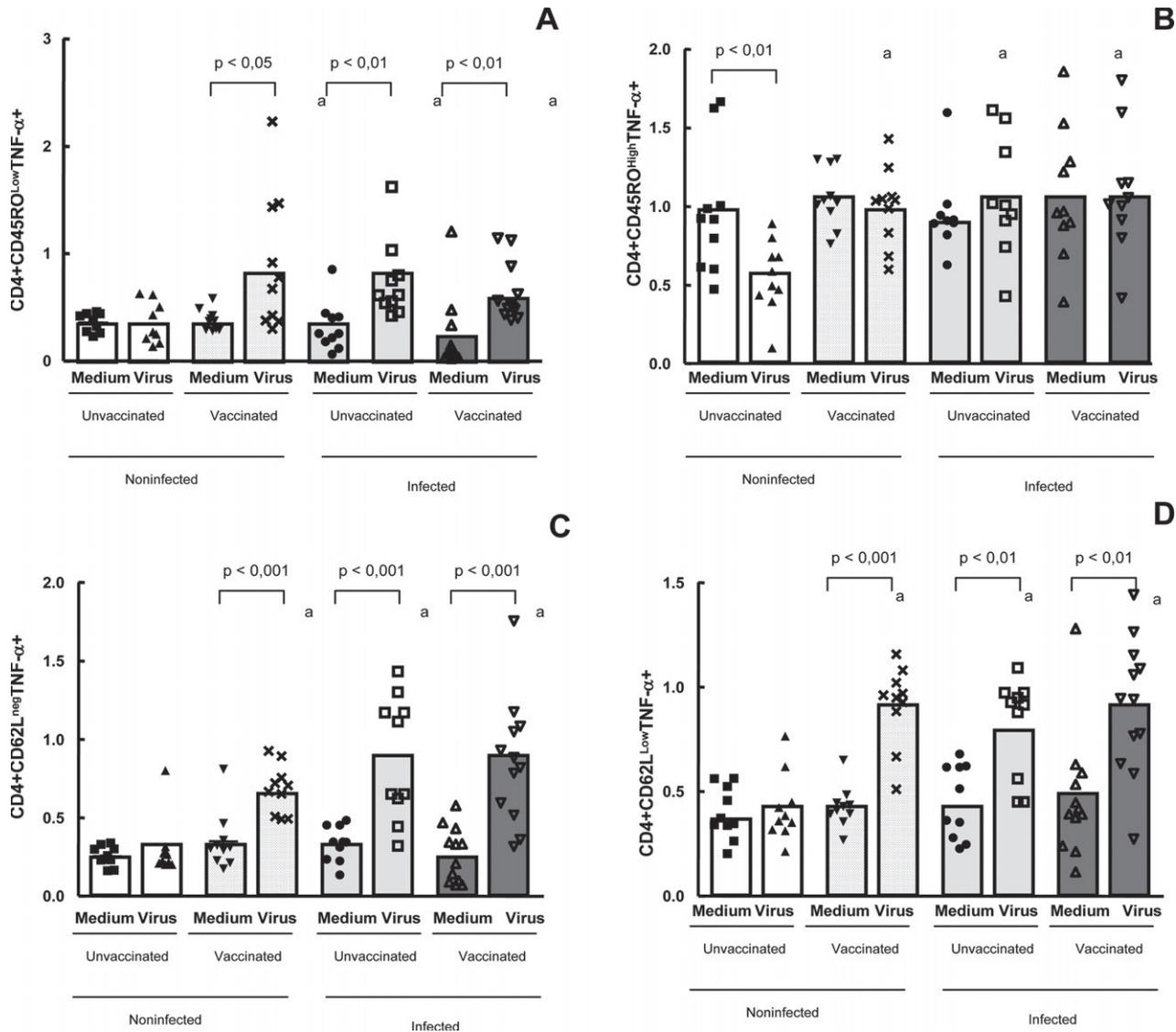
TNF- $\alpha$  by these cells, in the groups of non-infected and infected individuals (vaccinated and unvaccinated), after *in vitro* stimulation by UV-inactivated VACV.

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- $\gamma$  producing activated CD8<sup>+</sup> T cells (CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>Low</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>), after *in vitro* stimulation (Fig. 6A and B). Analysis of CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>High</sup> T cells expressing IFN- $\gamma$  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<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> expressing IFN- $\gamma$  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<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>High</sup> T cells expressing TNF- $\alpha$  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<sup>+</sup> activated cells showed that the CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> T effectors cells expressing TNF- $\alpha$  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<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> memory T cells was described following a natural *Vaccinia virus* infection and compared with the profile of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> 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

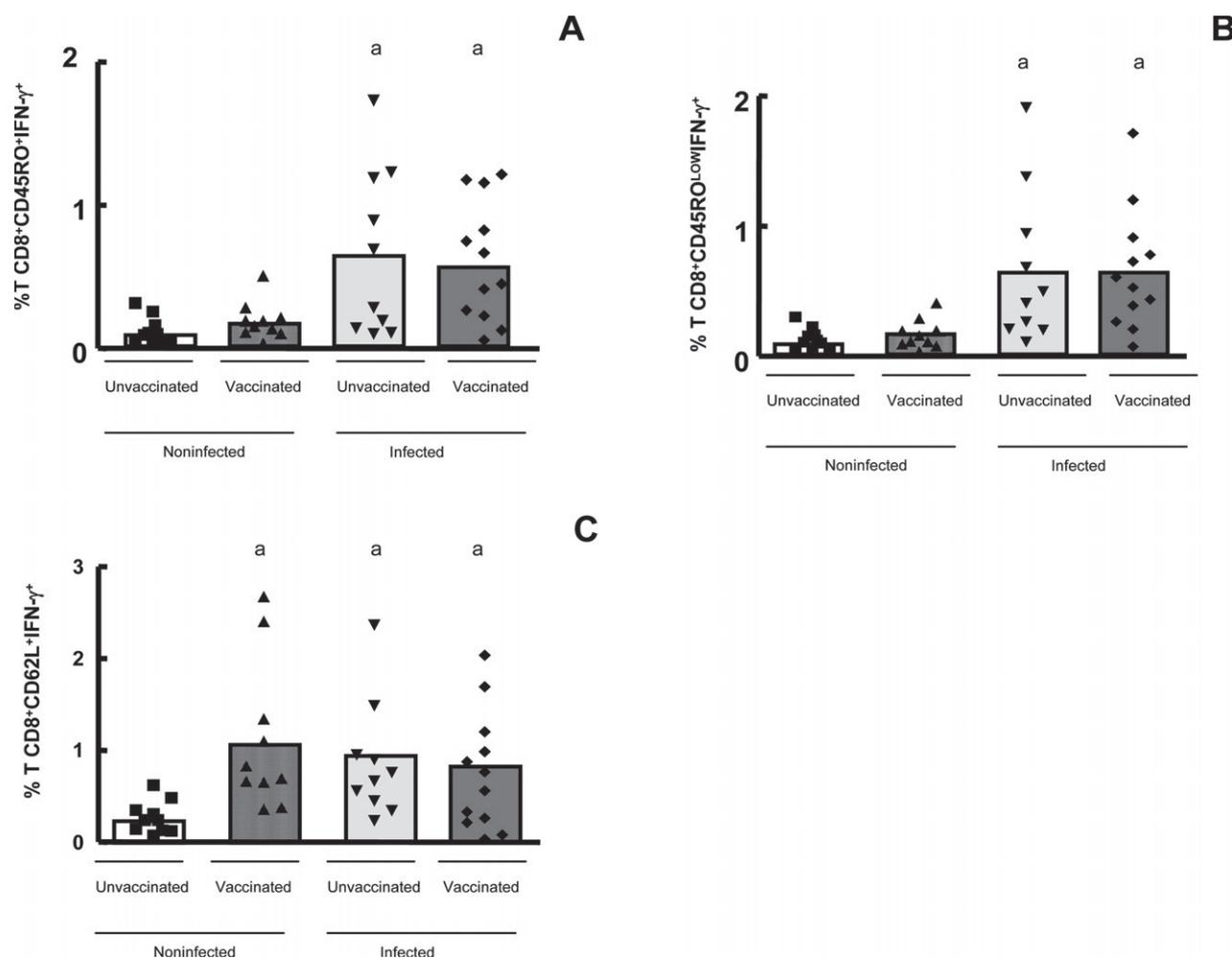


**Fig. 5.** Evaluation of CD4<sup>+</sup> TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> T memory cells, using intracellular staining in the whole blood cells from individuals previously infected or not by zoonotic *Vaccinia virus*. Whole blood cells from patients infected or not with zoonotic *Vaccinia virus* were stimulated 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- $\alpha$ <sup>+</sup> cells. The percentages of CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>low</sup> + TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> (A); CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> (B); CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>neg</sup> TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> (C) and CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> 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<sup>high</sup>) to describe the lymph-node homing capability and the effectors functions of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells. Several markers have been identified to allow for the differentiation of naive and memory T cells. Human naive cells are CD45RO<sup>-</sup>, CCR7<sup>+</sup> and CD62L<sup>high</sup> while memory cells (T<sub>EM</sub>) are CD45RO<sup>+</sup>, CCR7<sup>-</sup> and CD62L<sup>-</sup>. However, some

memory cells appear to regain CD62L and CCR7, especially T<sub>CM</sub> cells [17–22,28,29]. Here the CD4<sup>+</sup> T cell memory subsets were evaluated and the data indicated that infected individuals (vaccinated or not) have higher percentages of T memory cells (CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>) when compared to non-infected individuals (both vaccinated and unvaccinated). The percentage of CD4<sup>+</sup> T lymph-node homing T cells (CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) did not differ between the four groups analyzed. However, when we analyzed the CD8<sup>+</sup> T cells, our results showed that previously infected individuals (vaccinated or not) have higher percentage of CD8<sup>+</sup> naive and/or T<sub>CM</sub> cells (CD8<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) when compared with non-infected individuals (vaccinated and unvaccinated). It is also important to note is that these cells co-express IFN- $\gamma$ . Similarly, a recent study identified antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells with a central memory phenotype. These cells were CD44<sup>high</sup> and CD62L<sup>+</sup> virus-specific CD8<sup>+</sup> 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



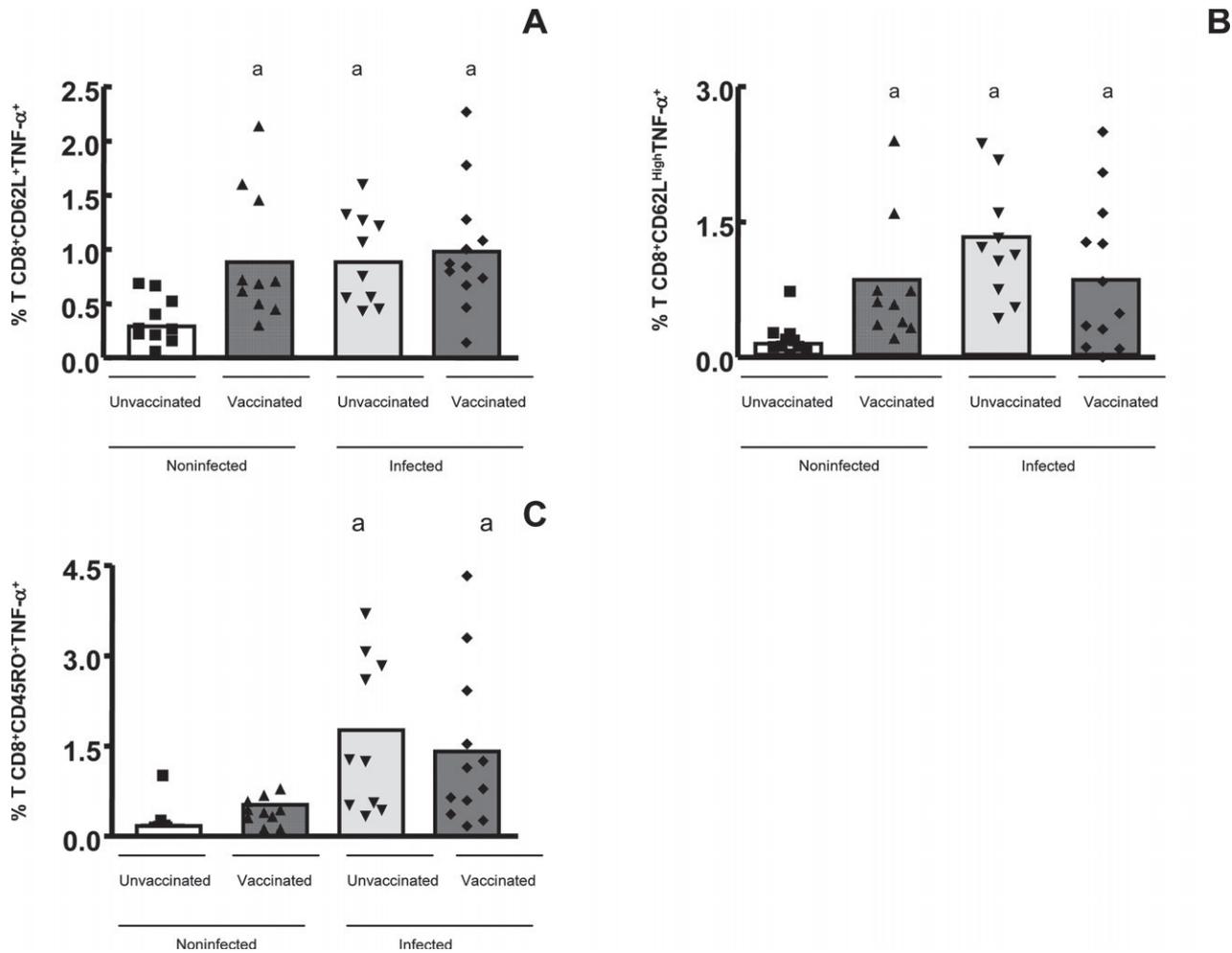
**Fig. 6.** Intracellular IFN- $\gamma$  detection in CD8<sup>+</sup> memory and naïve T cells in the whole blood cells from individuals previously infected or not by zoonotic *Vaccinia virus*, after viral stimulation. Whole blood cells from patients infected or not with zoonotic *Vaccinia virus* were 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- $\gamma$  cells. The percentages of CD8 + CD45RO + IFN- $\gamma$  + (A); CD8 + CD45RO<sup>Low</sup>IFN- $\gamma$  + (B); and CD8 + CD62L + IFN- $\gamma$  + (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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> effectors memory T cells, *in vitro* stimulation was performed with UV-inactivated VACV and intracellular cytokine staining to identify virus-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells that expressed either IFN- $\gamma$  or TNF- $\alpha$ . We observed that the percentage of CD4<sup>+</sup> T cells expressing IFN- $\gamma$  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- $\gamma$ -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<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ -producing T cells were composed of CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>Low</sup> and CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>High</sup>), CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>Low</sup> and CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> T cells. It was also detected that just the infected individuals (vaccinated and unvaccinated) presented higher percentages of CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>High</sup> T cells co-expressing IFN- $\gamma$ -which are the effector-memory T cells (T<sub>EM</sub>). In the non-infected individuals (vaccinated and unvaccinated), this increase

in the mean percentage of CD4 memory lymphocytes expressing IFN- $\gamma$  was not observed. Our data reinforce the idea that cellular memory to VACV predominantly involves CD4<sup>+</sup> Th1 IFN- $\gamma$  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<sup>+</sup> memory T cells (CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>High</sup>) 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<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> memory T cells expressing IFN- $\gamma$  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<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> memory cells expressing IFN- $\gamma$  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<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ -producing T cells were composed of CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>Low</sup>, and CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> T cells. These results suggest



**Fig. 7.** Intracellular TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> detection in CD8<sup>+</sup> 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- $\alpha$ <sup>+</sup> cells. The percentages of CD8 + CD62L + TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> (A); CD8 + CD62L<sup>Low</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> (B) and CD8 + CD45RO + TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> (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<sup>+</sup> T cells from individuals who were once exposed to *Vaccinia virus* (either by smallpox vaccination or *Vaccinia virus* infection) were able to produce TNF- $\alpha$ . Our data showed that the *Vaccinia*-specific TNF- $\alpha$  producing T cells were composed mainly of CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>Low</sup>, CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>Low</sup> and CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>Low</sup>. Other studies have already demonstrated that smallpox vaccination induces TNF- $\alpha$  expression by CD4<sup>+</sup> memory T cells [5,12]. Similar results were observed when CD8<sup>+</sup> T memory cells (CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>High</sup>) co-expressing TNF- $\alpha$  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<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> 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<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T memory

cells were expressing TNF- $\alpha$ . 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- $\alpha$  (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- $\alpha$ , 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<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T memory cells expressing IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> 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, Pazoles 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- $\gamma$ -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- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + 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.