



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA BÁSICA E APLICADA – LVBA

**KARINE LIMA LOURENÇO**

**CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS ZONÓTICOS DE *VACCINIA VIRUS* GUARANI P1 (GP1V) E PASSATEMPO (PSTV) E AVALIAÇÃO DE SUA CAPACIDADE EM MODULAR VIAS DE RESPOSTA DO HOSPEDEIRO À INFECÇÃO, *IN VIVO E IN VITRO***

Belo Horizonte

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICCB  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA BÁSICA E APLICADA – LVBA

**KARINE LIMA LOURENÇO**

**CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS ZOONÓTICOS DE *VACCINIA VIRUS* GUARANI P1 (GP1V) E PASSATEMPO (PSTV) E AVALIAÇÃO DE SUA CAPACIDADE EM MODULAR VIAS DE RESPOSTA DO HOSPEDEIRO À INFECÇÃO, *IN VIVO E IN VITRO***

Dissertação apresentada junto ao programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Doutor Flávio Guimarães da Fonseca

Belo Horizonte

2017

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais *Marisa* e *Pedro* por toda ajuda e compreensão. A minha filha *Letícia* por todo amor e carinho.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço minha mãe, Marisa, que cuidou de mim e da minha filha durante essa etapa tão importante da minha vida. Obrigada pelos conselhos, apoio, carinho e paciência. Sem você não seria possível.

Agradeço ao meu pai, Pedro, por ter me incentivado a correr atrás do sonho “mestrado” e por me dizer que eu conseguiria, incansavelmente.

Agradeço imensamente as minhas primeiras amigas do LVBA, Lethícia e Flávia, pelo cantinho na casa de vocês quando ainda não tínhamos o nosso cantinho. Obrigada pelo apoio, conselhos e amizade verdadeira, amo muito vocês duas.

Agradeço minha amiga linda de viver, Gaby, por ser quase uma mãe durante essa etapa, pela amizade, mensagens de carinho e por todas as risadas. Agradeço também ao meu amigo João pela amizade, cumplicidade e por fazer parte dos agregados da republica viralaté.

Agradeço ao Thiago por ser praticamente meu Co-orientador, por ter me em todos os experimentos, pelas ótimas e brilhantes ideias e principalmente pela paciência comigo.

Agradeço aos meus amigos do LVBA pela amizade, apoio, risadas e por toda auxílio durante desenvolvimento desse trabalho. Raíssa, além da ajuda fundamental durante os experimentos, obrigada por me transmitir paz. Iracema, obrigada pelas risadas altas no lab e por ter comemorado comigo as conquistas ao longo do mestrado. Silvinha, obrigada por me considerar sua amiga, pelo carinho e por me mostrar que: “temos mais quando dividimos algo com alguém”. Alice, obrigada pela ajuda nos experimentos e por ser um exemplo de trabalho bem feito. Victor (Victorleysonw) e Anderson por serem sempre tão fofos comigo. Sabrina, pelas conversas sempre tão engraçadas. Ângela, por ser sempre tão serena e conselheira.

Agradeço imensamente a MARAVILHOSA Tânia Mara, por todos os ensinamentos, conselhos e por puxar minha orelha quando eu precisava.

Agradeço a todos os professores do departamento de Microbiologia por todos os ensinamentos. Em especial, a professora Giliane Trindade por ter aceito, por duas vezes, fazer parte da banca examinadora desse trabalho. Agradeço também ao Dr. Pedro Augusto Alves por ter aceito fazer parte da banca desse trabalho, pelo seu tempo e ótimas contribuições que com certeza virão.

Agradeço a professora Edel Stancioli, por me acompanhar desde a especialização, pelo carinho, confiança e pelas contribuições para esse trabalho. Você é uma grande inspiração.

De todo coração agradeço o professor Flávio por me aceitar a quatro anos atrás como aluna, sem nem mesmo me conhecer. Obrigada pelos ensinamentos, paciência e carinho. Eu tenho muito orgulho de ser sua aluna, falo de boca cheia que tenho o melhor orientador do mundo.

Finalmente, agradeço ao grande amor da minha vida, Letícia. Obrigada por entender minha ausência durante o mestrado e por sempre me receber com um abraço enorme e cheio de beijinhos. Obrigada por ter dado sentido a minha vida, você é minha força, meu alicerce... Eu amo você mais do que tudo nesse mundo.

## RESUMO

A família *Poxviridae* possui representantes mundialmente conhecidos que infectam uma gama de hospedeiros vertebrados e invertebrados, incluindo os seres humanos. Os poxvírus são divididos em duas subfamílias, a *Entomopoxvirinae*, a qual inclui os poxvírus que infectam insetos, e a *Chordopoxvirinae*, que compreende os poxvírus que infectam vertebrados. A subfamília *Chordopoxvirinae* possui doze gêneros atualmente, e o gênero *Orthopoxvirus* está entre os mais estudados. Estima-se que membros do gênero *Orthopoxvirus* circulem no ambiente silvestre Brasileiro há várias décadas ou mais. Desde 1999 o *Vaccinia virus* (VACV) tem sido relacionado a surtos envolvendo seres humanos e bovinos, equinos e outros animais. A partir de diversos estudos realizados por pesquisadores brasileiros, os isolados de VACV foram divididos em dois grupos: grupo 1 (menos virulento em modelos de infecção murina), grupo 2 (mais virulento em modelos de infecção murina). Essa divisão reflete propriedades biológicas dos isolados, como virulência em camundongos BALB/c, em diversas categorias de genes que atuam como marcadores dos grupos, infectividade em células BSC-40 e presença ou ausência de uma deleção de 18 nucleotídeos no gene codificador da proteína hemaglutinina viral (HA ou A26R). Nesse trabalho, foi investigado o perfil biológico em cultivo celular além do perfil patogênico em camundongos Balb/c, respectivamente, dos isolados de VACV Brasileiros *Guarani PI virus* (GP1V) e *Passatempo virus* (PSTV), em comparação com VACV *Western Reserve* (VACV-WR). Especificamente, analisamos a capacidade dos isolados GP1V e PSTV em modular a resposta às proteínas mal-formadas (UPR) no retículo endoplasmático de células infectadas. Avaliamos também aspectos patogênicos destas amostras - tais como seu tropismo tecidual - e o perfil de proteção sorológica e cruzada dos isolados induzida pela infecção em camundongos Balb/c a partir da produção de anticorpos neutralizantes cruzados. Concluindo, GP1V apresenta um perfil de virulência semelhante ao WR, enquanto o PSTV exibe um perfil mais moderado.

## ABSTRACT

The family *Poxviridae* has notorious members known in the whole world due to their capacity of infect a great variety of hosts, vertebrates and invertebrates, including humans. Poxviruses are divided into two subfamilies: *Entomopoxvirinae*, which includes poxviruses that infect insects, and *Chordopoxvirinae*, that contains poxviruses that infect vertebrates. The subfamily *Chordopoxvirinae* has twelve genera, and the *Orthopoxvirus* stands out among the most studied. It is estimated that members of the genus *Orthopoxvirus* circulate in the Brazilian wild environment for several decades or even more. Since 1999, the *Vaccinia virus* (VACV) has been associated to outbreaks involving humans and cattle, horses and other animals. Based on several studies conducted by Brazilian researchers, VACV isolates were separated into two groups: group 1 (less virulent in murine infection models) and group 2 (more virulent in murine infection models). This classification is due to biological properties of the isolates, such as virulence in BALB/c mice, infectivity in BSC-40 cells and presence or absence of a 18 nucleotide deletion in the gene encoding the viral hemagglutinin (HA or A26R) protein. In this project, the pathogenic profile in cell culture and in Balb/c mice, respectively, of the Brazilian isolates of VACV *Guarani P1 virus* (GP1V) and *Passatempo virus* (PSTV) were investigated, compared to VACV *Western Reserve* (VACV-WR). Precisely, we analysed the ability of GP1V and PSTV isolates to modulate the response to unfolded proteins (UPR) in the endoplasmic reticulum of infected cells. We also evaluated pathogenic aspects of these samples – such as their organic tropism – and the serologic and cross-protection profiles of the isolates induced by infection in Balb/c mice from the production of cross-neutralizing antibodies. In conclusion, GP1V has a virulence profile similar to WR, while PSTV exhibits a more moderate profile.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Morfologia do vírion dos <i>Poxvírus</i> .....	3
<b>Figura 2:</b> Genoma dos <i>Chordopoxvírus</i> .....	5
<b>Figura 3:</b> Penetração de IMV e EEV na célula.....	7
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos poxvírus .....	9
<b>Figura 5:</b> Lesões em humanos por MURV .....	12
<b>Figura 6:</b> Lesões provocadas por PSTV .....	14
<b>Figura 7:</b> Sinais clínicos de camundongos infectados com VACV-BR .....	20
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática das proteínas imunomoduladoras.....	23
<b>Figura 9:</b> Esquema de inoculação em camundongos Balb/c .....	36
<b>Figura 10:</b> Curva de ciclo único dos vírus PSTV, GP1V e WR .....	40
<b>Figura 11:</b> Curva de múltiplos ciclos dos vírus PSTV, GP1V e WR.....	41
<b>Figura 12:</b> Ensaio de fenótipo de placa.....	42
<b>Figura 13:</b> Inoculação intranasal.....	44
<b>Figura 14:</b> Sinais clínicos apresentados pelos camundongos Balb/c infectados com PSTV .....	45
<b>Figura 15:</b> Variação de peso dos camundongos Balb/c infectados com PSTV em comparação com animais inoculados com PBS .....	46
<b>Figura 16:</b> Sinais clínicos apresentados pelos camundongos Balb/c infectados com GP1V .....	47
<b>Figura 17:</b> Variação de peso dos camundongos Balb/c infectados com GP1V em comparação com animais inoculados com PBS .....	47
<b>Figura 18:</b> Sinais clínicos apresentados pelos camundongos Balb/c infectados com WR .....	48
<b>Figura 19:</b> Variação de peso dos camundongos Balb/c infectados com WR em comparação com animais inoculados com PBS .....	49
<b>Figura 20:</b> Variação de peso dos camundongos Balb/c infectados com os vírus GP1V, PSTV e WR .....	50
<b>Figura 21:</b> Escore clínico dos animais infectados com GP1V, PSTV e WR.....	51

<b>Figura 22:</b> Quantificação do número e cópias de DNA dos vírus GP1V, PSTV e WR no pulmão dos camundongos Balb/c .....	52
<b>Figura 23:</b> Quantificação do número e cópias de DNA dos vírus GP1V, PSTV e WR no baço dos camundongos Balb/c .....	53
<b>Figura 24:</b> Quantificação do número e cópias de DNA dos vírus GP1V, PSTV e WR no cérebro dos camundongos Balb/c .....	54
<b>Figura 25:</b> Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA (PCR-RFLP) de células infectadas com os VACV .....	55
<b>Figura 26:</b> Ensaio de soroneutralização e proteção cruzada soro WR frente aos vírus GP1V, PSTV e WR .....	57
<b>Figura 27:</b> Ensaio de soroneutralização e proteção cruzada soro GP1V frente aos vírus GP1V, PSTV e WR .....	58
<b>Figura 28:</b> Ensaio de soroneutralização e proteção cruzada soro PSTV frente aos vírus GP1V, PSTV e WR .....	59

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Classificação dos VAVCs isolados no Brasil de acordo com o grupo filogenético .....	18
<b>TABELA 2</b> - Soros e vírus testados no ensaio de soroneutralização e proteção cruzada .....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ARAV</b>	<i>Araçatuba vírus</i>
<b>ADCC</b>	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
<b>ATF6</b>	<i>Activating Transcription Factor 6</i>
<b>BAV</b>	<i>Vírus Bean 58058</i>
<b>BiP</b>	<i>Binding immunoglobulin protein</i>
<b>BSC-40</b>	Células epiteliais de rins de macaco verde africano
<b>CTGV</b>	<i>Cantagalo virus</i>
<b>CEF</b>	Fibroblasto de embrião de galinha
<b>CEVs</b>	Vírus envelopados célula-associados
<b>CFSE</b>	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
<b>CMLV</b>	<i>Camelpox virus</i>
<b>COTV</b>	<i>Cotia virus</i>
<b>CPXV</b>	<i>Cowpox virus</i>
<b>DEMEM</b>	Meio Eagle Modificado por Dulbeco
<b>ECP</b>	Efeito Citopático
<b>ECTV</b>	<i>Ectromelia virus</i>
<b>EEV</b>	Vírião envelopado extracelular
<b>GIF</b>	Fator de inibição do fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos
<b>GM-CSF</b>	Fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos
<b>GP1V</b>	<i>Guarani P1 virus</i>
<b>GP2V</b>	<i>Guarani P2 virus</i>
<i>ha</i>	Gene da Hemaglutinina
<b>ICE</b>	Enzima conversora de IL-1
<b>IEV</b>	Vírus envelopado intracelular
<b>IFN</b>	Interferon(s)
<b>IL</b>	Interleucina

<b>IMV</b>	Vírus maduro intracelular
<b>i.n.</b>	Inoculação Intranasal
<b>IRE-1<math>\alpha</math></b>	Proteína Cinase Dependente de Inositol
<b>ITRs</b>	Regiões terminais invertidas
<b>IV</b>	Vírus imaturo
<b>LTC</b>	Linfócito T citotóxico
<b>MAC</b>	Complexo de ataque à membrana
<b>MARV</b>	<i>Mariana virus</i>
<b>MEM</b>	Meio mínimo de Eagle
<b>MCV</b>	<i>Molluscum contagiosum virus</i>
<b>MFF</b>	Macs Facs Fix
<b>MHC</b>	Complexo principal de histocompatibilidade
<b>MOI</b>	Multiplicidade de infecção
<b>MPXV</b>	<i>Monkeypox virus</i>
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>MRV</b>	<i>Maranhão virus</i>
<b>MURV</b>	<i>Muriae virus</i>
<b>MV</b>	<i>Myxoma virus</i>
<b>NK</b>	Natural killer
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>ORF</b>	Fases abertas de leitura
<b>PARV</b>	<i>Pará virus</i>
<b>PBMCs</b>	Células mononucleares do sangue periférico
<b>PBS</b>	Solução Salina Tamponada com Fosfato
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PFU</b>	Unidades formadoras de placa
<b>PKR</b>	<i>Protein kinase R</i>
<b>PSTV</b>	<i>Passatempo vírus</i>
<b>P1V</b>	<i>Pelotas 1 virus</i>
<b>P2V</b>	<i>Pelotas 2 virus</i>

<b>RCNV</b>	<i>Raccoonpox virus</i>
<b>RE</b>	Reticulo endoplasmático
<b>RFLP</b>	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição
<b>RPMI</b>	Meio Instituto Roswell Park Memorial
<b>SAV</b>	<i>SPAN232 virus</i>
<b>s.c</b>	Subcutânea
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SKPV</b>	<i>Skunkpox virus</i>
<b>SFV</b>	<i>Shope fibroma virus</i>
<b>TATV</b>	<i>Taterapox virus</i>
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>UPR</b>	<i>Unfolded Protein Response</i>
<b>VCP</b>	Proteína de controle do complemento de <i>Vaccinia virus</i>
<b>VACV</b>	<i>Vaccinia virus</i>
<b>VACV-IOC</b>	<i>Vaccinia virus Instituto Oswaldo Cruz</i>
<b>VPXV</b>	<i>Volepox virus</i>
<b>VARV</b>	<i>Variola virus</i>
<b>VACV-WR</b>	<i>Vaccinia virus Western Reserve</i>
<b>vIFN<math>\gamma</math>R</b>	Proteínas homólogas do receptor de IFN $\gamma$
<b>vIL-10</b>	Proteína viral homóloga ao IL-10
<b>vIL-18BP</b>	Proteína viral de ligação a IL-18
<b>vTNFR</b>	Receptor viral do fator de necrose tumoral
<b>VIL-1R</b>	Receptor viral de interleucina 1
<b>VACV-WR</b>	<i>Vaccinia virus</i> amostra Western Reserve
<b>XBP-1</b>	<i>X-box binding protein 1</i>

## UNIDADES DE MEDIDAS

<b>%</b>	Porcentagem
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>Da, kDa</b>	Dalton, Quilodalton
<b>g</b>	Aceleração da gravidade
<b>h, min, s</b>	Horas, minutos, segundos
<b>pb, kb</b>	Pares de base, quilobases
<b>L, mL, µL</b>	L, mL, µL- Litro, mililitro, microlitro
<b>m, cm, mm, nm, µm</b>	Metro, centímetro, milímetro, nanômetro, micrômetro
<b>M, mM</b>	Molar, milimolar
<b>psi</b>	Pressão (do inglês <i>pound force per square inch</i> )
<b>V</b>	Volts

# Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 Família <i>Poxviridae</i> .....	1
1.2 Biologia dos <i>Poxvírus</i> .....	3
1.2.1 Morfologia.....	3
1.2.2 Genoma .....	4
1.2.3 Multiplicação .....	5
1.3 Vírus Vaccinia isolados no Brasil .....	10
1.4 Infecção VACV em Modelo Murino.....	19
1.5 Resposta imune a poxvírus .....	21
1.5.1 Imunomodulação por poxvírus.....	22
1.5.2 Imunomodulação pelos vírus GP1V e PSTV .....	24
1.6 Estresse do Retículo Endoplasmático .....	25
<b>2-JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>28</b>
<b>3-OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
3.1 Objetivo geral .....	30
3.2 Objetivos específicos .....	30
<b>4-METODOLOGIA</b> .....	<b>31</b>
4.1 Estratégia de trabalho.....	31
4.2 Produção das amostras trabalho .....	32
4.2.1 Origem das amostras .....	32
4.2.2 Multiplicação viral .....	32
4.2.3 Purificação viral.....	33
4.2.4 Titulação Viral.....	33
4.2.5 Fenótipo de placa .....	34
4.3 Caracterização <i>in vitro</i> das amostras virais purificadas .....	34
4.3.1 Curva de crescimento de ciclo único .....	34
4.3.2 Curva de crescimento em múltiplos ciclos.....	35
4.4 Avaliação da infecção de camundongos BALB/c por VACV-WR, GP1V e PSTV.....	36
4.4.1 Infecção de camundongos BALB/ c com os vírus VACV-WR, GP1V e PSTV .....	36
4.5 Avaliação do tropismo sistêmico dos vírus VACV-WR, GP1V e PSTV em camundongos BALB/c .....	38
4.5.1 Processamento dos órgãos e extração de DNA .....	38
4.5.2 PCR em tempo real.....	38

<b>4.6 Avaliação da resposta humoral aguda de camundongos BALB/C frente à infecção por VACV-WR, GP1V e PSTV.....</b>	<b>39</b>
<i>4.6.1 Ensaio de soroneutralização.....</i>	<i>39</i>
<b>4.8 Avaliação da modulação de vias de estresse do retículo citoplasmático.....</b>	<b>39</b>
<i>4.8.1 Extração do RNA total e síntese de cDNA .....</i>	<i>39</i>
<i>4.8.2 Análise do processamento de XBPI .....</i>	<i>40</i>
<b>5 – RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1 Caracterização Biológica .....</b>	<b>41</b>
<b>5.1.1 Curva de crescimento de ciclo único.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1.2 Curva de crescimento em múltiplos ciclos .....</b>	<b>42</b>
<b>5.1.3 Fenótipo de placa.....</b>	<b>43</b>
<b>5.2 - Avaliação da infecção de camundongos BALB/c por VACV-WR, GP1V e PSTV ....</b>	<b>43</b>
<b>5.2.2 Sinais clínicos observados nos de camundongos BALB/c inoculados com GP1V .....</b>	<b>44</b>
<b>5.2.1 Sinais clínicos observados nos de camundongos BALB/c inoculados com PSTV.....</b>	<b>46</b>
<b>5.2.3 Sinais clínicos observados nos de camundongos BALB/c inoculados com WR.....</b>	<b>48</b>
<b>5.2.4 Avaliação de escore clínico .....</b>	<b>50</b>
<b>5.3 Avaliação do tropismo sistêmico dos vírus VACV-WR, GP1V e PSTV em camundongos BALB/c .....</b>	<b>51</b>
<b>5.3.1 Avaliação do tropismo viral no pulmão .....</b>	<b>52</b>
<b>5.3.2 Avaliação do tropismo viral no baço .....</b>	<b>53</b>
<b>5.3.3 Avaliação do tropismo viral no cérebro .....</b>	<b>53</b>
<b>5.3.4 Avaliação do tropismo viral no intestino.....</b>	<b>54</b>
<b>5.4 Avaliação da modulação de vias de estresse do retículo citoplasmático.....</b>	<b>54</b>
<b>5.4.1 Análise do processamento do fator de transcrição XBP-1.....</b>	<b>54</b>
<b>5.5 Avaliação da resposta humoral aguda de camundongos BALB/C frente à infecção por VACV-WR, GP1V e PSTV.....</b>	<b>55</b>
<b>5.5.1 Ensaio de soroneutralização e proteção cruzada.....</b>	<b>56</b>
<b>6 – DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>7 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>66</b>
<b>7 - REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Família *Poxviridae*

A família *Poxviridae* possui representantes mundialmente conhecidos que infectam uma gama de animais vertebrados e invertebrados, incluindo os seres humanos. O *Variola virus* (VARV), membro da família *Poxviridae*, que tem o homem como seu único hospedeiro natural, tornou-se notável por ter sido um dos agentes patogênicos mais impactantes para a humanidade até ser declarado erradicado, em dezembro de 1979, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), fato esse tido como um dos mais importantes feitos da medicina humana (WHO, 1979).

No século XVIII o *Cowpox virus* (CPXV), outro integrante da família *Poxviridae*, acometia frequentemente o gado, provocando pústulas e vesículas nos tetos das vacas e nas mãos dos ordenhadores. Esses sinais desapareciam espontaneamente, contudo o mais interessante era a proteção contra a varíola humana após a infecção pelo CPXV (FILHO, 1991).

A vacina contra varíola estimulava proteção imunológica adequada, contudo foram descritos muitos casos de manifestações da doença em função da vacinação, acarretando na suspensão da campanha de vacinação, após erradicação da varíola (PARRINO & GRAHAM, 2006). A OMS por várias vezes debateu a destruição dos dois estoques oficiais do VARV, um presente nos Estados Unidos e o outro na Rússia. A possibilidade de estoques ocultos do vírus em outros lugares também é plausível, principalmente pelo fato do vírus ser considerado uma possível arma de bioterrorismo (REARDON, 2014).

Em relação à sua estrutura, os poxvírus dispõem de uma partícula viral comparativamente grande de 220-450 nm de comprimento e 140-260 nm de largura. A partícula abriga material genético de DNA linear ligado covalentemente nas extremidades, dupla-fita, que contém de 130-375kbe possui regiões terminais invertidas (ITRs) de tamanho variável 0,1-12,4kb que flanqueiam as extremidades do genoma com sequências idênticas em ambas as extremidades (HALLER *et al.*, 2014;). O genoma dos poxvírus codifica mais de 150

genes, 90 destes são comuns em todos os *Chordopoxvirus* (subfamília da família *Poxviridae*) e estão relacionados a funções essenciais como replicação, transcrição e montagem dos vírions. Muitos genes dos poxvírus codificam proteínas capazes de reduzir a resposta antiviral do hospedeiro como processos de reconhecimento e apresentação de antígeno, apoptose, produção de interferon (IFN) e processos de sinalização (LEFKOWITZ *et al.*, 2006).

A família *Poxviridae* é dividida em duas subfamílias; a *Entomopoxvirinae* possui representantes que infectam insetos e a *Chordopoxvirinae* compreende os poxvírus que infectam vertebrados (MOSS, 2013). A subfamília *Entomopoxvirinae* é composta por três gêneros: *Alphaentomopoxvirus* (7 espécies), *Betaentomopoxvirus* (13 espécies) e *Gammaentomopoxvirus* (6 espécies); possivelmente mais um gênero será formado para contemplar as espécies *Diachasmimorpha entomopoxvirus* e *Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus*. Atualmente a subfamília *Chordopoxvirinae* possui doze gêneros: *Avipoxvirus* (10 espécies), *Capripoxvirus* (3 espécies), *Centapoxvirus* (1 espécie), *Cervidpoxvirus* (1 espécie), *Crocodylipoxvirus* (1 espécie), *Leporipoxvirus* (4 espécies), *Molluscipoxvirus* (1 espécie), *Orthopoxvirus* (10 espécies), *Parapoxvirus* (4 espécies), *Suipoxvirus* (1 espécie) e *Yatapoxvirus* (2 espécies); as espécies *Pteropox virus* e *Squirrelpox virus* ainda permanecem sem gênero definido.

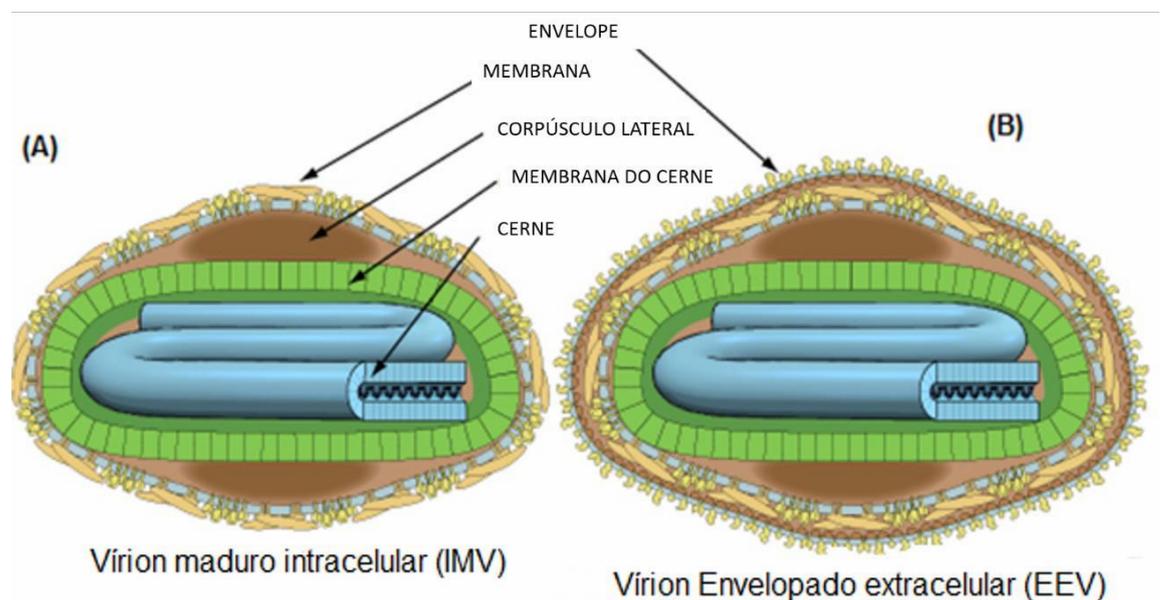
Os representantes da subfamília *Chordopoxvirinae* tem capacidade de infectar uma variedade de hospedeiros, e um determinado vírus pode ter amplo espectro de hospedeiros: a exemplo do *Cowpox virus* do gênero *Orthopoxvirus* que é capaz de infectar gatos, gado, roedores, felinos e o ser humano (MARSCHANG, 2011; MOSS, 2013; HALLER *et al.*, 2014; ICTV, 2016).

Os integrantes do gênero *Orthopoxvirus* estão entre os mais estudados e intimamente relacionados a ponto de sua infecção resultar em reatividade imunológica cruzada e proteção contra infecções recorrentes de indivíduos por vírus do mesmo gênero. Alguns *Orthopoxvirus* possuem genoma totalmente sequenciado o que facilita a compreensão em relação à evolução dos vírus do gênero, sendo eles o VARV, CPXV, *Vaccinia virus* (VACV), *Ectromelia virus* (ECTV), *Monkeypox virus* (MPXV), *Camelpox virus* (CMLV) e *Taterapox virus* (TATV). O genoma dos vírus *Raccoonpox virus* (RCNV), *Volepox virus* (VPXV) e *Skunkpox virus* (SKPV) ainda não foram totalmente sequenciados (HALLER *et al.*, 2014).

## 1.2 Biologia dos *Poxvírus*

### 1.2.1 Morfologia

As partículas virais dos *Poxvírus* são grandes quando comparada a partículas de outros vírus que infectam animais e apresentam morfologia em forma de tijolo quando observados por microscopia eletrônica (ICTV, 2006). Os vírions dispõem de uma membrana lipídica contendo proteínas tubulares e arranjo irregular ou de forma helicoidal, que permitem a fixação e fusão com a membrana plasmática ou vesículas endocíticas. Possuem também dois corpúsculos laterais, responsáveis por transportar proteínas importantes que atuam antes da expressão de genes virais (SCHMIDT, BLECK, *et al.*, 2013). Envolto por uma fina membrana, o cerne possui formato bicôncavo e envolve o material genético, proteínas estruturais do vírus, RNA-polimerase - dependente de DNA e fatores de transcrição de genes precoces (**figura 1**) (MOSS, 2005; ICTV, 2006; MOSS, 2013).



**Figura 1: Morfologia do vírion dos *Poxvírus*.** Representação esquemática do vírion maduro intracelular (IMV) (A) e vírion envelopado extracelular (EEV) (B).

Fonte: adaptado de ViralZone, 2014.

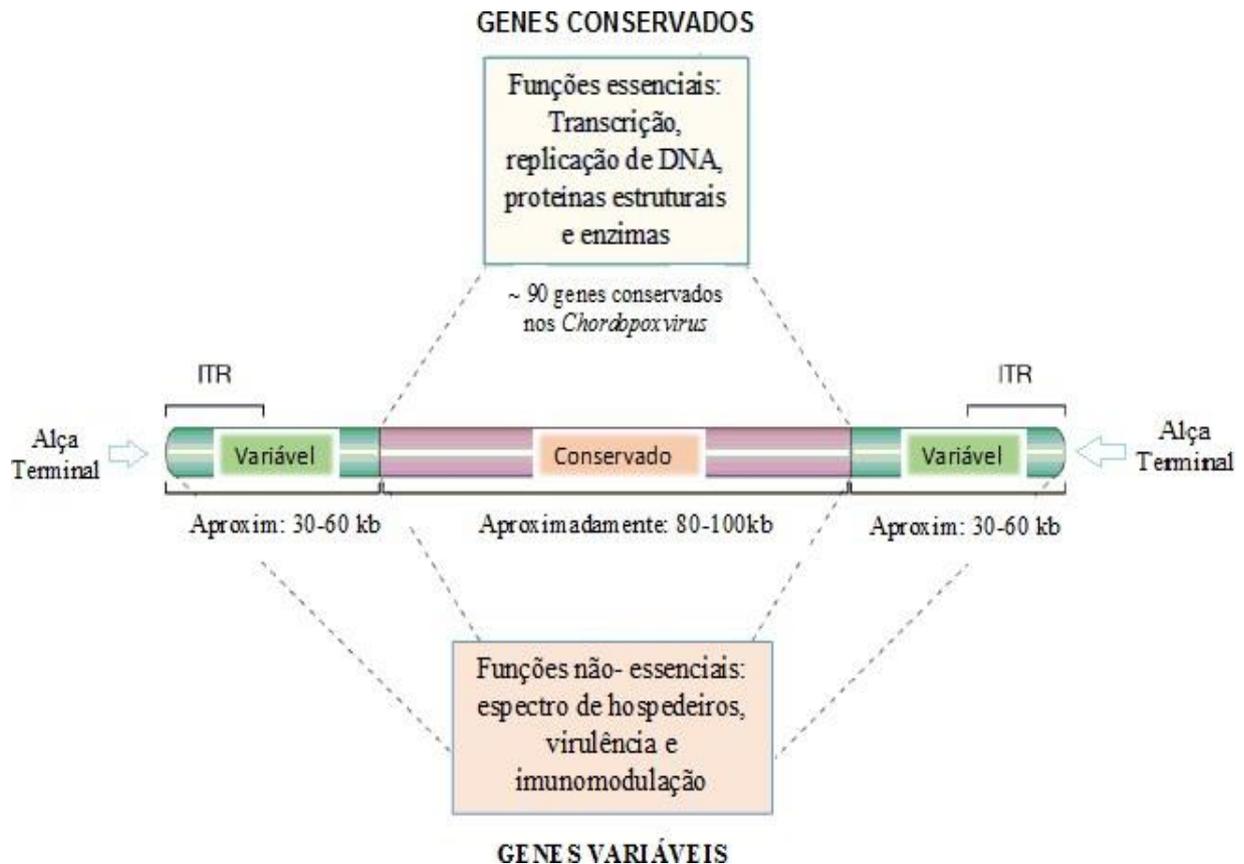
### 1.2.2 Genoma

O genoma dos poxvírus é composto por uma dupla fita de DNA que alterna de 140 kpb em *Parapoxvirus* a 300 kpb em *Avipoxvirus*. As extremidades da fita são ligadas covalentemente gerando terminações em forma de grampo. As ITRs são ricas em Adenina (A) + Timina (T) com sequências idênticas que margeiam as extremidades opostas do genoma apresentando tamanho variado de 0,1 a 12,4 kb devido a deleções, repetições e transposições (**figura 2**) (LEFKOWITZ *et al.*, 2006; MOSS, 2013 HALLER *et al.*, 2014).

A comparação de 26 poxvírus sequenciados, revela que, 90 genes são conservados em todos os *Chordopoxvirus* e 49 genes conservados em todos os poxvírus. Os genes conservados em *Chordopoxvirus* encontram-se na região central do genoma e grande parte deles não são genes sobrepostos, ou seja, o fragmento possui informação para um único gene (GUBSER *et al.*, 2004; MOSS, 2013). Esses genes são importantes para os processos de transcrição, processamento de RNA, replicação e montagem do vírion. Geralmente, no genoma dos poxvírus, os genes tendem a estar organizados em grupos que são transcritos no mesmo sentido, possivelmente para diminuir as colisões entre complexos de transcrição (LEFKOWITZ *et al.*, 2006).

Os genes que estão envolvidos na interação com o hospedeiro geralmente estão dispostos nas regiões terminais do genoma. Muitos deles são dispensáveis para a replicação do vírus em cultura celular, e quando os vírus são modificados para que não expressem esses genes apresentam-se atenuados em modelos de infecção. É possível inferir, portanto que tais genes estão associados à virulência (LEFKOWITZ *et al.*, 2006; HALLER *et al.*, 2014;). Boa parte desses genes codificam proteínas que reduzem o estado antiviral do hospedeiro tais como processos de apoptose, apresentação de antígeno e ferramentas de sinalização imune (LEFKOWITZ *et al.*, 2006).

O genoma de VACV tem aproximadamente 200kbp, 200 Fases abertas de leitura (ORFs) e codifica cerca de 200 proteínas. As ORFs são espaçadas e reguladas temporalmente, enquanto os mRNAs da fase precoce, intermediária e tardia podem ser detectados 20, 100 e 140 minutos respectivamente após a infecção de células HeLa, permitindo um mecanismo de cascata de regulação (BALDICK & MOSS, 1993).



**Figura 2 - Genoma dos *Chordopoxvirus*:** Representação esquemática da organização genômica dos *Chordopoxvirus*, a região central apresenta genes altamente conservados que codificam proteínas com funções essenciais. As regiões ITR codificam proteínas não-essenciais. Fonte: adaptado de SMITH & MCFADDEN, 2002

### 1.2.3 Multiplicação viral

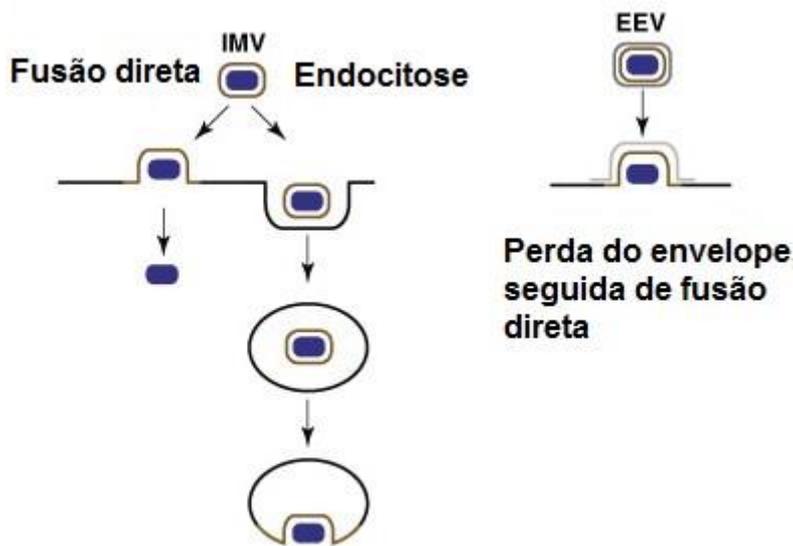
Os poxvírus, diferente de outros vírus de DNA, replicam-se no citoplasma de células hospedeiras de vertebrados e invertebrados. Há formação no citoplasma de estruturas denominadas fábricas virais, cercadas por membranas derivadas do retículo endoplasmático rugoso, onde ocorre a replicação do DNA, normalmente 2 horas após a infecção (SCHRAMM & LOCKER, 2005; MOSS, 2013).

A multiplicação viral dos *Orthopoxvirus* é bem compreendida a partir de estudos sobre o VACV, o membro melhor caracterizado e modelo da explanação desse tópico. Dois tipos de partículas infecciosas são produzidos por VACV, vírions envelopados

extracelulares (EEVs) e vírions maduros intracelulares (IMVs) (**figura 3**), quando íntegras não compartilham epítomos de superfície iguais. Os IMVs possuem uma bicamada lipídica contendo ao menos 25 proteínas virais e são produzidos em maior quantidade quando em comparação com EEVs, intervindo na transmissão hospedeiro-hospedeiro. Os EEVs são semelhantes aos IMVs, porém envolvidos por uma segunda membrana viral contendo pelo menos seis proteínas virais exclusivas, mediando a propagação do vírus célula a célula. Além disso EEV apresenta maior resistência ao complemento que IMV na ausência de anticorpos específicos. (VANDERPLASSCHEN *et al.*, 1998; SMITH & MCFADDEN, 2002; MCFADDEN, 2005; MOSS, 2013).

IMVs podem entrar na célula através de fusão com a membrana plasmática ou endocitose, permitindo assim que o vírus entre no citoplasma e o processo de replicação. São necessárias três etapas para a entrada do vírus: adsorção do vírus, ativação das proteínas de fusão e fusão da membrana. Proteínas de membrana de IMV se ligam a glicosaminoglicanos de superfície celular e laminina para facilitar a ligação do vírion. A proteína D8 se liga ao sulfato de condroitina, A27 e H3, ao sulfato de heparano e A26, à laminina. As proteínas A21, A28, H2 e L5 também são necessárias na entrada de IMVs e são conservadas em todos os poxvírus sequenciados; a falta de qualquer uma dessas proteínas resulta em partículas não-infecciosas. Ademais, imagina-se que esse mesmo grupo de proteínas de entrada seja necessário para a fusão célula a célula induzida pelo vírus (MOSS 2005; MOSS, 2013). Embora receptores celulares específicos para IMVs ainda não tenham sido identificados, um estudo realizado por CHUNG, HUANG e CHANG, 2005 mostrou que a depleção do colesterol presente na membrana plasmática inibe a entrada de IMVs sugerindo então um papel importante desse componente.

EEV penetra na célula por fusão direta, o que é precedido pela perda do envelope quando em contato com a célula. A eficiência dos EEVs em promover a disseminação célula a célula está relacionada com a aderência na superfície da célula mediado por projeções formadas por actina nas quais EEVs se envolvem, o que é demonstrado quando a supressão de genes relacionados com a formação de actina leva à redução da eficiência na propagação do vírus (MOSS 2005; MOSS, 2013).

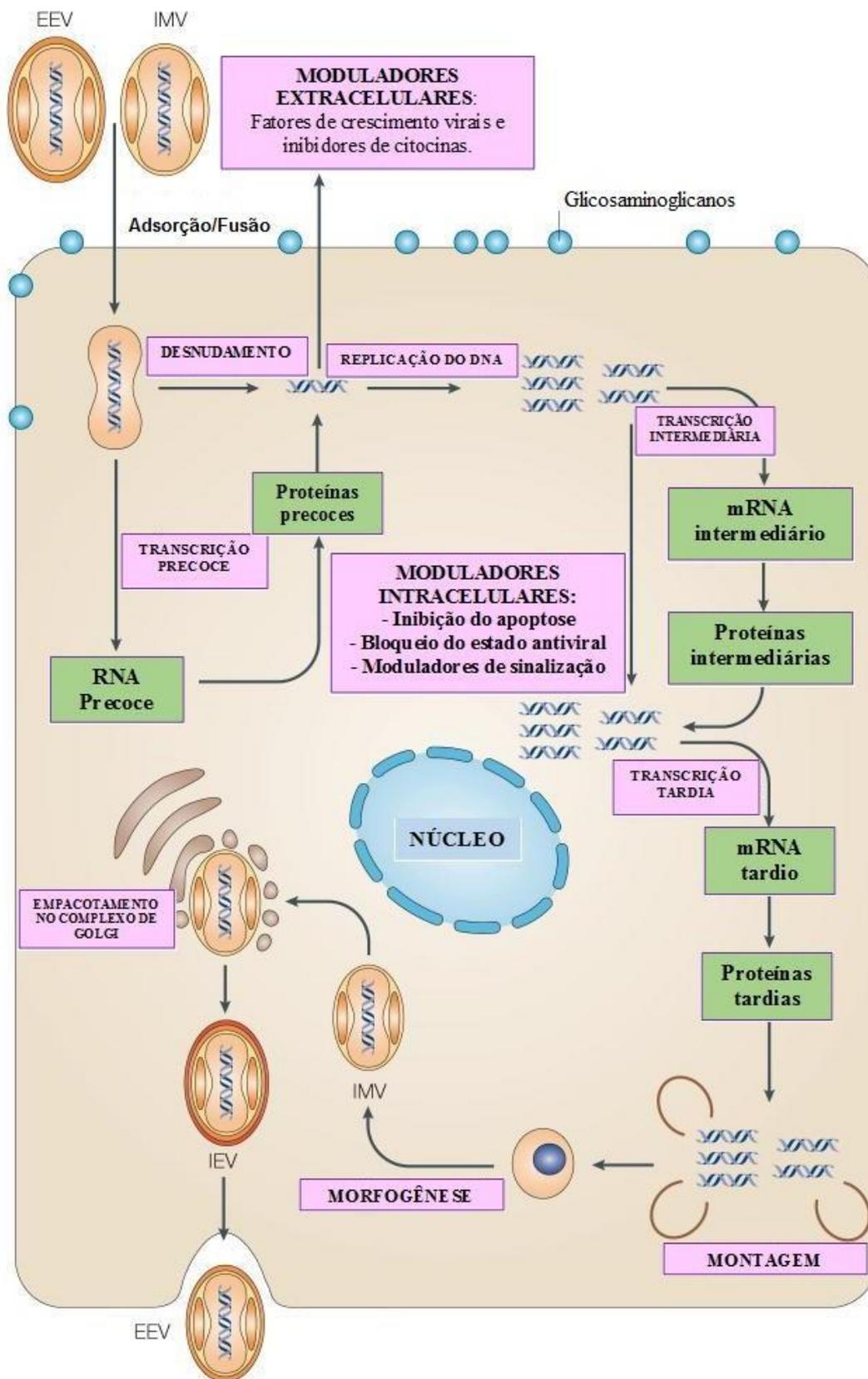


**Figura 3 – Penetração de IMV e EEV na célula.** Representação esquemática da entrada de IMV e EEV, evidenciando os modelos propostos para as duas partículas infecciosas. Fonte: adaptada de ROBERTS & SMITH, 2008.

Assim que o vírion tem seu cerne liberado no citoplasma da célula hospedeira o mesmo é transportado através dos microtúbulos para os sítios de replicação viral (**figura 4**). A RNA polimerase presente dentro do nucleocapsídeo e fatores de transcrição virais que são empacotados durante a montagem do vírion, iniciam a primeira cascata de expressão dos genes que codificam proteínas precoces, então os primeiros promotores virais transcrevem cerca de 100 mRNA. A síntese dessas proteínas precoces tem papel na perda do revestimento do nucleocapsídeo, liberação e replicação do DNA, codificando enzimas e fatores necessários para a síntese do DNA viral e para a transcrição dos genes intermediários. Algumas dessas proteínas parecem ser secretadas da célula apresentando importância na modulação da resposta imune e proliferação da célula hospedeira. Essa importância das proteínas precoces na liberação do DNA é demonstrada quando as células hospedeiras são tratadas com inibidores de síntese de proteína no início da infecção, demonstrando a presença do nucleocapsídeo no citoplasma mesmo depois de muitas horas (MCFADDEN, 2005; SCHRAMM & LOCKER, 2005; MOSS, 2013).

A segunda fase se inicia com a perda do revestimento do nucleocapsídeo e conseqüentemente a liberação do DNA que será replicado. Ocorre também a transcrição de genes intermediários, sendo que seus transcritos codificam enzimas e fatores para a expressão dos genes tardios. A transcrição dos genes intermediários e tardios depende de fatores de transcrição do hospedeiro, ao contrário da transcrição dos genes precoces que parece estar sob controle exclusivo de fatores de transcrição virais carregados no nucleocapsídeo. A proteína Vitf2 do hospedeiro tem papel no direcionamento da RNA polimerase viral aos promotores dos genes intermediários (MCFADDEN, 2005; MOSS, 2013).

Os fatores de transcrição dos genes tardios são produzidos pela tradução dos mRNA intermediários. Os genes tardios codificam proteínas estruturais para montagem de novas partículas virais e fatores de transcrição de genes precoces que serão adicionados ao nucleocapsídeo com a RNA polimerase e outras enzimas. As proteínas de membrana do vírus são glicosiladas no complexo de golgi, iniciando a formação de partículas esféricas imaturas que após maturação formam o vírus imaturo (IV). Este ainda não possui genoma, é constituído de uma membrana com espículas e material granular. Uma massa densa contendo o genoma viral entra através do envelope imaturo e, após etapas de conversão e reorganização internas, os IVs dão origem aos IMVs, que podem então ser liberados da célula por lise. Um conjunto de IMVs se concentra próximo ao centro organizador de microtúbulos e são transportados através dos microtúbulos para o complexo de golgi ou de vesículas endossomais, onde adquirem uma dupla membrana e formam os vírus envelopados intracelulares (IEVs). Estes também utilizam microtúbulos e cinesina para se mover até a superfície celular onde, por meio de fusão da sua membrana externa com a membrana plasmática, formam os EEVs. Algumas partículas podem permanecer associadas a membrana plasmática formando os vírus envelopados célula-associados (CEVs), fundamentais na dispersão viral célula-célula (MCFADDEN, 2005; SCHRAMM & LOCKER, 2005; SCHMIDT *et al.*, 2012; MOSS, 2013).



**Figura 4 – Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos poxvírus.** O ciclo se inicia com a adsorção viral. Em seguida ocorre a fusão entre as

membranas viral e celular liberando o cerne dentro do citoplasma da célula. Após esse desnudamento primário ocorre a transcrição dos genes precoces que codificam enzimas relacionadas com a síntese do DNA viral e fatores necessários para a transcrição dos genes intermediários. Decorre então o desnudamento secundário e a consequente liberação do DNA no citoplasma. Enzimas sintetizadas na etapa inicial da infecção atuam, então, na replicação do DNA viral. Durante e após a síntese do DNA acontece a transcrição dos genes intermediários e tardios. Por fim, as partículas virais são montadas e permanecem dentro da célula, são liberadas para o meio extracelular ou permanecem associadas à membrana plasmática. Fonte: adaptada de MCFADDEN, 2005.

### 1.3 Vírus Vaccinia isolados no Brasil

A falta de conhecimento em relação a sua origem e evolução, bem como seus reservatórios naturais não impediram que VACV fosse utilizado como vacina viva durante a campanha de erradicação da variola. Estima-se que VACV circule em ambientes rurais e silvestres brasileiros há várias décadas. A partir de 1999, o VACV tem sido relacionado a surtos em bovinos, infecções em humanos, equinos e outros animais (DA FONSECA *et al.*, 2011).

Em 1961 na cidade de Cotia, estado de São Paulo, durante um programa de vigilância para arboviroses coordenado pelo Instituto Adolfo Lutz, foi isolado o *Cotia virus* (COTV) a partir de camundongos sentinela. COTV seria o primeiro isolado de VACV no Brasil. Anos depois foi sugerido que o mesmo seria uma recombinante entre *Leporipoxvirus* e um *Orthopoxvirus* (UEDA *et al.*, 1995). Estes isolados receberam o nome-código de SPAn232. Entre 1961 e 1978, várias outras amostras coletadas foram catalogadas como SPAn232 por apresentarem reações sorológicas cruzadas com as primeiras amostras do COTV. No entanto, análises moleculares de alguns destes isolados revelaram que estas se tratavam, na verdade, de um variante de VACV que circulava nas mesmas regiões onde COTV ocorria. Assim foi proposto que COTV e o vírus SPAn232 fossem tratados como isolados virais diferentes (DA FONSECA *et al.*, 2002).

Nas florestas tropicais em Belém-do-Pará, no ano de 1963, o *Bean 58058 virus* (BAV) foi isolado a partir do sangue de um roedor do gênero *Oryzomys*. Foi demonstrado

que este vírus era antígenicamente relacionado com outro poxvírus isolados no Brasil. Foi proposto que BAV resultava de um repositório da vacina contra varíola, visto que na mesma época a vacinação contra Variola acontecia no estado do Pará. Contudo, quando feita a comparação entre BAV e VACV Lister, amostra vacinal usada naquela época no Pará, foi observado um perfil molecular diferente entre essas duas amostras. Em tal caso, especulou-se que, contaminantes vacinais liberados no ambiente, possam ter sofrido durante anos pressões evolutivas diferentes e gerado novas variantes virais (DA FONSECA *et al.*, 1998).

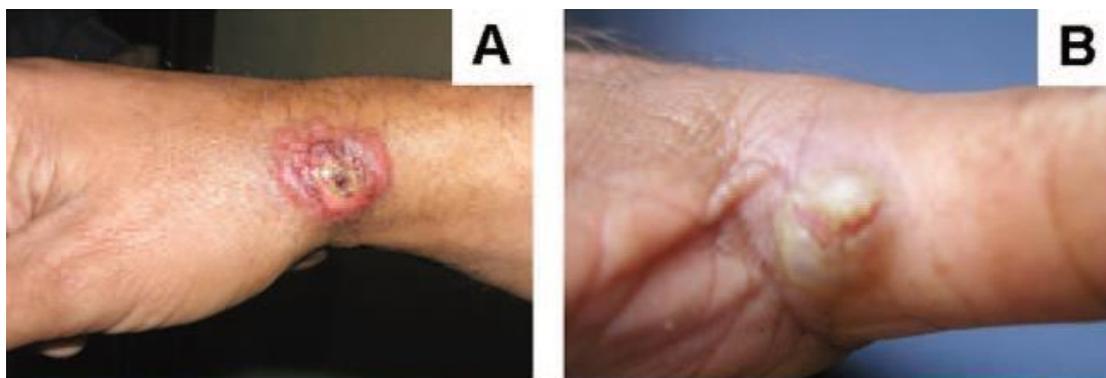
Camundongos provenientes da Universidade de Campinas, estado de São Paulo, foram enviados para o biotério do Instituto Biológico da Universidade de Minas Gerais. Assim que chegaram tinham aparência saudável, entretanto poucos dias depois, alguns animais apresentaram lesões cutâneas generalizadas e outros morreram. Após isolamento e caracterização molecular o vírus foi denominado *Belo Horizonte virus* (VBH). Não se sabe a fonte de contaminação e não havia qualquer investigação sobre poxvírus acontecendo no biotério de origem dos camundongos, todavia foi relatado que houve recebimento de camundongos de outras instalações, configurando uma possível fonte de contaminação (TRINDADE *et al.*, 2004).

Um surto de doença exantemática afetou o gado leiteiro de várias fazendas no município de Cantagalo, Miracema e Santo Antônio de Pádua no estado do Rio de Janeiro no ano de 1999, sendo o agente responsável intitulado *Cantagalo virus* (CTGV). Os aspectos clínicos descritos foram, pústulas que evoluíram para vesículas seguido de pápulas no úbere e tetos; em 3 semanas os animais eram curados restando apenas cicatrizes, frequentemente infecções secundárias por bactérias eram observadas. Vários ordenhadores e membros de suas famílias exibiam lesões nas mãos e em alguns casos antebraço, com sintomas de febre alta, linfadenopatia axilar, mal-estar e em alguns poucos casos graves o aparecimento de lesões vesiculares pelo corpo. Foi descartada por meio do ensaio de membrana cório- alantóide (CAM) hipótese de que se tratava de um CPXV, corroborado pela falta de inclusões do tipo acidófilas (ATIs) característica de CPXV, observado através de microscopia eletrônica. De acordo com o estudo análises filogenéticas indicam que CTGV estreitamente relacionado com VV-IOC, uma amostra da vacina da varíola fabricadas pelo Instituto Oswaldo Cruz na campanha de erradicação da varíola (DAMASO *et al.*, 2000). Quixabeira-Santos e colaboradores descreveram um surto de CTGV anos depois do primeiro relato do vírus entre junho de 2008 e junho de 2010,

quando 56 propriedades leiteiras nos estados de Mato Grosso e Rondônia foram investigadas. Durante o surto os bovinos apresentavam lesões nos tetos e focinho, sintomas de febre, linfadenopatia e remissão em 3 semanas. Lesões também foram observadas na língua de bezerros em aleitamento. Os autores sugeriram que a circulação de animais foi a principal causa da disseminação do vírus no norte do Brasil (QUIXABEIRA-SANTOS *et al.*, 2011).

Também em 1999, na cidade de Araçatuba no estado de São Paulo, um surto acometeu vacas leiteiras e um ordenhador, com lesões nos tetos das vacas e nas mãos do ordenhador. O vírus foi descrito como variante de VACV denominado *Araçatuba virus* (ARAV), através das características de crescimento do vírus, microscopia eletrônica e técnicas de biologia molecular (TRINDADE *et al.*, 2003).

Trindade e colaboradores relataram um surto que afetou o gado leiteiro e ordenhadores de várias fazendas no estado de Minas Gerais em agosto de 2000. Um ordenhador que não havia sido vacinado contra varíola desenvolveu múltiplas lesões após o contato com vacas que apresentavam lesões exantemáticas nos tetos. A lesão iniciou-se com prurido nas mãos seguido de edema local. Após 3 dias foram observadas vesículas nas mãos e sintomas de febre, exaustão e dor de cabeça, as vesículas evoluíram para lesões ulceradas em forma de pústulas e úlceras dolorosas nos dedos. Ao das lesões era possível observar o tecido inflamado (**Figura 5**). Utilizando caracterização molecular e análise filogenética, foi confirmado que o vírus em questão se tratava de um VACV denominado *Muriae virus* (MURV). MURV foi o primeiro isolado VACV isolado de uma infecção em humano (TRINDADE *et al.*, 2007).



**Figura 5 – Lesões em humanos por MURV.** Lesões ulcerativas nos dedos e as mãos de um ordenhador (A e B). Fonte: adaptada de TRINDADE *et al.*, 2007.

Em outubro de 2001, no decorrer de um único surto, duas amostras de VACV geneticamente diferentes foram isoladas e designadas *Guarani P1 virus* (GP1V) e *Guarani P2 virus* (GP2V) na cidade de Guarani, Minas Gerais. Durante o estudo, em 72 propriedades que foram investigadas, lesões nos tetos de 1.020 vacas foram caracterizadas pela presença de pápulas que evoluíram para úlceras, que progrediram para cura. Foi verificada também a presença de lesões nas mãos de aproximadamente 110 ordenhadores que em sua maioria foram infectados após contato com as lesões nos tetos das vacas. As lesões nas mãos dos ordenhadores eram principalmente pápulas e úlceras dolorosas. Foram observados sintomas de linfadenite, além de febre e infecções bacterianas secundárias. O curso da doença era de 15 a 30 dias e a transmissão pessoa a pessoas também foi relatada. O diagnóstico molecular foi realizado através de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) do gene A26L e por meio da sequência de um grupo de cinco genes de VACV incluindo C11R, J2R, A56R, B18R, e E3L. Esses dados confirmaram presença de dois VACV que apresentam diferenças genéticas importantes (TRINDADE *et al.*, 2006).

No município de Passa-Tempo no estado de Minas Gerais foi relatada uma epidemia de VACV em março de 2003 em pequenas propriedades rurais acometendo vacas e ordenhadores. As vacas apresentavam lesões no úbere e tetos (**figura 6**), com aspecto semelhante ao de lesões relatadas em outros surtos de VACV no Brasil. Os ordenhadores relataram lesões nas mãos após contato desprotegido com as vacas doentes. Sinais clínicos como febre alta, dor de cabeça intensa, dor nas costas e linfademopatia também eram relatados pelos ordenhadores. Após ensaio de RFLP o vírus foi purificado e titulado e batizado de *Passatempo virus* (PSTV). O PSTV apresenta a mesma assinatura genética composta pela ausência de 18 nucleotídeos no gene HA, identificado em CTGV, ARAV e VACV-IOC (LEITE *et al.*, 2005).



**Figura 6 - Lesões provocadas por PSTV.** Lesões ulcerativas em 1 e 2, mastite causada por infecção bacteriana secundária em 3, lesões no focinho e mucosa bucal em 4 e 5, lesões em ordenhador em 6. Fonte: adaptado de LEITE *et al.*, 2005.

Um homem de 30 anos que vivia na área rural do município de Serro, no estado de Minas Gerais, após contato com vacas que tinham lesões nos tetos e úbere, desenvolveu lesões nas mãos, com surgimento de nódulos inchados e prurido e sintoma de febre. Em seguida foi observado edema nas mãos e as lesões nodulares se tornaram pápulas. Depois de 12 dias após surgirem os primeiros sintomas, as lesões evoluíram para úlceras necróticas e dolorosas. Um hemograma do paciente mostrou uma diminuição das células apresentadoras de antígenos, linfócitos B e macrófagos. Os PBMCs (células mononucleares do sangue periférico) do homem infectado evidenciaram respostas proliferativas e baixa produção de citocinas após estimulação com VACV *in vitro*. Os níveis de IFN- $\gamma$  estavam mais baixos do que o esperado, o que é curioso uma vez que uma alta produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD4+ e CD8+ é indicativo de infecção por *Orthopoxvirus*. A caracterização do agente causador das lesões do paciente foi feita através de coleta do fluido de lesões supuradas. Através de análises biológicas, moleculares e filogenéticas, o vírus foi denominado *Serro 2 Virus* (TRINDADE *et al.*, 2009).

Abraão e colaboradores isolaram um VACV chamado de *Mariana virus* (MARV), durante um surto de vaccínia bovina em 2005 na cidade de Mariana, estado de Minas Gerais. Dentro da área estudada, várias propriedades relataram infecções

exantemáticas nos tetos das vacas e mãos de ordenhadores. Durante os períodos de seca, é frequente o aparecimento de roedores silvestres em propriedades rurais a procura de alimento. Justamente nesses mesmos períodos, é comum o surgimento de surtos de vaccínia bovina. Seria então razoável vincular a presença desses roedores a surtos de vaccínia bovina, sugerindo que VACV poderia circular nesses animais. Nesse estudo foram capturados em diferentes propriedades afetadas pelo surto, seis ratos comuns (*Rattus rattus*) e sete camundongos (*Mus musculus*). Nenhum dos animais capturados apresentava lesões epidérmicas ou alterações morfológicas nos órgãos analisados, apesar disso, anticorpos neutralizantes contra *Orthopoxvirus* foram detectados em duas das amostras de soro coletadas dos animais. Foi feita inoculação do material retirado dos roedores, que apresentavam altos níveis de anticorpos neutralizantes, em fibroblasto de embrião de galinha (CEF) induzindo a formação de efeitos citopáticos típicos de poxvírus. Características genéticas em associação com ensaios biológicos evidenciaram que o isolado verificado no soro dos animais coletados era o mesmo agente que causou as lesões exantemáticas observadas nos humanos e bovinos na área afetada pelo surto (ABRAHÃO *et al.*, 2009).

Em fevereiro de 2008, um surto de doença cutânea grave associada a *Orthopoxvirus* foi descrita em cavalos da raça Crioula em Pelotas, estado do Rio Grande do Sul. As lesões nos animais eram caracterizadas como pápulas e vesículas que progrediam para lesões exsudativas no focinho, narinas externas e lábios externo e interno. Os sinais clínicos duravam cerca de 6 a 12 dias, com recuperação progressiva e formação de cicatrizes nas áreas das lesões. Por meio do material retirado para biopsia foi evidenciada a presença de partículas virais em forma de tijolo com morfologia de *Orthopoxvirus* e o ensaio de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando iniciadores para o gene ATI e DNA extraído das lesões produziu um fragmento com tamanho similar aos obtidos por amplificação de CPXV e VACV. Verificou-se a presença de dois isolados de VACV com características genéticas e biológicas diferentes, após isolamento viral e caracterização molecular os isolados foram nomeados *Pelotas 1 virus* (P1V) e *Pelotas 2 virus* (P2V), dado que os isolados apresentavam placas de lise de tamanho diferentes e em uma das etapas do ensaio de curva de crescimento P1V e P2V mostraram perfis de crescimento diferentes (CAMPOS *et al.*, 2011).

A primeira caracterização de um VACV no estado do Maranhão ocorreu na cidade de Açailândia em fevereiro de 2009, um surto afetou bovinos e trabalhadores de

propriedades rurais produtoras de leite. Durante o surto, 42 bovinos e 6 trabalhadores de um total de 9 fazendas desenvolveram lesões exantemáticas semelhantes às relatadas em surtos de vaccínia bovina. Em amostras de três vacas para identificação do agente, o ensaio de PCR usando como alvo o gene C11R resultou na ampliação de fragmentos que são específicos de *Orthopoxvirus* em todas as amostras testadas que também apresentaram resultados idênticos em testes biológicos. O isolado foi chamado de *Maranhão virus* (MRV) (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Um surto de infecção atípica grave de VACV acometeu 12 trabalhadores rurais na cidade de Doresópolis em Minas Gerais, em junho de 2010. Na região existem pequenas propriedades rurais onde são criados bovinos para produção de leite. Apesar da infecção atípica nos trabalhadores rurais que levou a hospitalizações em função de manifestações sistêmicas, os bovinos doentes apresentaram lesões típicas de VACV nas tetos e úbere. Os sinais clínicos atípicos eram febre alta, prostração, lesões vesiculares dolorosas nas mãos, antebraço, rosto e ou joelhos; alguns pacientes também tinham convulsões, diarreia, vômitos e confusão mental. Quatorze trabalhadores que tinham sinais de infecção mas que não foram hospitalizados também foram investigados. A caracterização do agente foi feita através da coleta de soro de 4 vacas, crostas de 3 vacas além de amostras de esfregaço das lesões de 4 pacientes que foram hospitalizados e 1 paciente não hospitalizado. Depois de análises moleculares e filogenéticas o isolado foi denominado DOR2010 (ABRAHÃO *et al.*, 2015).

Assis e colaboradores registraram na cidade de Bom Jesus do Tocantins, estado do Pará, na região norte do Brasil, um surto que não foi ocasionado por CTGV que por duas vezes foi identificado em surtos nessa região do Brasil. Em julho de 2010, vacas leiteiras e ordenhadores foram afetados. Os animais apresentaram lesões vesiculares dolorosas nos tetos, parte interna das coxas que evoluíram para lesões ulcerativas e crostas, lesões nos lábios, focinho e cavidade oral de bezerros também foram verificadas. Os ordenhadores, assim como nos outros casos relatados acima, desenvolveram a doença após contato com as lesões de vacas doentes, apresentando lesões típicas de *Orthopoxvirus* nas mãos, antebraço e abdômen, além de febre, fadiga e dor no local das lesões. Após isolamento do vírus através de crostas dos animais doentes e verificação de efeito citopático típico de poxvírus, o vírus foi purificado e amplificado em células VERO. O novo isolado responsável por infecções na região norte do Brasil foi nomeado *Pará virus* (PARV) (DE ASSIS *et al.*, 2013).

Seis anos depois que Trindade e colaboradores relataram infecção pelo *Serro vírus*, um surto afetou vacas leiteiras e ordenhadores de duas fazendas no município de Serro, estado de Minas Gerais. O curso do surto foi de 28 dias e uma vaca leiteira apresentou lesões ulcerativas no úbere e tetos, e em poucos dias um total de 91 vacas e 3 trabalhadores das duas propriedades estavam doentes. A identificação do agente foi feita após coleta de lesões apresentadas por dois dos trabalhadores, o agente foi isolado e nomeado Serro-2011 (DE ASSIS *et al.*, 2012).

Franco-Luiz e colaboradores investigaram a presença de anticorpos anti-*Orthopoxvirus* e genoma de *Orthopoxvirus* em manadas de búfalos na Ilha de Marajó, norte do Brasil nos anos de 2009, 2011 e 2012. Foram coletados soros de 150 búfalos (*Bubalus bubalis*) nas cidades de Cachoeira do Arari, Chaves, Salvaterra e Soure. O rebanho de búfalos não apresentava sinais clínicos de VACV no momento da coleta e surtos de VACV não foram relatados na Ilha de Marajó. Amplificação do gene C11R por PCR revelou a presença de DNA viral em 21% das amostras, sendo que posteriormente o isolado foi intitulado VACV-BM2012. Embora os búfalos não apresentassem sinais clínicos, os autores não descartam o desenvolvimento de doença assintomática, ademais a sondagem de sintomas é difícil de ser feita uma vez que exames realizados por veterinários ou até mesmo trabalhadores rurais são raros (FRANCO-LUIZ, *et al.*, 2016).

Em 2008, outro surto de VACV foi relatado no estado de São Paulo em pequenas propriedades leiteiras com utilização de ordenha manual. Foi observada uma rápida disseminação da doença. Os bovinos afetados tinham lesões os tetos e úbere características de VACV, um bezerro de 6 meses apresentou lesões no focinho e mucosa oral. Ordenhadores também apresentavam sintomas de infecção por VACV caracterizadas por lesões nas mãos, sinais sistêmicos como linfadenopatia, dor de cabeça e febre, além disso, uma criança de 11 anos apresentou lesões no nariz e boca (MEGID *et al.*, 2008).

A fim de detectar *Orthopoxvirus* na Amazônia Brasileira, Abrahão e colaboradores realizaram uma investigação sorológica em 344 animais selvagens que não tinham contato com humanos nem gado leiteiro. Os animais foram capturados em uma área destinada à construção de uma usina hidrelétrica nos municípios de Lajeado e Ipueiras no estado do Tocantins de fevereiro de 2001 a setembro de 2002. No decorrer do trabalho, 269 macacos-prego (*Cebus apella*), 27 bugios-pretos (*Alouatta caraya*), 12 quatis (*Nasua nasua*), 20 cutias (*Dasyprocta sp.*), 2 gambás (*Didelphis albiventri*), 5 tatus

(*Euphractus sexcinctus*), 5 tamanduás-mirins (*Tamandua tetradactyla*), e 4 guaraxanis (*Cerdocyon thous*) foram capturados. Anticorpos contra *Orthopoxvirus* foram detectados em 84 animais e 18 amostras das 344 foram positivas após ensaios de PCR para amplificação de um gene altamente conservado em *Orthopoxvirus* (*vgf*) (ABRAHÃO *et al.*, 2010). Diante de todos esses relatos, o aparecimento de VACV na natureza não é tão raro como foi pensado antigamente, mas sim infinitamente mais complexo do que se imaginava.

A partir dos diversos estudos realizados por pesquisadores brasileiros, os isolados de VACV foram divididos em dois grupos: grupo 1 (menos virulento em modelos de infecção murina), grupo 2 (mais virulento em modelos de infecção murina). Essa divisão reflete propriedades biológicas dos isolados, como virulência em camundongos BALB/c, fenótipo de placas em células BSC-40 e presença ou ausência de uma deleção de 18 nucleotídeos no gene codificador da proteína hemaglutinina viral (HA ou A26R). A Tabela 1 apresenta os isolados descritos até o momento, de acordo com sua inclusão nos grupos 1 ou 2.

Tabela 1 – Classificação dos VAVCs isolados no Brasil de acordo com o grupo filogenético

<b>GRUPO 1</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
<i>Cantagalo vírus</i>	Damaso <i>et al.</i> ,2000
<i>Araçatuba vírus</i>	Trindade <i>et al.</i> , 2003
<i>Passatempo vírus</i>	Leite <i>et al.</i> ,2005
<i>Guarani P2 vírus</i>	Trindade <i>et al.</i> ,2006
<i>Muriaé vírus</i>	Trindade <i>et al.</i> ,2007
<i>Serro Virus</i>	Trindade <i>et al.</i> ,2009
<i>Mariana vírus</i>	Abrahão <i>et al.</i> ,2009
<i>Pelotas 2 vírus</i>	Campos <i>et al.</i> ,2011
<i>Maranhão vírus</i>	Oliveira <i>et al.</i> ,2013
DOR2010	Abrahão <i>et al.</i> ,2015
<i>Pará vírus</i>	De Assis <i>et al.</i> , 2013
Serro-2011	De Assis <i>et al.</i> ,2012
VACV-BM2012	Franco-Luiz <i>et al.</i> ,2016

<b><u>GRUPO 2</u></b>	
<i>Guarani P1 virus</i>	Trindade <i>et al.</i> , 2006
<i>Pelotas 1 virus</i>	Campos <i>et al.</i> , 2011
<i>Bean 58058 virus</i>	Da Fonseca <i>et al.</i> , 1998
SPAn23	Da Fonseca <i>et al.</i> , 2002
<i>Belo Horizonte virus</i>	Trindade <i>et al.</i> , 2004

**Fonte:** Tabela produzida pela autora.

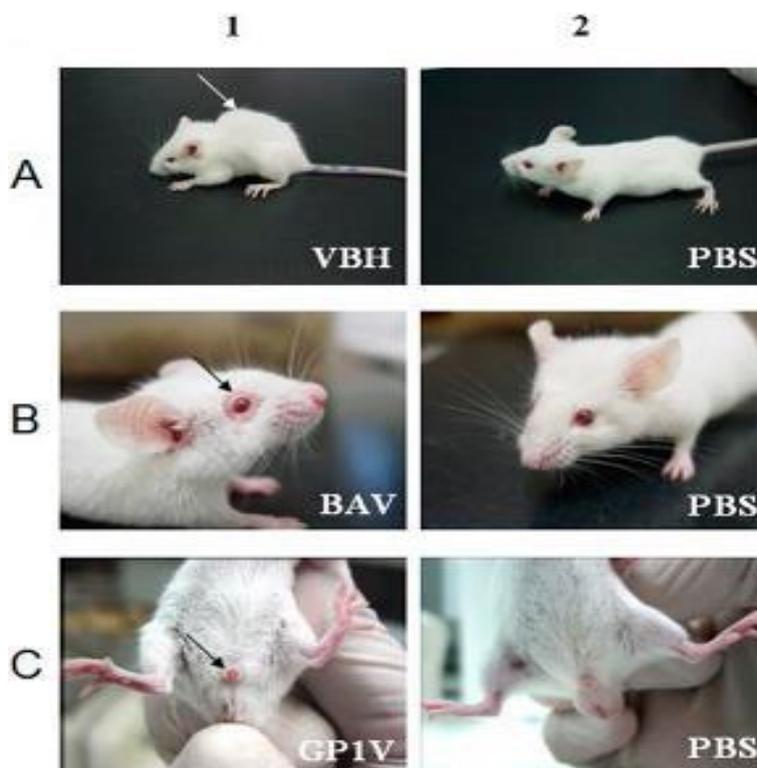
Em função da diversidade genética encontrada entre os dois grupos de VACV, são sugeridas hipóteses para sua origem. Uma hipótese propõe que os VACVs podem ter várias e diferentes origens, tendo sido introduzidos, no Brasil, múltiplas vezes e a partir de diversas fontes. Ou ainda, VACVs teriam uma só origem em comum mas sofreram pressões seletivas diferentes estimulados pelas altas taxas de replicação em hospedeiros diferentes (DA FONSECA *et al.*, 2011).

#### **1.4 Infecção VACV em Modelo Murino**

Diversos estudos buscam elucidar os mecanismos de patogênese dos VACV em modelo murino. A separação dos VACV brasileiros em dois grupos diferentes, grupo 1 (avirulento) e grupo 2 (virulento) se dá por um conjunto de características biológicas de tais vírus, bem como o perfil de virulência em modelo murino. Modelo interessante por apresentar diversas linhagens de camundongos bem definidas e com características fenotípicas diferentes. Ademais, diversos VACVs foram isolados a partir de roedores, como Cotia, BAV, Span232, MARV e VBH.

Para compreender os mecanismos de patogênese dos VACVs é importante avaliar vias de inoculação, evolução e modelos de infecção diferentes. Ferreira e colaboradores observaram padrões de virulência diferentes em BALB/c, quando infectados com os vírus VACV-WR, VACV Lister, BAV, Span232, VBH, ARAV, GP1V, GP2V e PSTV. Os animais infectados com Span232, BAV, VBH, GP1V e WR, apresentaram sintomas pronunciados da infecção como arqueamento de dorso, eriçamento de pelo, alopecia periocular

e inflamação ocular, além de perda acentuada de peso (**figura 7**). Em contrapartida os animais infectados com PSTV, GP2V, ARAV e VACV Lister não exibem sintomas após a infecção. Lesões cutâneas e desenvolvimento de erupções cutâneas generalizadas também foram relatadas em camundongos infectados com VBH. (TRINDADE *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2015).



**Figura 7: Sinais clínicos de camundongos infectados com VACV-BR.** Camundongos BALB/c inoculados pela via intranasal com  $10^6$  PFU. 1A) Arqueamento de dorso e eriçamento de pelo em camundongos infectados com VBH. 1B) Alopecia periorcular em camundongos infectados com BAV. 1C) Balanopostite em camundongos infectados com GP1V. Fonte: adaptada de FERREIRA, *et al.*, 2008.

Foi possível verificar partículas virais em diferentes órgãos, como pulmão, cérebro, coração, fígado, traqueia, baço e rim de camundongos BALB/C e C57BL / 6J infectados com VACV-WR, Span232, BAV, VBH, GP1V. Análises histopatológicas mostram que camundongos BALB/C infectados com diferentes amostras de VACV, pertencentes aos dois grupos de VACV-BR, apresentaram pneumonia. Porém os animais infectados com representantes do grupo 2, como Span232, BAV, VBH e GP1V apresentaram lesões

teciduais pulmonares graves, ao mesmo tempo que as lesões causadas pelos vírus ARAV, PSTV e GP2V apresentavam-se moderadas (HAYASAKA, ENNIS e TERAJIMA, 2007; FERREIRA, *et al.*, 2008).

O sucesso desses vírus em causar uma infecção grave e alcançar altas taxas de replicação em diversos órgãos está na capacidade de supressão do sistema imune, no perfil de virulência relacionado a características genéticas dos vírus e na suscetibilidade dos modelos de infecção. Earl e colaboradores investigaram a susceptibilidade de duas linhagens diferentes de camundongos, CAST e BALB/c, após a infecção pela via intraperitoneal por VACV-WR. Foi observado que os camundongos CAST eram mais susceptíveis a infecção por VACV-WR quando comparado a BALB/c. Os títulos virais encontrados no baço, ovário, plasma e células peritoneais, eram maiores nos camundongos CAST, inoculados com a mesma carga viral dos camundongos BALB/c. De acordo com o estudo, a susceptibilidade dos camundongos CAST está relacionada a deficiência de componentes da resposta inata, tais como, células NK e produção de IFN- $\gamma$ .

### **1.5 Resposta imune a poxvírus**

A compreensão acerca da resposta imune aos *Orthopoxvirus* tem sido alvo de estudos recentes, devido às frequentes infecções zoonóticas causadas por esses vírus. Já existem muitos estudos que visam a compreensão da resposta imune em modelos animais. Entretanto os dados a respeito da resposta imune em seres humanos são limitados, principalmente porque boa parte das informações vem de dados clínicos de pacientes que contraíram varíola ou de indivíduos que foram vacinados (PANCHANATHAN *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2012).

As infecções por poxvírus induzem uma robusta produção de IFN que apresenta dois papéis no seu controle da infecção. Primeiro, na presença do vírus ele induz um estado antiviral nas células vizinhas, inibindo o crescimento celular e estimulando a expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I. Segundo, ele ativa macrófagos, NK e linfócitos T citotóxicos. Apesar disso, níveis elevados de IFN *in vivo* nem sempre estão relacionados com a depuração da infecção (*revisado por* SMITH & KOTWAL, 2002; PANCHANATHAN *et al.*, 2008).

O sistema complemento é um importante componente do sistema imune inato, e é importante no bloqueio da infecção por poxvírus através da via clássica e da via alternativa. Depois da ativação dessas vias, agentes quimiotáticos pró-inflamatórios são liberados e resultam na migração de leucócitos para a área da infecção. A consequência da ativação do complemento é a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) que leva à lise da célula infectada. Outra possibilidade é a neutralização dos poxvírus através da acumulação de componentes do complemento na superfície viral (OHTA *et al.*, 1986; SMITH & KOTWAL, 2002; GOMES *et al.*, 2012)

Anticorpos atuam de diversas formas contra os poxvírus: agregando-se ao vírus e impedindo a adsorção viral, provocando sua opsonização e acarretando na fagocitose, ou ainda recobrando a superfície da membrana celular resultando na citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (HANSSON *et al.*, 1966; SMITH & KOTWAL, 2002).

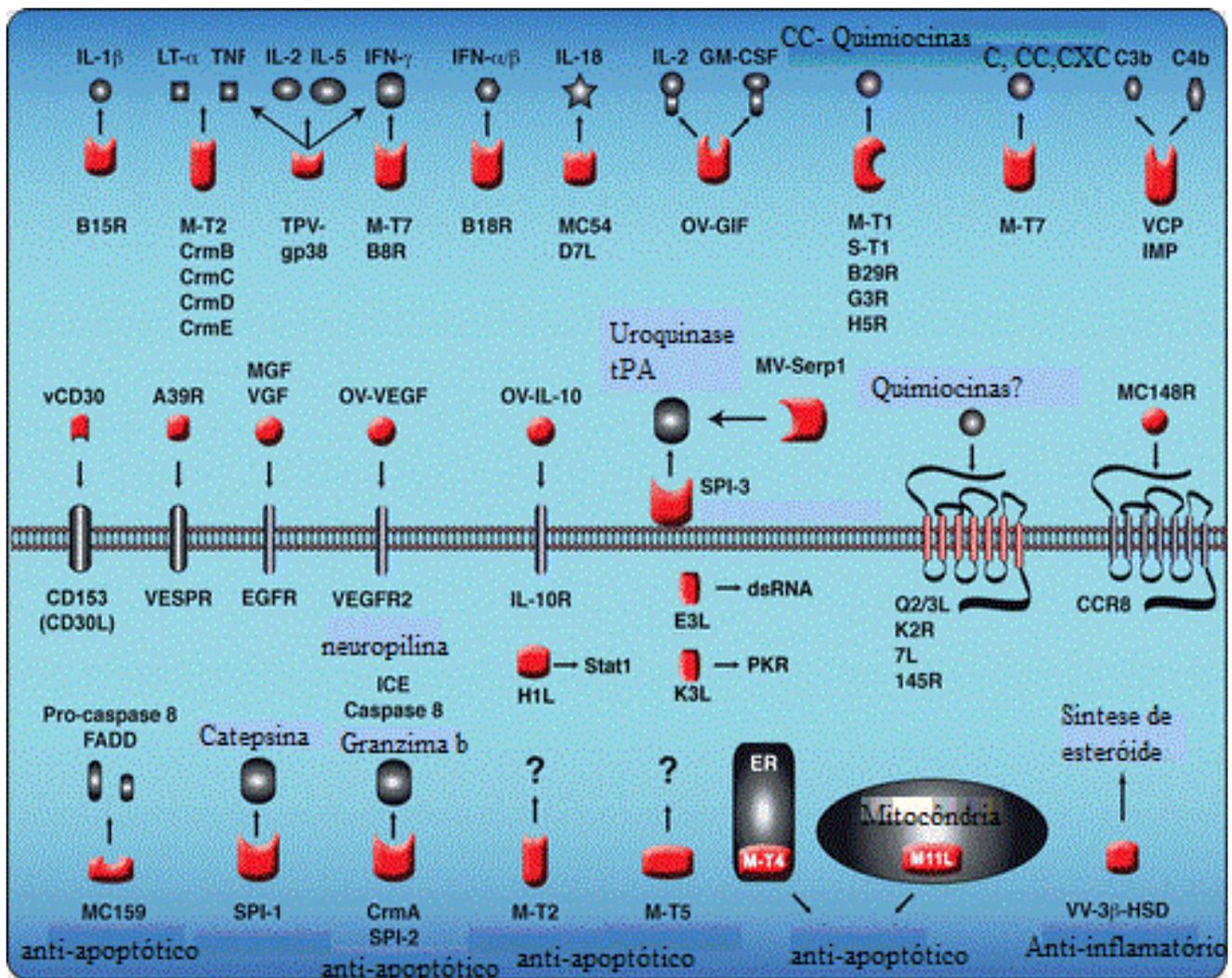
Células NK são recrutadas para os tecidos infectados por citocinas inflamatórias e quimiocinas. Assim que se tornam ativas, elas lisam a célula alvo por meio da liberação de perforinas e granzimas. (KARUPIAH, COUPAR, *et al.*, 1990; MORETTA *et al.*, 2000; SMITH & KOTWAL, 2002).

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> são importantes na resposta imune adquirida, mediada por células, contra poxvírus. Eles reconhecem células infectadas com vírus e destroem-nas antes da maturação do mesmo, assim, reduzindo a propagação viral. Linfócitos T CD8<sup>+</sup> são importantes também na reinfecção por poxvírus, agindo de forma rápida na eliminação viral (ANDREW V *et al.*, 1989; SMITH & KOTWAL, 2002; XU *et al.*, 2004). Não obstante, diversos artigos demonstram que as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> agem sinergicamente no controle da infecção viral (RAMIREZ *et al.*, 2000; XU *et al.*, 2004, EARL *et al.*, 2017)

### 1.5.1 Imunomodulação por poxvírus

Uma das razões do sucesso replicativo dos poxvírus perante a imunidade inata e adquirida do hospedeiro está na sua habilidade de obstruir, escapar ou ainda subverter elementos essenciais da resposta antiviral. Poxvírus são capazes de codificar um repertório de proteínas relacionadas com a evasão da resposta imune **figura 8**. Essas proteínas que se relacionam com sistema imune do hospedeiro são surpreendentemente diversas, ao ponto de nenhum gene imunomodulador ser comum em todos os genomas

de poxvírus. Essa inexistência de conservação entre os genes imunomoduladores dos poxvírus é um reflexo de sua habilidade de infectar diferentes hospedeiros, apresentar tropismo tecidual variado e é a razão de diferenças fenotípicas observadas durante manifestações clínicas (SMITH & KOTWAL, 2002; JOHNSTON & MCFADDEN, 2003; SEET *et al.*, 2003).



**Figura 8 – Representação esquemática das proteínas imunomoduladoras de poxvírus (vermelho) e proteínas do hospedeiro (cinza).** Proteínas extracelulares estão acima da membrana e as intracelulares abaixo da membrana. Os Viroreceptores funcionam como receptores de superfície celular ou receptores solúveis, que se ligam a citocinas ou quimiocinas do hospedeiro. Viroquinas são secretadas e podem se ligar aos receptores celulares do hospedeiro. Algumas proteínas intracelulares dos poxvírus,

modulam a apoptose e o processamento de citocinas. Fonte: adaptado de (SEET *et al.*, 2003).

Todas essas proteínas moduladoras de poxvírus podem ser classificadas de acordo com o modo de ação, intracelular ou extracelular. As proteínas que atuam intracelularmente e interferem na resposta a infecção no interior da célula, como estado antiviral, stress oxidativo e vias apoptóticas são denominadas virotransdutores. Proteínas de virocamuflagem operam intracelularmente reduzindo a possibilidade de detecção pelo sistema imunológico através da regulação negativa de moléculas de MHC de classe I e CD4. As proteínas que atuam extracelularmente são classificadas como de viromimetismo, podem também ser agrupadas como viroreceptores e virocinas. Os viroreceptores são secretados na superfície celular, dessa forma atuam como receptores competitivos de citocinas e quimiocinas do hospedeiro, interferindo na sua função. As virocinas imitam citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, assim subvertendo a resposta do hospedeiro e promovendo um ambiente favorável à replicação e disseminação viral (JOHNSTON & MCFADDEN, 2003; STANFORD *et al.*, 2007).

### **1.5.2 Imunomodulação pelos vírus GP1V e PSTV**

Diante das conhecidas estratégias de imunomodulação realizadas por poxvírus e com intuito de avaliá-las, Chinalia (2012) comparou a resposta imune de camundongos Balb/c através da infecção aguda pelos isolados zoonóticos GP1V e PSTV. Esses dois isolados pertencem a grupos diferentes de VACV, o GP1V pertence ao grupo mais virulento e PSTV ao grupo menos virulento (DRUMOND *et al.*, 2008). No estudo os animais foram divididos em quatro grupos: PSTV, GP1V, VACV-WR utilizado como amostra padrão e o grupo controle no qual foi inoculado com solução salina tamponada com fosfato (PBS).

Os resultados mostraram que os animais infectados com a amostra VACV-WR apresentaram redução significativa de Linfócitos T totais (CD3+), células NK (CD3-CD49+) e macrófagos (CD14+), como descrito em outros estudos. Linfócitos T CD8+ foram mais frequentes nos animais inoculados com WR e GP1V. A frequência de CD14+ foi menor nos animais infectados com GP1V, ao contrário do grupo PSTV que não apresentou redução e/ou aumento dessas células em comparação com o controle.

Foi observada a modulação negativa da ativação de algumas populações celulares, sendo observada redução significativa de CD19+CD86+ e CD19+CD80+ nos grupos infectados com GP1V e WR quando comparados com o controle. Muitos trabalhos demonstraram a importância da produção de anticorpos pelos linfócitos B, uma vez que esses anticorpos são fundamentais no controle da infecção por poxvírus. Conseqüentemente a ativação dessas células é alvo das proteínas de modulação codificadas por poxvírus.

Foi observada uma diminuição da fluorescência, através de citometria de fluxo, das moléculas CD14+CD86+, mas não foram observadas diferenças consideráveis na expressão das moléculas de ativação CD25 e CD69 nos linfócitos T CD4+ e células NK respectivamente. Os camundongos infectados com WR, apresentaram menor expressão de CD28, necessários para ativação de células T, nos linfócitos T CD8+ em comparação ao controle.

Foi pesquisado também os níveis de citocinas intra-citoplasmáticas IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . A citocina IL-4 foi observada em menor frequência nos animais infectados com WR, PSTV e GP1V, quando estimulados com WR inativado. A redução na produção de IFN- $\gamma$ , nos linfócitos T CD4+, também foi observada nos animais infectados com WR após estimulação. Esse resultado evidencia a capacidade imunomoduladora do vírus WR. Nos demais grupos, a produção de IFN- $\gamma$  foi constante, bem como a frequência de linfócitos T CD4+ e seu marcador de ativação CD25. A produção de IL-10 pelos linfócitos T CD8+ e CD4+, não apresentou diferença estatística nos animais inoculados dos quatro grupos. Da mesma forma, não foi observada alteração de TNF- $\alpha$ . Como conclusão, GP1V e PSTV não só apresentam diferenças em relação a virulência em modelo murino, como também quanto a modulação da resposta imune do seu hospedeiro. Os vírus GP1V e WR, modulam especificamente as respostas de células B, monócitos, células T CD4+ e células NK. Ao mesmo tempo a resposta T CD8+, não parecem sofrer modulação negativa através da ação desses vírus.

## **1.6 Estresse do Retículo Endoplasmático**

Em células eucariotas, boa parte das proteínas sintetizadas são destinadas às vias endocíticas e exocíticas. As proteínas a serem secretadas, possuem uma sequência sinal marcando-as para translocação do citoplasma para o lúmen do retículo endoplasmático

(RE). O processo de síntese das proteínas que fazem parte da sequência sinal ocorre em ribossomos aderidos à membrana do RE. (NELSON & COX, 2005, ALBERTS *et al.*, 2002).

A obtenção da conformação tridimensional correta de proteínas ocorre no lúmen do RE, que possui um ambiente oxidativo fundamental para a formação de pontes dissulfeto, importantes na manutenção da estrutura de proteínas. O RE é uma organela versátil que garante a estrutura correta das proteínas, é essencial na síntese de lipídeos, esteróis e suporte na manutenção do cálcio intracelular (FAGONE & JACKOWSKI, 2009). Por consequência, o RE é sensível a desordens na homeostase celular que são provocadas por inúmeros tipos de estresse, como redução de cálcio, infecção viral e neoplasias, que levam a indução de uma resposta a proteínas mal-formadas (*Unfolded Protein Response* – UPR). Infecções virais induzem a célula a produzir proteínas virais, ampliando a carga de proteínas que precisam ser dobradas no RE, resultando na ativação da via UPR. De forma dicotômica, a via UPR induz uma resposta com ativação simultânea de duas vias, adaptativa e pró-apotótica da célula (NELSON & COX, 2005; XU *et al.* 2005; HUSSAIN & RAMAIAH, 2007; RUTKOWSKI & KAUFMAN, 2004).

A via UPR possui três braços: o Fator de Transcrição 6 (Activating Transcription Factor 6 – ATF6), a Proteína Cinase Dependente de Inositol (Inositol-requiring Transmembrane Kinase and Endonuclease, ou IRE-1 $\alpha$ ) e Proteína Cinase Residente no RE semelhante à PKR (PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase, ou PERK) (MARCINIAK & RON, 2006). Essas moléculas são desativadas por meio da ligação da chaperona do RE, BiP/GRP78 (Binding Protein/heat shock protein de 78kDa regulada por glicose) no domínio voltado para o lúmen do RE (LI *et al.*, 2008).

A IRE-1 $\alpha$  é uma glicoproteína transmembrana do tipo I, encontrada em mamíferos. Ela apresenta uma parte voltada para o lúmen do RE sensível a polipeptídeos mal-formados. Em reação a proteínas mal-formadas a chaperona BiP/GRP78 se separa da IRE-1 $\alpha$  e permite a dimerização dessa cinase, resultando em uma mudança conformacional e ativação do domínio endorribonuclease. A ativação desse domínio inicia o processamento pós-transcricional do mRNA do fator de transcrição XBP-1 (*X-box binding protein*) produzindo outro fator de transcrição da família b-ZIP (zíper de leucina e a região básica da proteína que é responsável pela ligação no DNA). Esse processo resulta na expressão de chaperonas, enzimas modificadoras e remodelamento de membrana. Além do processamento de XBP-1, o domínio cinase da IRE-1 $\alpha$  pode induzir

a apoptose (RON & WALTER, 2007; HUSSAIN & RAMAIAH, 2007, LIN *et al.*, 2007; SCHRÖDER & KAUFMAN, 2006; XU *et al.*, 2005).

## 2- JUSTIFICATIVA

Há 36 anos a varíola foi considerada erradicada pela OMS, mesmo assim ainda existe uma grande preocupação que o Varíola vírus possa ressurgir pela sua liberação intencional como arma biológica. Uma outra possibilidade seria o surgimento de vírus da mesma família do Varíola vírus, similarmente virulentos, mediante infecções zoonóticas. Nesse caso, obviamente não seria o vírus varíola, mas uma outra espécie igualmente virulenta para o ser humano. O sucesso do programa de erradicação da varíola teve como ponto forte o fato de que não havia reservatórios animais para o Varíola vírus. Entretanto, muitos poxvírus causam infecções zoonóticas, e é razoável considerar que o vírus da varíola tenha derivado de uma zoonose que ocorreu há muitos de anos atrás (TRINDADE *et al.*, 2003; MCFADDEN, 2005).

Outros poxvírus patogênicos tais como o MPXV e CPXV, têm sido relacionados a infecções frequentes na África e Europa, envolvendo diversos hospedeiros, incluindo seres humanos. Em 2003, MPXV foi associado a infecções nos EUA, após importação de roedores silvestres da África. Essa infecção causou manifestações mais brandas do que sua variante encontrada na África, que apresenta considerável taxa de mortalidade (DI GIULIO & ECKBURG, 2004; REED *et al.*, 2004).

A vacinação contra varíola teve final nos anos 70, conseqüentemente boa parte da população é susceptível a infecções por *Orthopoxvirus*, e a emergência dessas zoonoses é reflexo da ausência de imunidade adquirida por essa população. Surtos de VACV zoonóticos têm sido relatados no Brasil desde 1999. A maioria das manifestações zoonóticas acometeram o gado leiteiro e ordenhadores, porém, também foram associados a inúmeros outros hospedeiros no Brasil. Anticorpos anti *Orthopoxvirus* foram encontrados em búfalos que estavam em isolamento geográfico na Ilha de Marajó, no estado do Pará, e em macacos silvestres da Amazônia brasileira (CAMPOS *et al.*, 2011; FRANCO-LUIZ *et al.*, 2016; ABRAHÃO *et al.*, 2010).

Apesar da reemergência das infecções causadas por *Orthopoxvirus*, particularmente nos casos de infecções por VACV, a resposta imune do hospedeiro humano a este vírus é pouco compreendida. A maior parte dos estudos direcionados a compreensão da resposta imunológica em humanos, foi feita através da avaliação de indivíduos vacinados com amostras vacinais de VACV (PANCHANATHAN *et al.*, 2008;

GOMES *et al.*, 2012). As amostras vacinais escolhidas apresentam certo grau de atenuação, sendo assim a resposta imune manifestada pelo hospedeiro contra as amostras vacinais não é igual a encontrada em infecções por amostras virulentas de VACV. Outra consideração importante é que durante o processo de atenuação viral dessas amostras vacinais, pode ocorrer perda de genes relacionados com a patogênese da doença, como os genes envolvidos na produção de proteínas imunomoduladoras, alterando o padrão da resposta imune observada no hospedeiro (GOMES *et al.*, 2012).

Dessa maneira, analisar as amostras virais GP1V e PSTV, obtidas de surtos zoonóticos em propriedades rurais no estado de Minas Gerais (LEITE *et al.*, 2005; TRINDADE *et al.*, 2006), representa uma oportunidade para elucidar a resposta desses vírus provocada no hospedeiro frente à infecção por amostras com diferentes padrões de virulência, contribuindo para compreensão dos mecanismos patogênicos envolvidos na resposta aguda contra esses vírus. A utilização de camundongos como modelo de estudo é importante para produção de dados que possam gerar conhecimento para comparar com o que já se sabe sobre a infecção por VACV em humanos. Nesse sentido, ratificar os resultados obtidos e aumentar nosso conhecimento sobre a patogênese viral por isolados que apresentam perfis patogênicos diferentes e sua capacidade de afetar vias de resposta celulares a partir de infecções por *Orthopoxvirus*.

### **3- OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

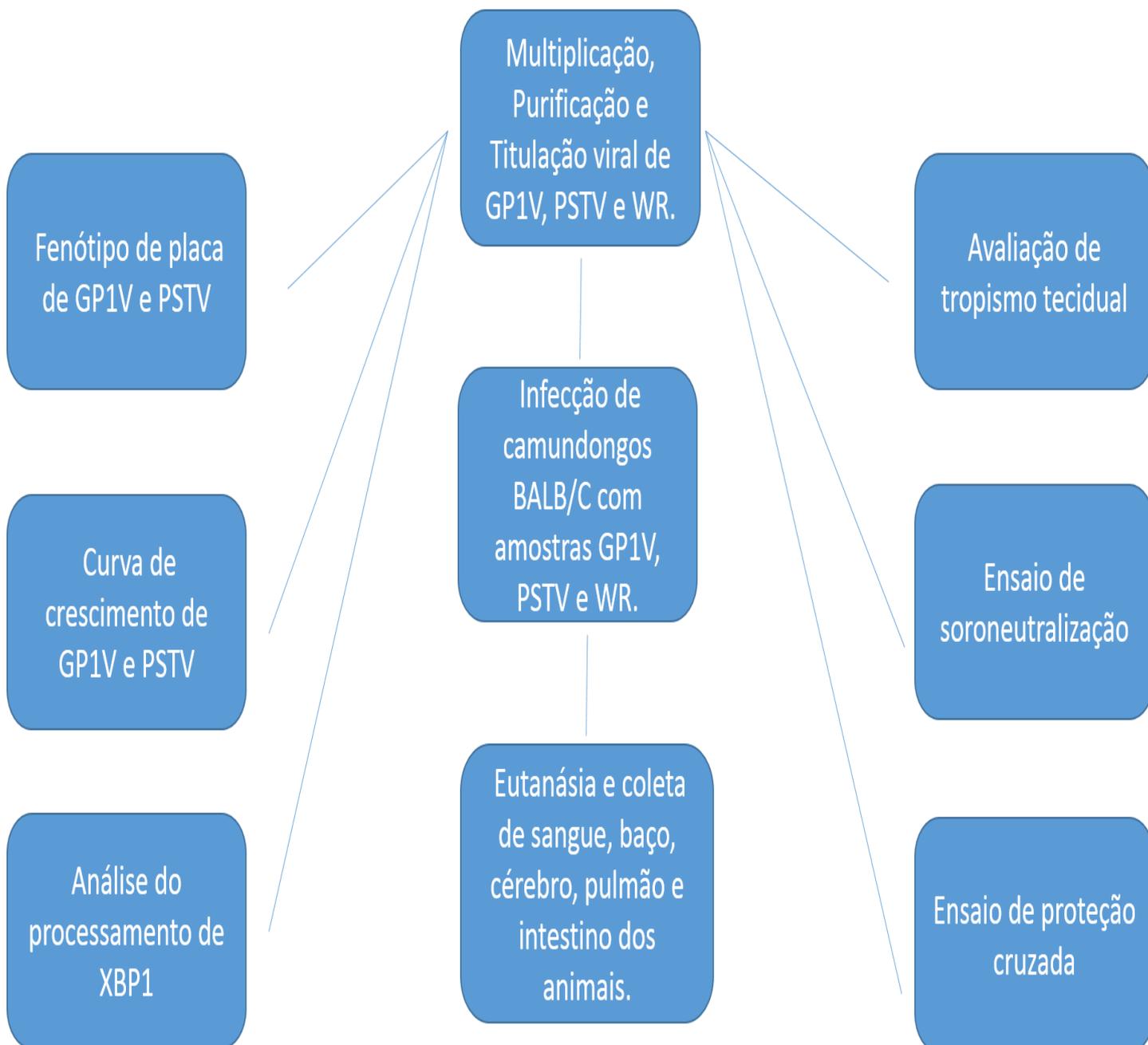
- Avaliar a capacidade de amostras virulentas e avirulentas de VACV, isoladas no Brasil, em modular respostas de estresse celular à infecção, assim como seu tropismo tecidual, produção de anticorpos neutralizantes com possibilidade de neutralização cruzada.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o perfil biológico de vírus GP1V e PSTV *in vitro*.
- Avaliar, em modelo murino, tropismo dos vírus GP1V e PSTV em comparação com WR.
- Avaliar a modulação de vias de estresse do retículo citoplasmático em células infectadas com os vírus GP1V e PSTV em comparação com WR.
- Avaliar a produção de anticorpos neutralizantes produzidos por hospedeiros murinos em resposta à infecção pelos vírus GP1V e PSTV em comparação com WR. E avaliar a neutralização cruzada dos anticorpos produzidos durante a resposta à infecção pelos vírus GP1V e PSTV em comparação com WR.

## 4- METODOLOGIA

### 4.1 Estratégia de trabalho



## **4.2 Produção das amostras trabalho**

### ***4.2.1 Origem das amostras***

O isolado de VACV PSTV, foi obtido em 2003 na cidade de Passa Tempo (2005) por Leite e colaboradores em Minas Gerais, durante um surto de infecção zoonóticas. O isolado GP1V, foi obtido de Trindade e colaboradores (2006) em 2001 na cidade de Guarani, Minas Gerais, Brasil. A partir de então, as amostras foram rotineiramente cultivadas, purificadas e tituladas no Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil e foram gentilmente cedidas pela Prof<sup>a</sup> Dra. Erna Geessien Kroon. O VACV-WR foi gentilmente cedido pelo Dr. Bernard Moss (NIAID/NIH, Bethesda, EUA), sendo aplicado como amostra padrão nos experimentos.

### ***4.2.2 Multiplicação viral***

Para a multiplicação viral foi usada a metodologia descrita por Campos e Kroon (1993). Os estoques dos vírus GP1V, PSTV e VACV-WR foram obtidos através da multiplicação em células epiteliais de rins de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) (BSC-40), em Meio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) (Sigma®) suplementado com antibióticos (Estreptomicina a 10mg/ml e Penicilina a 100 U/mL), antifúngico Anfotericina B a 25 µg/ml) e 10% de soro fetal bovino (SFB- Cultilab, Campinas, Brasil) em garrafas de cultivo celular (TPP – Trasadingen, Suíça), a 37° C, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific Forma® Series II 3111 Water- Jacket CO<sub>2</sub> Incubator) até atingirem confluência total. As monocamadas de células confluentes foram infectadas com multiplicidade de infecção (M.O.I) de 0,01 PFU (unidades formadoras de placa). Após 1 hora de adsorção viral, foram acrescentados 50 mL de DMEM suplementado com 1% de SFB. Novamente as células foram mantidas a 37° C e monitoradas diariamente ao microscópio óptico até o aparecimento de 90% de efeito citopático (ECP), cerca de 48 horas após a infecção. A seguir, o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas com solução salina EDTA tamponada com fosfato

(PBS) 1X (1.5 mM NaCl; 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7.2) e desprendidas da garrafa com cerca de 3 mL de tripsina 0.25%. A suspensão obtida desse processo foi centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B) a 4° C e o sedimento foi preservado a -70° C para subsequente purificação das partículas virais.

#### ***4.2.3 Purificação viral***

A purificação das partículas virais foi feita de acordo com a metodologia descrita por Joklik (1962). Em síntese, o sedimento obtido no processo de multiplicação viral, foi homogeneizado em 8 mL de Tris-HCL, pH 8,0 e centrifugado a 2.500 rpm (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B) por 15 minutos a 4° C. O sobrenadante obtido foi conservado em gelo, nesse intervalo fizemos a lise do sedimento celular em 10 mL de solução de lise (1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM KCl). Em seguida, a suspensão obtida foi incubada em gelo durante 10 minutos e as células foram lisadas mecanicamente em homogeneizador do tipo “*Douncer*” (Wheaton, USA) por 80 vezes. Este processo foi realizado duas vezes. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 2.500 rpm por 15 minutos a 4° C. A suspensão resultante, contendo vírus e debris celular, foi coletada e centrifugada em colchão de sacarose (25 a 40%) a 12. 000 rpm (rotor AH 629 - ultracentrífuga Sorvall), 4° C, por 2 horas, para a remoção dos debris celulares. Ao término do procedimento o sobrenadante e a sacarose foram desprezados e o sedimento contendo as partículas virais foi ressuspensos em 1 mL de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. O material obtido a ser utilizado nos demais experimentos, foi distribuído em alíquotas e armazenados a -70 ° C.

#### ***4.2.4 Titulação Viral***

Para o processo de titulação viral foi utilizada a metodologia descrita por Campos e Kroon (1993). Resumidamente, células BSC-40 foram cultivadas em placas de seis poços (poço de 9,6cm<sup>2</sup> - TPP – Trasadingen, Suíça) por 16 a 24 horas a 37° C, em meio MEM, até 100% de confluência.

Um poço foi utilizado para controle de viabilidade celular. Nos cinco poços restantes o meio foi descartado e foram adicionados 500 mL de várias diluições diferentes dos vírus sob a monocamada celular. Depois de 1 hora de adsorção viral, 2 mL de D-

MEM (Sigma®) contendo 1% de SFB (Cultilab, Campinas, Brasil) foi adicionado aos poços e as placas foram então incubadas na estufa (Thermo Scientific, EUA) durante um período de 48 horas, a 37° C, em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. Após 48 horas, as culturas foram fixadas com formol a 4% e coradas com solução de cristal violeta a 1% (p/v) em etanol 20%, por 15 minutos. Para o cálculo da titulação viral foi utilizado o poço da diluição contendo entre 30 a 300 placas de lise, seguindo o cálculo:

*Título = números de placas virais X inverso da diluição X soma dos volumes em mL*

#### **4.2.5 Fenótipo de placa**

O efeito citopático dos VACVs foi observado através da formação de placas de lise. Sendo assim, o ensaio de fenótipo de placa foi utilizado para verificar, comparativamente, a morfologia das placas de lise apresentada pelos vírus GP1V e PSTV.

Células BSC-40 foram cultivadas em placas de 6 poços (poço de 9,6cm<sup>2</sup> - TPP – Trasadingen, Suíça) e incubadas na estufa (Thermo Scientific, EUA) a 37° C em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5% até atingirem 90% de confluência. Subsequentemente, as células foram inoculadas com os isolados GP1V e PSTV, com 50 PFUs e incubadas por 48 horas em estufa (Thermo Scientific, EUA) a 37° C em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. Após 48 horas de incubação, as células infectadas foram fixadas com solução de 4% de formol e coradas com cristal violeta a 1%.

### **4.3 Caracterização *in vitro* das amostras virais purificadas**

#### **4.3.1 Curva de crescimento de ciclo único**

Para determinar as curvas de ciclo único das amostras GP1V e PSTV foram utilizadas células BSC-40, cultivadas em placas de 6 poços (poço de 9,6cm<sup>2</sup> - TPP – Trasadingen, Suíça) e suplementadas com meio D-MEM 10 % de SFB (Sigma®).

Após crescimento da monocamada celular, o meio foi descartado e a solução viral inoculada em uma M.O.I de 10. Após uma hora de adsorção, em que as células foram

mantidas em estufa (Thermo Scientific, EUA) a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a monocamada celular foi lavada com PBS 1X. Em seguida, foi adicionado meio D-MEM a 2.5% de SFB (Cultilab, Campinas, Brasil) e as placas foram então, novamente, incubadas em estufa nas condições previamente indicadas, onde permaneceram por diferentes tempos (3, 6, 12, 24 e 48 horas de infecção). Em cada tempo indicado as células foram removidas mecanicamente e coletadas juntamente com seu sobrenadante.

Esse produto foi então submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento para lise celular, sendo posteriormente titulado, como descrito no item **4.2.4** deste projeto, para determinação do número total de partículas viáveis produzidas.

#### ***4.3.2 Curva de crescimento em múltiplos ciclos***

Para determinar as curvas de múltiplos ciclos das amostras GP1V e PSTV foram utilizadas células BSC-40, cultivadas em placas de 6 poços (poço de 9,6cm<sup>2</sup> - TPP – Trasadingen, Suíça) e suplementadas com DMEM 10% de SFB (Sigma®).

Após crescimento celular, o meio foi descartado e a solução viral inoculada em uma M.O.I de 0,01. Após uma hora de adsorção, em que as células foram mantidas em estufa (Thermo Scientific, EUA) a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a monocamada celular foi lavada com PBS 1X. Em seguida, foi adicionado meio D-MEM a 2.5% de SFB (Cultilab, Campinas, Brasil). As placas foram então, novamente, incubadas em estufa nas condições previamente indicadas, onde permaneceram por diferentes tempos (6, 12, 24, 48 e 96 horas de infecção). Em cada tempo indicado as células foram removidas mecanicamente utilizando êmbolo de seringa e coletadas juntamente com seu sobrenadante.

Esse produto foi submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento para lise celular sendo posteriormente titulado, como descrito no item **4.2.4** deste projeto, para determinação do número total de partículas produzidas.

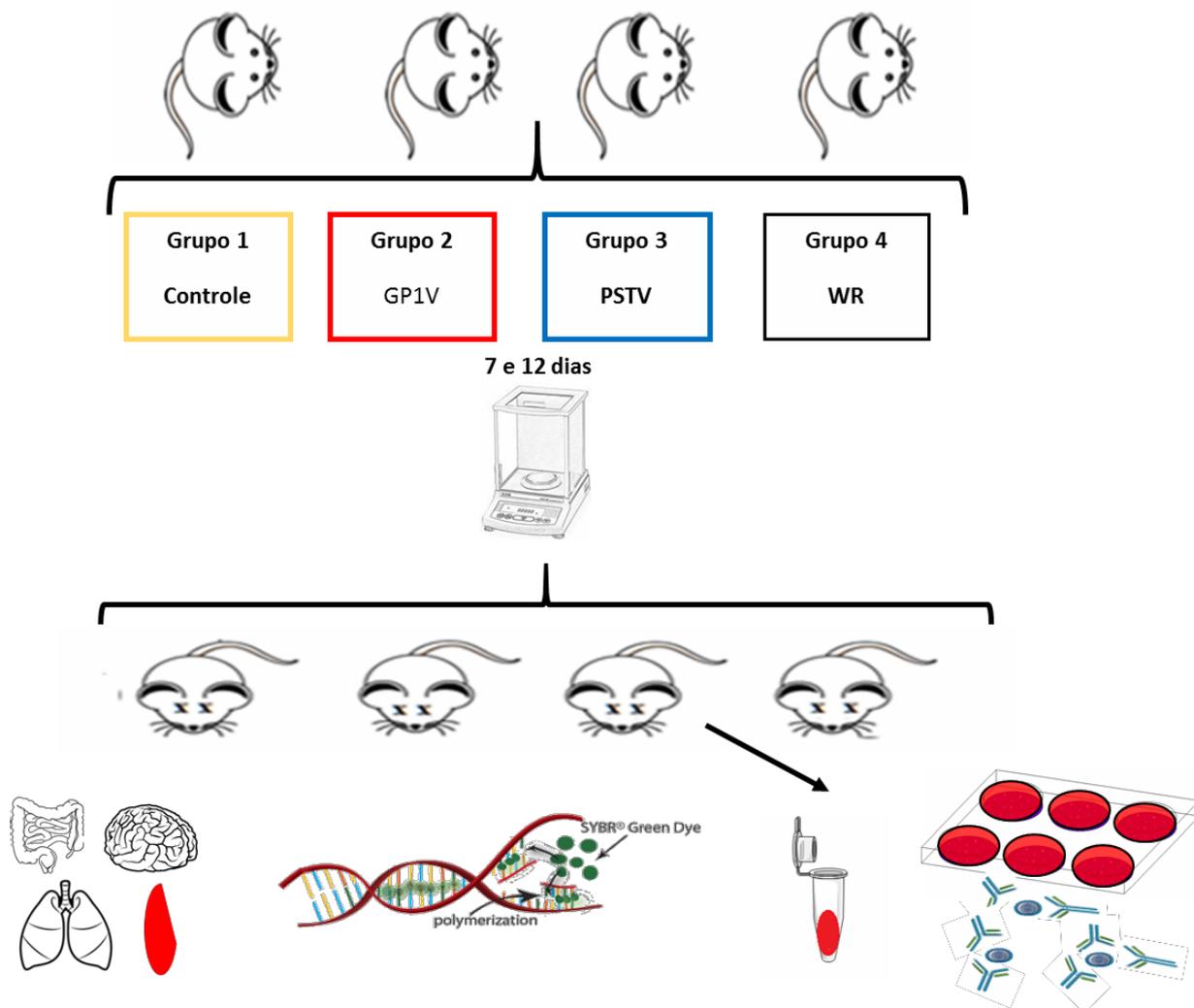
#### **4.4 Avaliação da infecção de camundongos BALB/c por VACV-WR, GP1V e PSTV**

##### ***4.4.1 Infecção de camundongos BALB/ c com os vírus VACV-WR, GP1V e PSTV***

Para a infecção foram utilizados camundongos fêmea BALB/c com 6 semanas de idade, cedidos pelo Biotério Central da UFMG (Belo Horizonte, Brasil) - UFMG. Durante a execução dos experimentos os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais e manipulados de acordo com as normas previstas pelo CEUA-UFMG. A utilização destes animais foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA-UFMG) sob o protocolo CEUA: 188/2017 (ANEXO 3).

Os camundongos foram divididos em quatro grupos de seis animais: Controle, GP1V, PSTV e WR, e foram infectados via intranasal (IN) (**figura 9**). Os grupos controle receberam 40 µL de PBS 1X. Os animais que foram infectados receberam  $10^6$  (3 grupos) e  $5 \times 10^3$  PFU (3 grupos) de vírus purificado, diluídos em 40 µL de PBS 1X estéril. Os camundongos foram anestesiados antes das infecções com uma injeção intraperitoneal de solução anestésica na proporção 3:1:4 de Ketamina 5% (*Vetanarcol – König*) (anestésico), Xilazina 2 % (*Calmiun – Agener União*) (sedativo, analgésico, relaxante muscular) e PBS 1X (aproximadamente 2 µL anestésico/grama de peso do animal). Para a via IN os animais receberam o inóculo através de uma pipeta automática.

Durante 7 e 12 dias os animais foram pesados e avaliados quanto ao aparecimento de sinais clínicos típicos da infecção pelos VACVs. Posteriormente a esse período os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram baço, pulmão, cérebro e intestino coletados para os ensaios subsequentes. A coleta do sangue total, para o ensaio de soroneutralização, foi realizada por meio de punção do plexo axilar.



**Figura 9 – Esquema de inoculação em camundongos Balb/c.** Os camundongos foram divididos em quatro grupos de seis animais: Controle, GP1V, PSTV e WR, e foram infectados via intranasal (IN). Durante 7 e 12 dias os animais foram pesados e tiveram seus sinais clínicos avaliados. Após esse período os animais foram sacrificados sendo coletados baço, pulmão, cérebro, intestino e sangue total para as análises seguintes.  
**Fonte:** Esquema produzido pela autora / Figuras retiradas do Google Imagens.

## **4.5 Avaliação do tropismo tecidual dos vírus VACV-WR, GP1V e PSTV em camundongos BALB/c**

### ***4.5.1 Processamento dos órgãos e extração de DNA***

Para a verificação do tropismo tecidual foram utilizados os seguintes órgãos: baço, pulmão, cérebro e intestino. Inicialmente, tais órgãos, obtidos de camundongos BALB/c inoculados com PBS, GP1V, PSTV e WR, foram coletados e em seguida, os órgãos foram macerados em PBS 1X com o auxílio de cadinhos e pistilos. O material obtido foi congelado e descongelado duas vezes em - 70° C, centrifugado a 3.000 rpm (IEC Centra MP4R Rotor 804), 4° C por 15 minutos, e teve seu sobrenadante coletado para posterior extração do DNA.

A extração do DNA total foi realizada pelo método do Fenol, Clorofórmio e Álcool Isoamílico (25:24:1) e a amplificação do DNA viral foi obtida por PCR em tempo real.

### ***4.5.2 PCR em tempo real***

A fim de avaliar o tropismo dos vírus estudados nos órgãos descritos no item **4.4.1** deste projeto, foi realizada uma PCR em tempo real para o gene HÁ de *Vaccinia virus* (*vgf*). A PCR em tempo real foi executada como descrito por Trindade e colaboradores (2008). Para a reação foram utilizados os seguintes reagentes: SYBR® Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems, Foster City, CA) contendo nucleotídeos, tampão, UDG, AmpliTaq®, referência passiva (ROX), água e o DNA viral extraído descrito no item **4.4.1** deste projeto, e iniciadores -Senso (*Forward*), sequência 5` -CGC TAC AAC AGA TAT AGC TAT CAG – 3` (tamanho: 27 b), e Anti-senso (*Reverse*) sequência 5` AGC GTC GAT ACA GTC ACC GTC TAA – 3` (tamanho: 24 b), em reações com 15 µL de volume final. A PCR foi realizada no equipamento *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*™ e as reações foram analisadas no software StepOne (AppliedBiosystem).

## **4.6 Avaliação da resposta humoral aguda de camundongos BALB/C frente à infecção por VACV-WR, GP1V e PSTV**

### ***4.6.1 Ensaio de soroneutralização***

O método de soroneutralização foi utilizado com o objetivo de detectar a presença de anticorpos contra os VACVs estudados. O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia utilizada por Trindade e colaboradores (2003). Os soros das amostras de sangue anteriormente coletadas foram aquecidos a 56° C, durante 30 minutos, para a inativação das proteínas do complemento. Foram utilizadas placas de 24 poços individualmente para cada soro contendo cerca de 10<sup>6</sup> células BSC-40. Os vírus foram diluídos seriadamente em meio DMEM, bem como, os soros que foram diluídos nas proporções 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320. Uma mistura contendo 200 µL da diluição do soro e a 200 µL de suspensão viral a 10<sup>2</sup> PFU foi preparada para cada soro. Essas soluções foram mantidas a 37° C por 16 horas, sendo posteriormente inoculadas em células BSC-40. As placas foram incubadas a 37° C e após 1 hora de adsorção foi adicionado meio MEM suplementado com 2.5% de SFB. As placas foram incubadas a 37° C por um período de 24 horas até o aparecimento de ECP. A revelação do ensaio foi realizada em seguida através da fixação das culturas com formol a 10% por 1 hora e coloração com solução de cristal violeta a 1% (p/v) em etanol 20%, por 1 hora. Como controles de viabilidade celular, inoculamos um poço apenas com células (controle negativo) e outra com 10<sup>2</sup> PFU da amostra viral (controle positivo).

## **4.8 Avaliação da modulação de vias de estresse do retículo citoplasmático**

### ***4.8.1 Extração do RNA total e síntese de cDNA***

O RNA total foi extraído das células A31 infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR, células tratadas com tunicamicida foram utilizadas como controle positivo. Foi utilizando TRI Reagent (Sigma) de acordo com as instruções do fabricante e antes da transcrição reversa, tratamos as amostras com rDNase I (Macherey-Nagel) para retirar a contaminação de DNA genômico residual.

O RNA extraído foi ressuspensionado em água previamente tratada com *diethylpyrocarbonate* (DEPC), e a concentração e pureza do RNA foi estimada por espectrofotometria (espectrofotômetro NanoVue, GE Healthcare Life Sciences).

Aliquotas das amostras de RNA foram submetidas a electroforese em gel desnaturante de 1% de agarose contendo brometo de etídio como corante para verificar a integridade das amostras. O cDNA foi sintetizado a partir do RNA, utilizando a enzima transcriptase reversa MMLV e oligo-dT (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante. O produto de transcrição reversa foi armazenado a -20 ° C.

#### ***4.8.2 Análise do processamento de XBP1***

Utilizamos o método de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição para identificar o efeito da infecção sobre o processamento do mRNA do fator de transcrição XBP1, principal substrato do sensor IRE1.

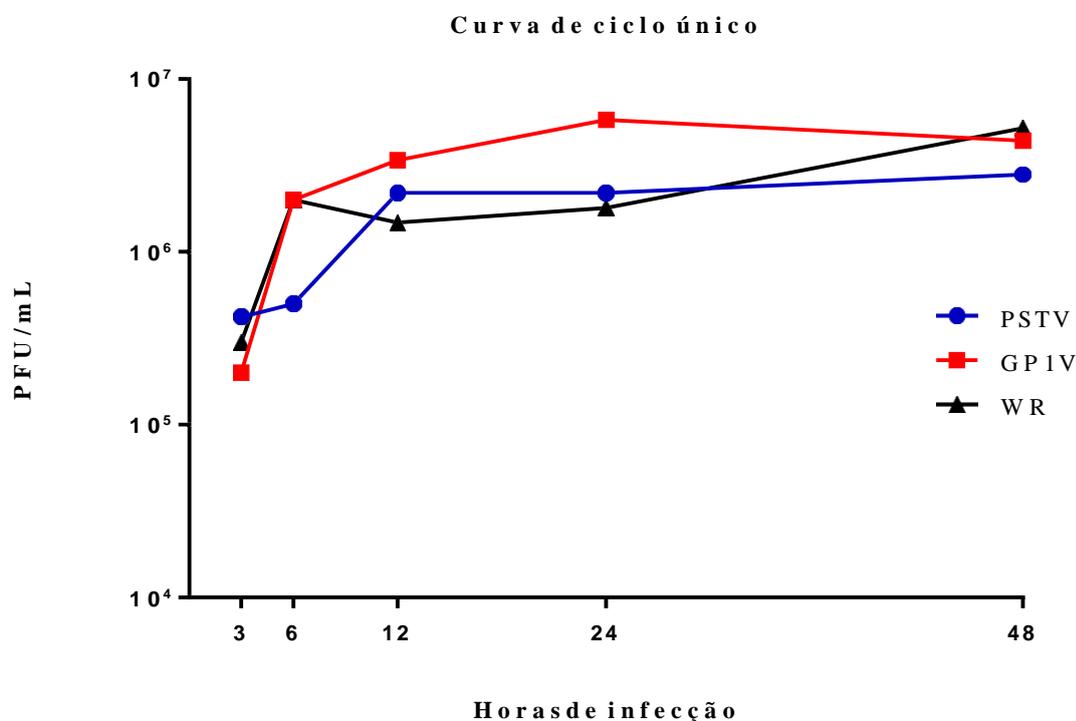
Paras as reações de amplificação por PCR, o cDNA foi utilizado em reações com a enzima DNA polimerase GoTaq® Flexi (Promega) de acordo com as instruções do fabricante e os iniciadores senso (5'-AAACAGAGTAGCAGCGCAGACTGC-3') e mXBP1.2AS anti-senso (5'-GGATCTCTAAACTAGAGGCTTGGTG-3') que amplificam um produto de DNA de 600 pb abrangendo os locais de clivagem por IRE1 (CALFON et al., 2002). As condições de ciclagem foram 94°C/4' seguido de 35 ciclos de 94°C/10", 68°C/30", 72°C/30", e extensão final a 72°C/10'. Um terço do volume da reação de RT-PCR foi submetido à digestão enzimática com PstI (Promega) a 37°C por 3 horas. Os produtos foram analisados em gel de agarose a 1,4% contendo brometo de etídio (Life Technologies). Os géis foram fotografados usando o sistema de imagens UVP MultiDoc-It e as bandas quantificadas utilizando o programa ImageJ (NIH). O percentual da forma processada foi calculado subtraindo a quantidade de XBP1s do total (soma das isoformas).

## 5 – RESULTADOS

### 5.1 Caracterização Biológica

#### 5.1.1 Curva de crescimento de ciclo único

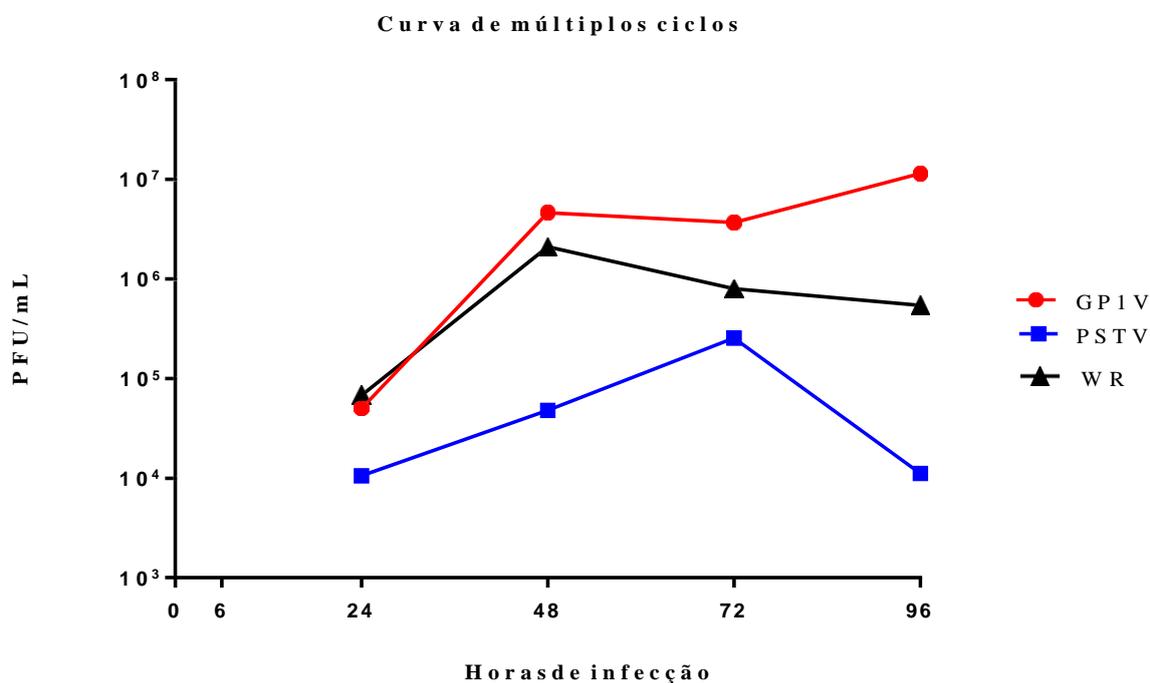
A primeira etapa do nosso trabalho consistiu na produção da curva de ciclo único das amostras GP1V, PSTV e WR. Esses ensaios foram realizados em células BSC40, infectadas com uma M.O.I. de 10 e incubadas nos tempos de 2, 6, 12, 24 e 48 horas de infecção. Para os diferentes tempos de infecção, o título viral foi determinado em células BSC40. Os vírus GP1V e WR, apresentam curvas de perfil similar. PSTV apresenta no tempo de 6 horas 1 log a menos que GP1V e WR (figura 10). Essa diferença, no entanto, se reduz ao final de 48 horas de infecção em níveis não significativos.



**Figura 10 - Curva de ciclo único dos vírus GP1V, PSTV e WR.** Monocamadas de BSC40 foram infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR em M.O.I de 10. A monocamada celular foi incubada nos tempos de 2, 6, 12, 24 e 48.

### 5.1.2 Curva de crescimento em múltiplos ciclos

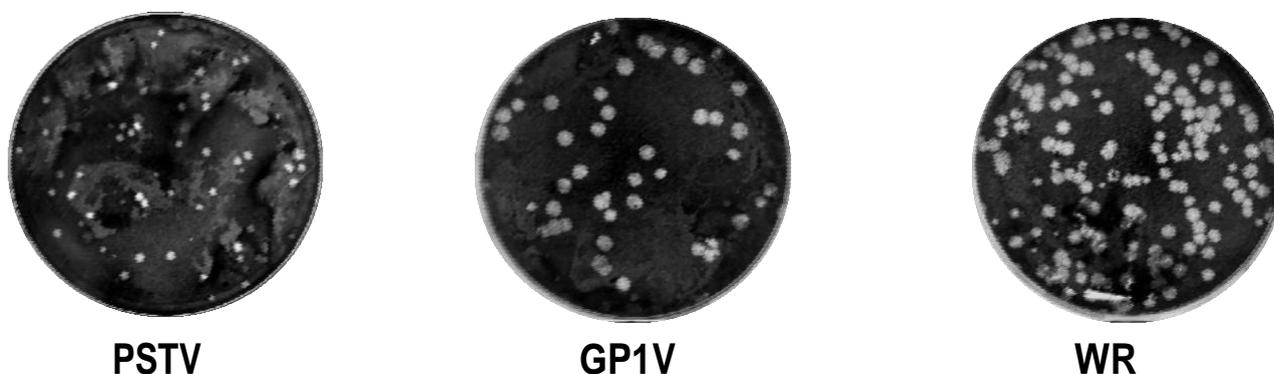
Neste experimento comparamos a infectividade dos vírus GP1V, PSTV e WR, em células BSC40, através da obtenção de curva de crescimento de múltiplos ciclos. Para isso, as células foram infectadas com uma M.O.I. de 0,01 e coletados nos tempos de 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após infecção. Para diferentes tempos de infecção, o título viral foi determinado em células BSC40. Nesse ensaio o vírus GP1V, apresenta também um perfil semelhante ao do WR até o tempo de 72h, no tempo de 96h ele apresenta 1 log a mais que WR. Já o PSTV nos tempos de 48, 72, 96h apresenta 1 log a menos que GP1V (figura 11). Chama a atenção o fato de que, ao final de 96 horas, título avaliado de PSTV cai drasticamente, o que pode significar uma baixa infectividade célula a célula dessa amostra viral.



**Figura 11 – Curva de múltiplos ciclos dos vírus GP1V, PSTV e WR.** Monocamadas de BSC40 foram infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR em M.O.I de 0,01. A monocamada celular foi incubada nos tempos de 6, 24, 48, 72 e 96 horas.

### 5.1.3 Fenótipo de placa

O ensaio de fenótipo de placas virais foi realizado para observar a morfologia das placas de lise em células BSC40, dos vírus GP1V, PSTV e WR. A monocamada foi infectada com 50 PFUs desses vírus, e incubada por 48 horas. Nesse ensaio é possível observar que GP1V, apresenta placas de lise de tamanho similar ao do WR, enquanto PSTV apresenta placas significativamente menores (figura 12).



**Figura 12 – Ensaio de fenótipo de placa.** Os ensaios de fenótipo de placa dos vírus GP1V, PSTV e WR, foram realizados em células BSC40, infectadas com 50 PFUs desses vírus e incubadas por 48 horas. Após esse tempo as células foram fixadas com solução de 4% de formol e coradas com cristal violeta a 1%.

### 5.2 - Avaliação da infecção de camundongos BALB/c por VACV-WR, GP1V e PSTV.

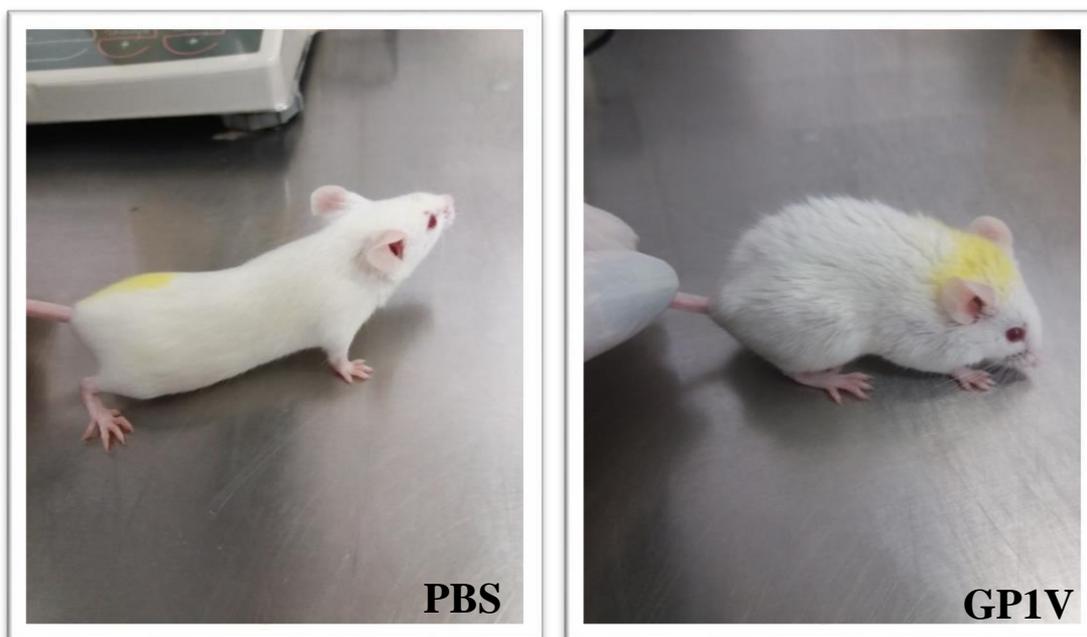
Vinte e quatro camundongos Balb/c fêmeas foram inoculadas pela via intranasal com as amostras virais GP1V, PSTV e WR, sendo seis representantes por grupo. Todos os grupos foram inoculados pela via intranasal em concentrações virais de  $1 \times 10^6$  em um volume de 40  $\mu$ l, diluídos em PBS 1X estéril (figura 13).



**Figura 13 - Inoculação intranasal.** Os animais foram inoculados pela via intranasal com auxílio de pipeta automática. Os vírus GP1V, PSTV e WR, foram diluídos em um volume final de 40  $\mu$ l, diluídos em PBS 1X estéril.

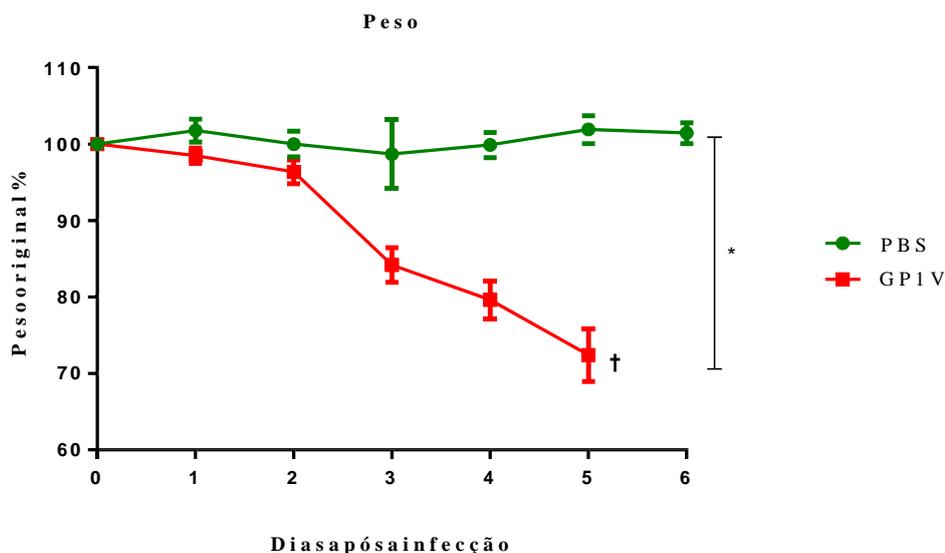
### **5.2.2 Sinais clínicos observados nos camundongos BALB/c inoculados com GP1V**

Os camundongos infectados com infectados com  $1 \times 10^6$  do vírus GP1V, apresentaram sinais mais acentuados após a infecção. Foi observado nesses animais eriçamento de pelo, arqueamento de dorso e secreção ocular (figura 16).



**Figura 14 - Sinais clínicos apresentados pelos camundongos Balb/c infectados com GP1V.** Os camundongos infectados com GP1V, apresentaram sinais clínicos graves da infecção, como eriçamento de pelo, arqueamento de dorso e secreção ocular. Os animais inoculados com PBS não apresentaram nenhum sintoma clínico da infecção pelos VACV.

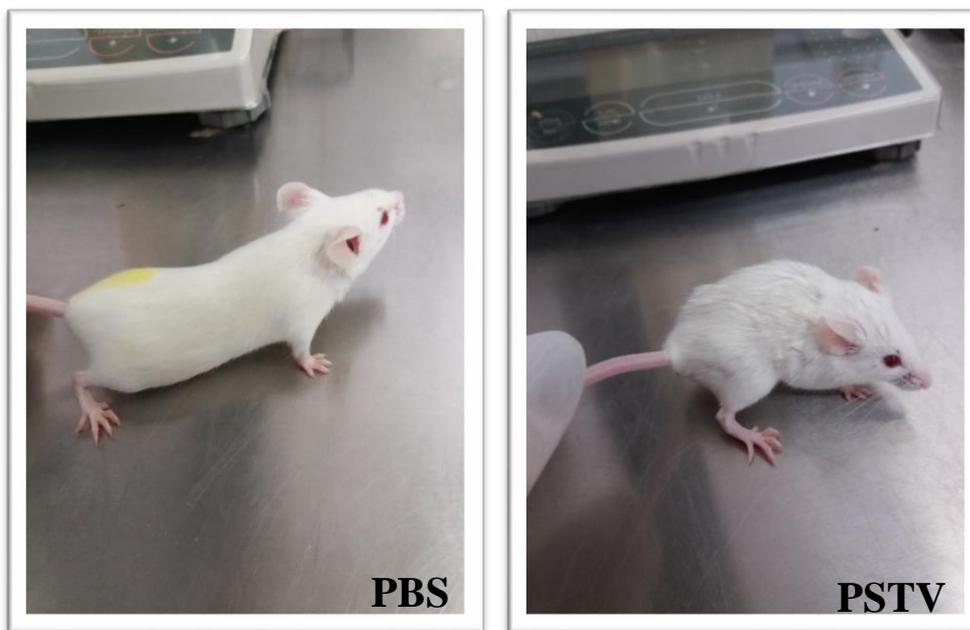
Esses animais apresentaram perda de peso significativa quando comparados ao grupo inoculado com PBS (figura 18). Esses animais perderam mais de 25% do peso inicial, entre o 4º e 5º dia após a infecção, e foram sacrificados de acordo com as recomendações do conselho de ética.



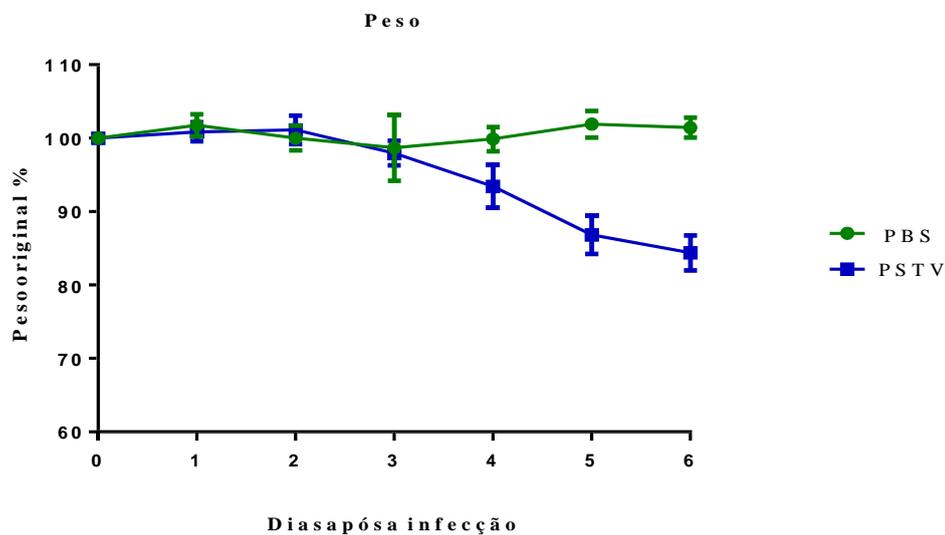
**Figura 15 - Variação de peso dos camundongos Balb/c infectados com GP1V em comparação com animais inoculados com PBS.** Após 2º dia, os animais inoculados com  $1 \times 10^6$  do vírus GP1V, apresentaram uma acentuada perda de peso em relação aos animais inoculados com PBS, essa perda de peso foi estatisticamente significativa em relação ao grupo PBS. As análises estatísticas foram realizadas através do T TEST two-sided: \*  $P < 0,05$ .

### 5.2.1 Sinais clínicos observados nos de camundongos BALB/c inoculados com PSTV

Os camundongos infectados com  $1 \times 10^6$  do vírus PSTV, apresentaram sintomas brandos após a infecção. Foi observado nesses animais eriçamento de pelo (figura 16). Esses animais apresentaram uma leve perda de peso quando comparados ao grupo inoculado com PBS (figura 15). Nenhum animal pertencente ao grupo infectado com PSTV e PBS morreu durante o período de experimentação.



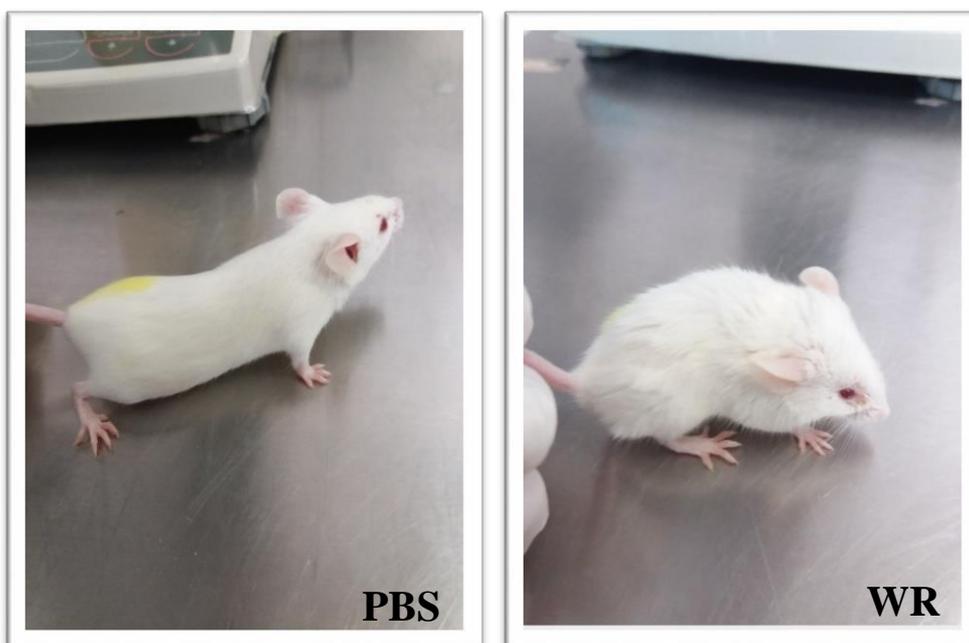
**Figura 16 – Sinais clínicos apresentados pelos camundongos Balb/c infectados com PSTV.** Os animais apresentaram leve perda de peso e eriçamento de pelo. Os animais inoculados com PBS, não apresentaram nenhum sinal clínico da infecção pelos VACV.



**Figura 17 - Variação de peso dos camundongos Balb/c infectados com PSTV em comparação com animais inoculados com PBS.** Após 2º dia, os animais inoculados com  $1 \times 10^6$  do vírus PSTV, apresentaram perda de peso em relação aos animais inoculados com PBS, essa perda de peso não foi estatisticamente significativa.

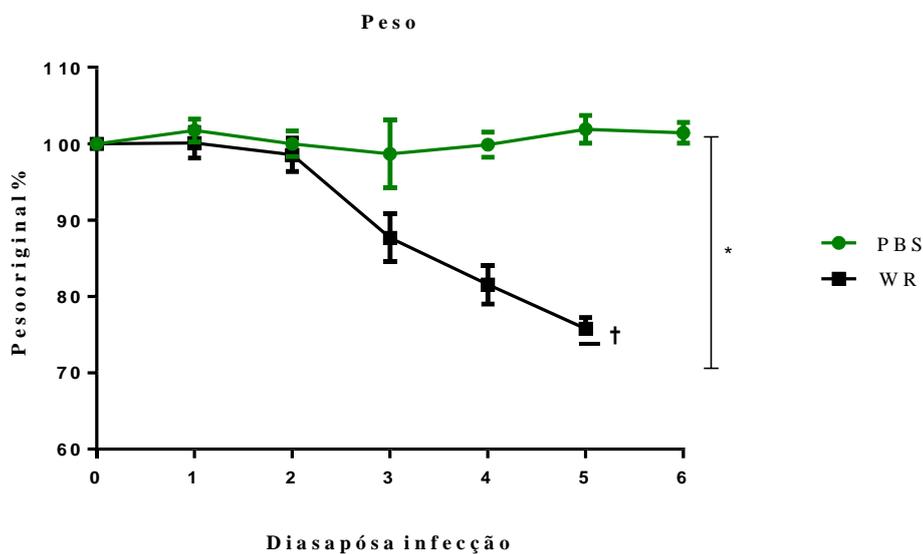
### 5.2.3 Sinais clínicos observados nos de camundongos BALB/c inoculados com WR

Os camundongos infectados com  $1 \times 10^6$  do vírus WR, também apresentaram sintomas pronunciados após a infecção. Foi observado nesses animais eriçamento de pelo, arqueamento de dorso e secreção ocular (figura 18).

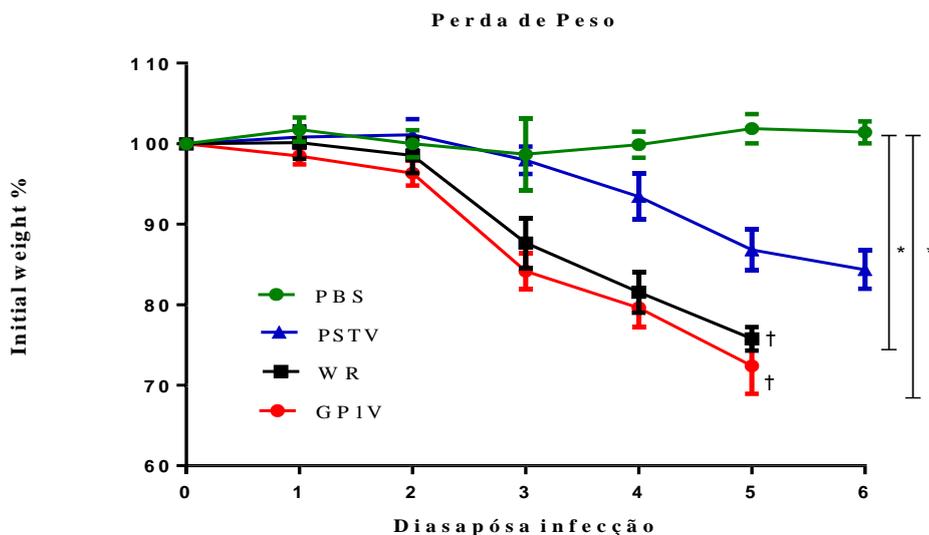


**Figura 18 - Sinais clínicos apresentados pelos camundongos Balb/c infectados com WR.** Os camundongos infectados com WR, apresentaram sinais clínicos graves da infecção como eriçamento de pelo, arqueamento de dorso e secreção ocular. Os animais inoculados com PBS, não apresentam nenhum sintoma clínico da infecção pelos VACV.

Esses animais apresentaram perda de peso significativa quando comparados ao grupo inoculado com PBS (figura 19). Esses animais perderam mais de 25% do peso inicial, no 5º dia após a infecção, e foram sacrificados de acordo com as recomendações do conselho de ética.



**Figura 19 - Variação de peso dos camundongos Balb/c infectados com WR em comparação com animais inoculados com PBS.** Após 2º dia, os animais inoculados com  $1 \times 10^6$  do vírus WR, apresentaram uma acentuada perda de peso em relação aos animais inoculados com PBS, essa perda de peso foi estatisticamente significativa em relação ao grupo PBS. As análises estatísticas foram realizadas através do T TEST two-sided: \*  $P < 0,05$ .

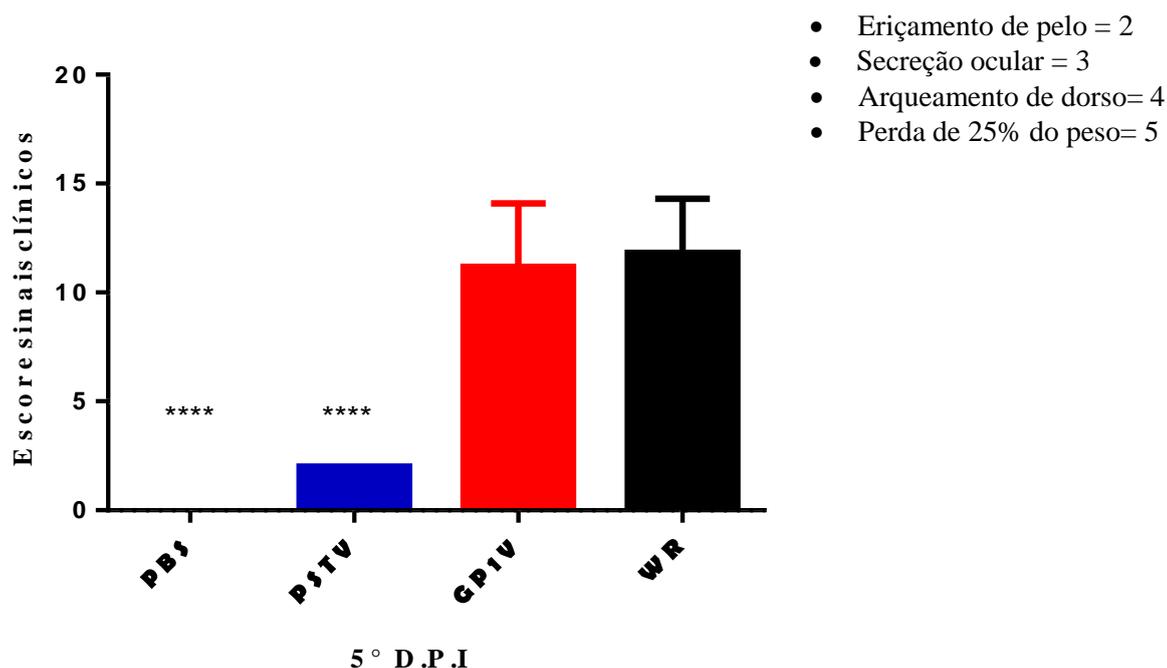


**Figura 20 - Variação de peso dos camundongos Balb/c infectados com os vírus GP1V, PSTV e WR.** Gráfico com a variação de peso dos animais infectados com os três vírus.

#### 5.2.4 Avaliação de escore clínico

Os camundongos infectados com  $1 \times 10^6$  dos vírus GP1V, PSTV e WR, foram avaliados quanto ao aparecimento de sinais clínicos após a infecção. Os sinais clínicos foram avaliados no 5º dia após a infecção e cada sinal clínico observado recebeu pontuação. Os sinais clínicos avaliados durante esse experimento foram: edema de chanfro (1 ponto), eriçamento de pelo (2 pontos), secreção ocular (3 pontos), arqueamento de dorso (4 pontos) e perda de mais de 25% do peso (5 pontos) (figura 21).

Os animais infectados com GP1V e WR apresentaram um perfil similar de sinais clínicos, com manifestação de sinais expressivos da infecção. Esses dois grupos apresentaram: eriçamento de pelo, secreção ocular, arqueamento de dorso e perda de mais de 25% do peso. O grupo infectado com PSTV, apresentou um perfil moderado de sintomas após a infecção, exibindo eriçamento de pelo e perda de peso.



**Figura 21 - Escore clínico dos animais infectados com GP1V, PSTV e WR:**

Escore clínico dos camundongos infectados com  $1 \times 10^6$  dos vírus GP1V, PSTV e WR. Os sinais foram avaliados no 5° dia após a infecção e receberam pontuações diferentes: edema de chanfro (1 pontos), eriçamento de pelo (2 pontos), secreção ocular (3 pontos), arqueamento de dorso (4 pontos) e perda de mais de 25% do peso (5 pontos). As análises estatísticas foram realizadas através do ORDINARY ONE-WAY ANOVA *Tukey's multiple comparisons test*: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  \*\*\*  $P < 0.001$  \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

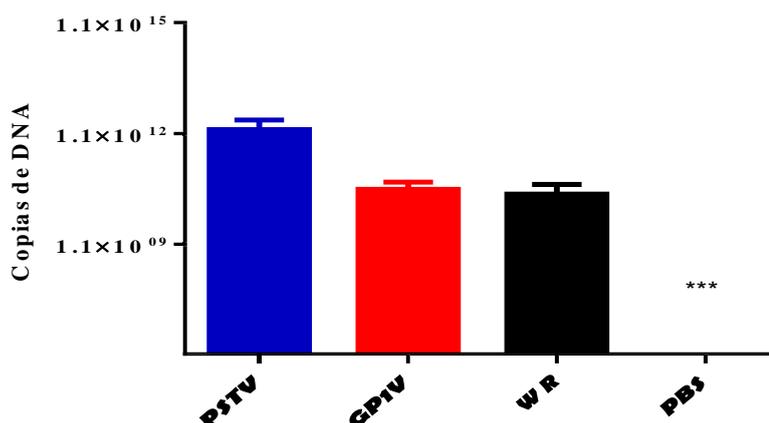
### 5.3 Avaliação do tropismo sistêmico dos vírus VACV-WR, GP1V e PSTV em camundongos BALB/c

Para avaliação do tropismo tecidual, os camundongos Balb/c foram inoculados pela via intranasal, em concentrações virais de  $1 \times 10^6$  dos vírus GP1V, PSTV e WR, em um volume de 40  $\mu$ L diluídos em PBS 1X estéril. Foi realizada a extração de DNA do baço, cérebro, intestino e pulmão desses animais, pelo método do Fenol, Clorofórmio e Álcool Isoamílico (25:24:1). A reação de PCR *em tempo real* para o gene *vgf*, foi desenvolvida usando-se os seguintes volumes de reagentes: SYBR® Green PCR Master Mix (7,5  $\mu$ L), CXR (0,15  $\mu$ L), DNA extraído (2  $\mu$ L), iniciadores (PAF e PAR) (0,8  $\mu$ L)

e H<sub>2</sub>O (4, 55 µL). A curva padrão foi preparada a partir da extração do DNA do vírus VACV-WR, diluída a partir do fator de diluição 1:10. As condições de amplificação foram: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e curva de Melt de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos.

### 5.3.1 Avaliação do tropismo viral no pulmão

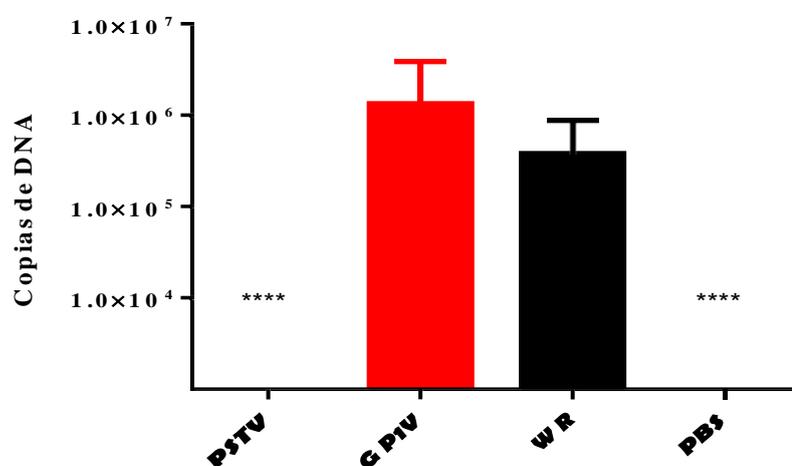
Para a PCR *em tempo real* do pulmão, utilizamos o DNA extraído desse tecido dos seis animais do grupo. Os animais infectados com GP1V e WR apresentaram menor quantidade de DNA viral no pulmão em relação aos animais infectados com PSTV (figura 21). Contudo, todos os animais infectados apresentaram títulos significativos de DNA viral no pulmão.



**Figura 22 - Quantificação do número e cópias de DNA dos vírus GP1V, PSTV e WR no pulmão dos camundongos Balb/c.** Quantificação realizada por meio de extração de DNA do pulmão de camundongos Balb/c inoculados com  $1 \times 10^6$  dos vírus GP1V, PSTV e WR, amplificação realizada mediante PCR *em tempo real*. As análises estatísticas foram realizadas através do ORDINARY ONE-WAY ANOVA *Tukey's multiple comparisons test*: \* P < 0.05 \*\* P < 0.01 \*\*\* P < 0.001 \*\*\*\* P < 0.0001.

### 5.3.2 Avaliação do tropismo viral no baço

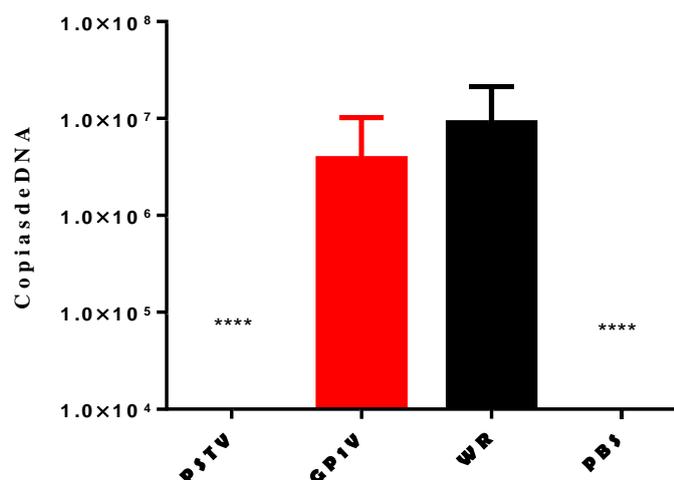
Para a PCR *em tempo real* do baço, utilizamos o DNA extraído desse tecido dos seis animais do grupo. Os animais infectados com GP1V e WR apresentaram quantidade significativa de DNA viral no baço. Entretanto, não foi observado DNA do vírus PSTV no baço dos animais infectados com essa amostra viral (figura 23). Esse resultado foi compatível com os dados de crescimento em múltiplo ciclo, apresentados na figura 11.



**Figura 23 - Quantificação do número e cópias de DNA dos vírus GP1V, PSTV e WR no baço dos camundongos Balb/c.** Quantificação realizada por meio de extração de DNA do baço de camundongos Balb/c inoculados com  $1 \times 10^6$  dos vírus GP1V, PSTV e WR, amplificação realizada mediante PCR *em tempo real*. As análises estatísticas foram realizadas através do ORDINARY ONE-WAY ANOVA *Tukey's multiple comparisons test*: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  \*\*\*  $P < 0.001$  \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

### 5.3.3 Avaliação do tropismo viral no cérebro

Para a PCR *em tempo real* do cérebro, utilizamos o DNA extraído desse tecido dos seis animais do grupo. Os animais infectados com GP1V e WR apresentam quantidade significativa de DNA viral no cérebro. Entretanto, não foi observado DNA do vírus PSTV no baço dos animais infectados com essa amostra viral (figura 24).



**Figura 24 - Quantificação do número e cópias de DNA dos vírus GP1V, PSTV e WR no cérebro dos camundongos Balb/c.** Quantificação realizada por meio de extração de DNA do cérebro de camundongos Balb/c inoculados com  $1 \times 10^6$  dos vírus GP1V, PSTV e WR, amplificação realizada mediante PCR *em tempo real*. As análises estatísticas foram realizadas através do ORDINARY ONE-WAY ANOVA *Tukey's multiple comparisons test*: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  \*\*\*  $P < 0.001$  \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

### 5.3.4 Avaliação do tropismo viral no intestino

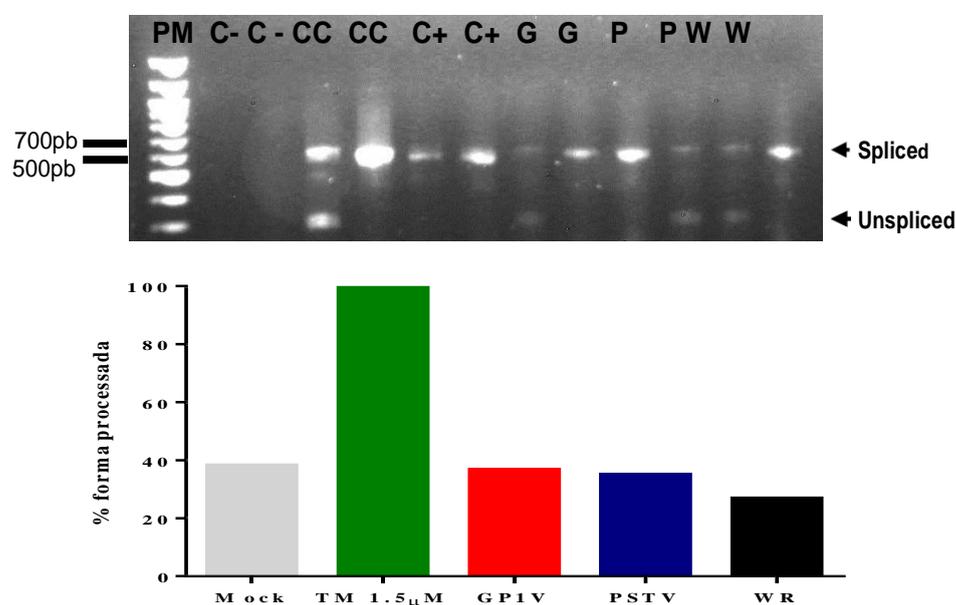
Para a PCR *em tempo real* do intestino, utilizamos o DNA extraído desse tecido dos seis animais do grupo. Não foi encontrado mediante PCR *em tempo real*, DNA dos vírus GP1V, PSTV e WR, nos grupos de animais infectados com essas amostras, nos tempos avaliados.

## 5.4 Avaliação da modulação de vias de estresse do retículo citoplasmático

### 5.4.1 Análise do processamento do fator de transcrição XBP-1

Esse experimento foi realizado como uma análise inicial, exploratória, da capacidade dos diferentes vírus em modularem respostas do hospedeiro. Escolhemos esse tipo de análise uma vez que o estudante de doutorado, Thiago Leão, observou a

capacidade de algumas diferentes amostras de VACVs em modular negativamente a via UPR (LEÃO, 2017 - dados não publicados). A fim de avaliar a ativação de vias de estresse do RE, pesquisamos o processamento do fator de transcrição XBP-1, após 24 horas de infecção (h.p.i) em uma M.O.I de 1, utilizando ensaios de PCR-RFLP e densitometria. Foi verificado que, os níveis de XBP1 processado chegam a quase 100% nas células tratadas com 1  $\mu$ M de tunicamicina (inibidor de glicosilação, ativador da via UPR), utilizado como controle positivo, enquanto os níveis nas células infectadas com os VACV não sofrem alterações significativas (FIGURA 24). A figura é resultado de apenas um experimento.



**Figura 25- Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA (PCR-RFLP) de células infectadas com os VACV.** Visualização após fracionamento eletroforético dos amplicons em gel de poliacrilamida 6% e TBE 1X. A quantificação das bandas correspondentes à forma íntegra e a forma processada de XBP1 foi executada utilizando o programa ImageJ (NIH).

### 5.5 Avaliação da resposta humoral aguda de camundongos BALB/C frente à infecção por VACV-WR, GP1V e PSTV

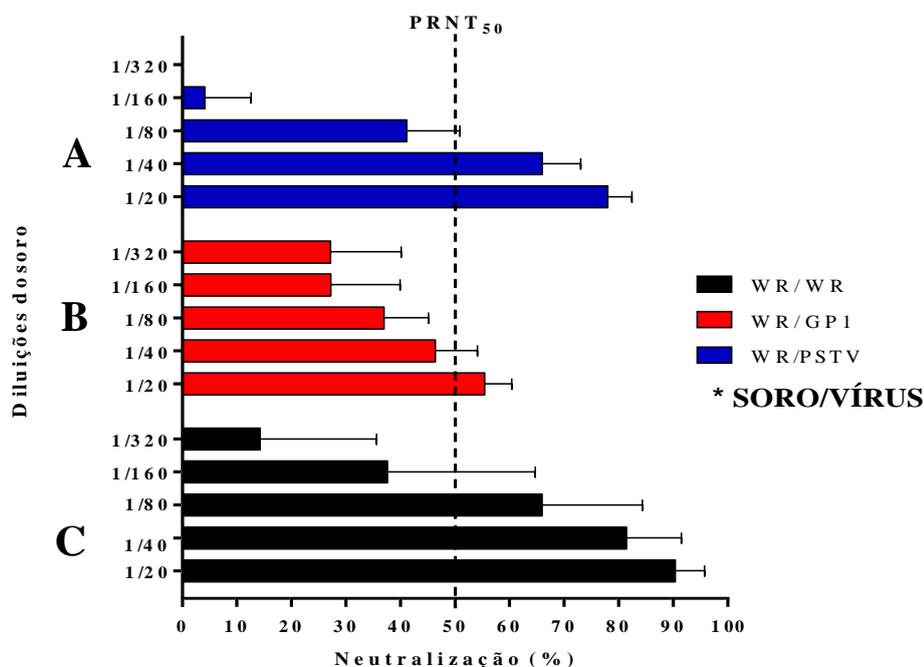
### 5.5.1 Ensaio de soroneutralização e proteção cruzada

Para esse ensaio foram utilizados soros de vinte e quatro camundongos Balb/c fêmeas, inoculadas pela via intranasal com as amostras virais GP1V, PSTV e WR, sendo seis representantes por grupo. Todos os grupos foram inoculados pela via intranasal em concentrações virais de  $5 \times 10^3$ , como dose não letal, em um volume de 40  $\mu$ L, diluídos em PBS 1X estéril. Esses animais foram sacrificados após 12 dias de infecção, e o sangue total foi retirado pelo plexo axilar. Para esse experimento utilizamos placas de 24 poços contendo  $\sim 125.000$  células BSC40 por poço. Os vírus GP1V, PSTV e WR, foram diluídos seriadamente em PBS, na concentração final de  $10^2$  PFU em 200  $\mu$ L. Os soros, foram previamente inativados ( $56^\circ\text{C}$  por 30min) e posteriormente diluídos também seriadamente, nas diluições de 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320. Para cada diluição de soro, utilizamos uma mistura de 200  $\mu$ L de diluição de soro mais 200  $\mu$ L de suspensão viral contendo  $10^2$  PFU. Essa mistura foi mantida por 16 horas a  $37^\circ\text{C}$ , e em seguida inoculada nas células, em triplicata. As células foram incubadas por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ . As amostras foram testadas em triplicata e plotadas em conjunto. Foram testados os soros e vírus exemplificados na tabela 2.

SORO	VÍRUS
WR	WR
WR	GP1V
WR	PSTV
SORO	VÍRUS
GP1V	GP1V
GP1V	WR
GP1V	PSTV
SORO	VÍRUS
PSTV	PSTV
PSTV	WR
PSTV	GP1V

**TABELA 2 - Soros e vírus testados no ensaio de soroneutralização e proteção cruzada.** Utilizamos os vírus GP1V, PSTV e WR, contra os soros diluídos dos animais infectados com GP1V, PSTV e WR.

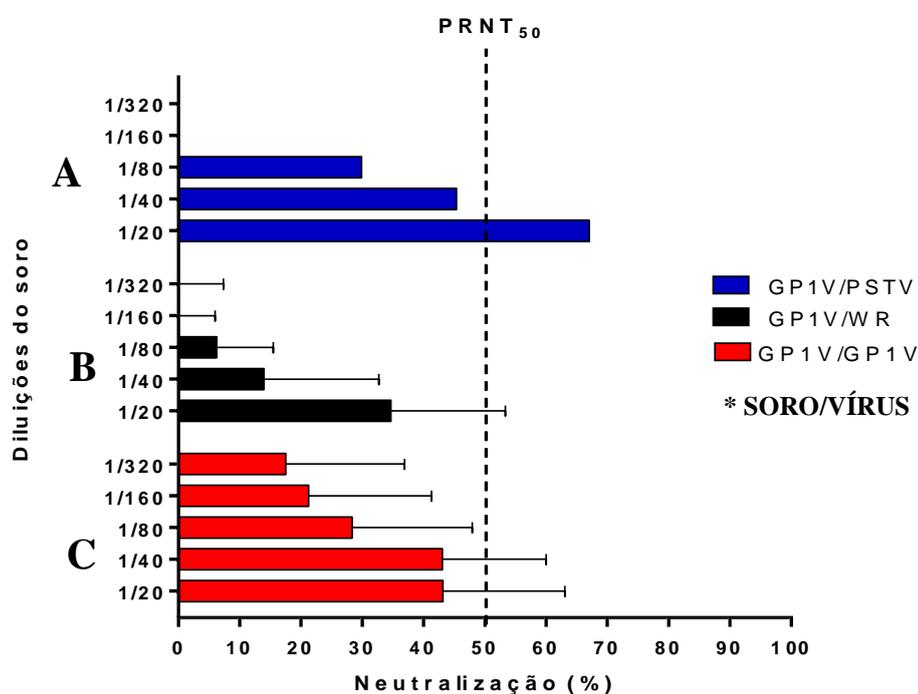
Testamos os soros dos animais infectados com WR, contra o vírus WR, sendo a diluição 1:80 apresentou redução de mais de 50% no número de placas de lise, em relação ao controle de vírus (figura 26). Quando verificamos esses mesmos soros, frente aos vírus GP1V e PSTV, foi observado que contra o vírus GP1V, a diluição 1:20 apresentou redução de mais de 50% no número de placas de lise, em relação ao controle de vírus (figura 25/B). Para o vírus PSTV, a diluição 1:40 apresentou redução de mais de 50% no número de placas de lise, em relação ao controle de vírus (figura 25/A). Estes resultados mostram que o soro de animais infectados com WR é capaz de neutralizar a infectividade, em cultivo celular, dos vírus GP1V e PSTV.



**Figura 26 - Ensaio de soroneutralização e proteção cruzada soro WR frente aos vírus GP1V, PSTV e WR.** Os soros dos camundongos Balb/c foram diluídos seriadamente, nas diluições de 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320. Os soros foram testados contra os vírus GP1V, PSTV e WR. Na legenda: Em preto WR(soro)/WR(vírus); Em vermelho WR(soro)/GP1V(vírus); Em azul WR(soro)/PSTV(vírus).

Analisamos os soros dos animais infectados com GP1V, contra o vírus GP1V, e de acordo com nosso experimento nenhuma das diluições reduziu mais de 50% no número

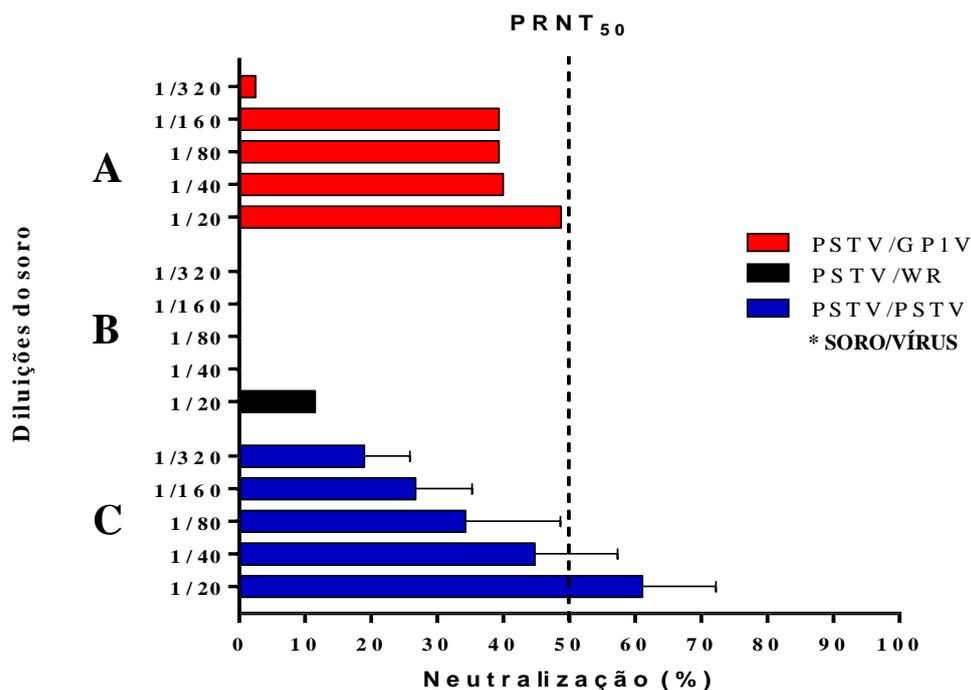
de placas de lise, em relação ao controle de vírus (figura 27/C). Este foi um resultado inesperado, visto que anticorpos induzidos por um vírus deveriam ser capazes de neutralizar o mesmo vírus em infecções celulares. Quando verificamos esses mesmos soros, frente aos vírus WR e PSTV, foi observado que contra o vírus WR, também não houve redução de mais de 50% no número de placas de lise, em relação ao controle de vírus nas diluições testadas (figura 26/B). Para o vírus PSTV, a diluição 1:20 apresentou redução de mais de 50% no número de placas de lise, em relação ao controle de vírus (figura 27/A).



**Figura 27 - Ensaio de soroneutralização e proteção cruzada soro GP1V frente aos vírus GP1V, PSTV e WR.** Os soros dos camundongos Balb/c foram diluídos seriadamente, nas diluições de 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320. Os soros foram testados contra os vírus GP1V, PSTV e WR. Na legenda: Em vermelho GP1V(soro)/GP1V(vírus); Em preto GP1V(soro)/WR(vírus); Em azul GP1V(soro)/PSTV(vírus).

Investigamos também os soros dos animais infectados com PSTV, contra o vírus PSTV, a diluição 1:20 apresentou redução de mais de 50% no número de placas de lise,

em relação ao controle de vírus (figura 28/C). Na análise desses mesmos soros, frente aos vírus GP1V e PSTV, foi observado que contra o vírus WR, não houve redução de mais de 50% no número de placas de lise, em relação ao controle de vírus nas diluições testadas (figura 28/B). Para o vírus GP1V, também não houve redução de mais de 50% no número de placas de lise, em relação ao controle de vírus nas diluições testadas (figura 28/A).



**Figura 28 - Ensaio de soroneutralização e proteção cruzada soro PSTV frente aos vírus GP1V, PSTV e WR.** Os soros dos camundongos Balb/c foram diluídos seriadamente, nas diluições de 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320. Os soros foram testados contra os vírus GP1V, PSTV e WR. Na legenda: Em vermelho PSTV(soro)/GP1V(vírus); Em preto PSTV(soro)/WR(vírus); Em azul PSTV(soro)/PSTV(vírus).

## 6 – DISCUSSÃO

As amostras de VACV-Br mesmo pertencendo ao mesmo gênero, apresentam características diferentes em relação à multiplicação, patogênese e resposta a infecção tanto em modelos *in vivo* e *in vitro*. As duas linhagens abordadas nesse estudo, apresentaram padrões de virulência diferentes, uma vez que PSTV e GP1V fazem parte de grupos filogenéticos diferentes, classificados de acordo com suas propriedades biológicas, genéticas e de virulência em modelo murino.

Dessa forma, nesse estudo nós abordamos primeiramente as características biológicas de PSTV e GP1V em comparação com o VACV-WR, o protótipo do gênero. As curvas de ciclo único dos vírus PSTV, GP1V e WR, nos mostrou um perfil similar entre os vírus GP1V e WR (**figura 10**). Seis horas após a infecção, esses dois vírus apresentaram um aumento no número de partículas viáveis, cerca de 1 *log*, em relação ao tempo de 3 horas. Nos demais tempos os títulos virais se mantiveram estáveis. PSTV exibiu um perfil diferente de GP1V e WR, nos tempos de 3 e 6 horas, com pouca produção de partículas viáveis desse vírus. No entanto, depois de 6 horas de infecção o número de partículas aumentou e a produtividade viral de PSTV se assemelhou aos outros dois VACVs (**figura 10**).

Nas curvas de múltiplos ciclos dos vírus PSTV, GP1V e WR, não foi observado até 24 horas após a infecção, a presença de partículas viáveis, detectadas através de placas de lise (**figura 11**). Essa diferença em relação aos dados de ciclo único refletem a baixa MOI inicial quando comparada à MOI utilizada naquele teste. Nos tempos de 24 e 48 horas de infecção, GP1V apresentou um perfil similar a WR. Entretanto 72 horas após a infecção, a produção de partículas viáveis do vírus GP1V, aumentou em relação a WR, aproximadamente meio *log*. Esse aumento no número de partículas de GP1V, se manteve exponencial até o tempo de 96 horas. De maneira oposta, o número de partículas viáveis de WR, declinou após o tempo de 48 horas. O vírus PSTV por sua vez, exibe um perfil divergente de GP1V e WR. Verificou-se um aumento gradual no número de partículas de vírus até o tempo de 72 horas (**figura 11**), ainda assim essa produção é menor quando comparada a GP1V e WR. No tempo de 96 horas o título de PSTV cai significativamente em relação aos outros dois vírus, evidenciando uma menor produção de partículas virais

viáveis de PSTV em relação a GP1V e WR. Essa diferença pode ser explicada por duas hipóteses. Uma menor capacidade do PSTV de se multiplicar em múltiplos ciclos em cultura de tecido, ou uma menor produção de partículas extracelulares, responsáveis pela transmissão célula-a-célula. Essas hipóteses não são excludentes e podem ocorrer sinergicamente.

Essas diferenças observadas nos ensaios de curva de crescimento dos vírus GP1V, PSTV e WR são reflexo das características biológicas de dois vírus (GP1V e PSTV) que pertencem a grupos geneticamente diferentes. Abrahão e colaboradores (2009) já haviam observado esse perfil divergente entre o VACV, MARV e WR através de curvas de crescimento. PSTV assim como MARV, pertence ao grupo menos virulento de VACV-Br. Essa característica se reflete na diferença de produção de partículas virais viáveis de PSTV e MARV, em relação por exemplo, a GP1V e WR, que são vírus filogeneticamente mais próximos.

O ensaio de fenótipo de placa dos vírus PSTV, GP1V e WR (**figura 12**), corroboraram nossos ensaios de curva de crescimento. Os vírus GP1V e WR, apresentam placas de lise maiores em relação a PSTV e de tamanho similar. Esse resultado também foi observado por Assis e colaboradores (2011), quando feita infecção pelos vírus GP1V e WR em BSC40, observando-se placas de lise maiores e de tamanho similar para os vírus GP1V e WR. PSTV por outro lado apresenta placas de lise menores que GP1V e WR. As placas de lise de PSTV se assemelham as de MARV e P2V, um padrão que parece se repetir entre os VACV-Br pertencentes ao grupo 1 (ABRAHÃO *et al.*; 2009; CAMPOS *et al.*; 2011). A diferença do tamanho das placas de lise observadas após infecção da monocamada celular por PSTV pode refletir uma baixa produção de partículas extracelulares do vírus, o que comprometeria sua capacidade de infectar células vizinhas limitando, conseqüentemente, o tamanho da placa observada.

Os diferentes padrões de virulência dos vírus PSTV, GP1V e WR, foram observados após infecção em camundongos Balb/c, pela via intranasal com  $10^6$  PFU desses vírus. Adicionalmente, sabe-se que camundongos BALB/c são particularmente sensíveis à infecção por esta via com o vírus vaccínia (FERREIRA *et al.*, 2008). São sintomas comuns da infecção por VACV, eriçamento de pelo, arqueamento de dorso, secreção ocular. Na nossa avaliação, nós verificamos que os animais infectados com GP1V e WR, apresentaram sintomas típicos da infecção por VACVs virulentos. Foi

observado eriçamento de pelo, arqueamento de dorso e secreção ocular nos animais infectados com GP1V e WR (**figura 14 e 18**). Os animais infectados com PSTV apresentaram sintomas mais moderados em relação aos animais dos grupos GP1V e WR. Ferreira e colaboradores (2008) avaliaram o perfil de virulência em modelo murino, de diversos VACV-Br com padrões de virulência diferentes. Os resultados desse estudo corroboram os nossos resultados, quando comparamos a infecção em Balb/c pelas amostras GP1V e WR. Diferentemente os animais do grupo infectado com PSTV apresentaram apenas eriçamento de pelo (**figura 16**). Os demais sintomas comuns da infecção por VACV não foram apresentados por esse grupo.

Quando avaliamos a perda de peso desses animais, nós observamos que os grupos infectados com GP1V e WR, apresentaram perda de peso estatisticamente significativa em comparação com os animais infectados com PBS (**figura 15 e 19**). Os animais desses dois grupos, perderam mais de 25% do peso e foram sacrificados no 6º dia após a infecção. Os animais do grupo PSTV tiveram uma menor perda de peso, quando comparados com os grupos GP1V, WR e controle. Contudo não houve perda de mais de 25% do peso durante o experimento.

Os sintomas apresentados por cada grupo de animais, foram classificados e pontuados, no 5º dia após a infecção e plotados em forma de gráfico (**figura 21**). Os grupos infectados com GP1V e WR apresentaram um escore clínico estatisticamente diferente do grupo infectado com PSTV. As características observadas nesses experimentos confirmam que de fato, as amostras com padrões de virulência diferentes, tem perfil patogênico diferente em modelo murino.

Os VACV são capazes de infectar uma gama de hospedeiros e linhagens celulares e tecidos diferentes (DAMASO *et al.*, 2000; DE SOUZA TRINDADE *et al.*, 2003; TRINDADE *et al.*, 2004; SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009; BRUM *et al.*, 2010; ABRAHÃO *et al.*, 2009, 2010). Nós avaliamos o tropismo tecidual por PSTV, GP1V e WR, através de PCR *em tempo real*, em camundongos Balb/C inoculados com  $10^6$  PFU desses vírus. O pulmão foi o primeiro órgão a ser investigado, por ser o sítio primário de infecção, porém, foram observados diferentes títulos de DNA viral nesse tecido. Os animais infectados com PSTV apresentaram os maiores títulos de DNA viral, cerca de  $1.1 \times 10^{12}$  por pulmão (**figura 22**). O número de cópias do DNA viral de GP1V e WR, foi ligeiramente menor quando comparado com PSTV. O grupo infectado com GP1V, apresentou aproximadamente  $4 \times 10^{10}$  número de cópias por pulmão e o grupo WR cerca

de  $2 \times 10^{10}$  (**figura 22**). Essa diferença nos títulos de DNA viral encontrado para cada vírus nesse sítio, pode estar relacionado com a incapacidade do vírus PSTV de alcançar outros órgãos, sendo assim o pulmão seria seu principal e maior sítio de replicação viral. Outra hipótese interessante seria supor que o vírus PSTV está mais adaptado ao roedor na natureza. Dessa forma, ele alcançaria títulos maiores neste sítio de infecção, arrefecendo sua dispersão para outros sítios como forma de manter vivo seu hospedeiro, como discutido a seguir.

Os animais infectados com GP1V e WR, apresentaram significativos títulos de DNA viral no baço (**figura 23**), cerca de  $1 \times 10^6$  para os animais infectados com GP1V e  $4 \times 10^5$  para o grupo WR, demonstrando a capacidade desses vírus em promover uma infecção sistêmica. Interessantemente o vírus PSTV não foi capaz de alcançar esse órgão. Esse achado reforça que o vírus PSTV, que pertence ao grupo menos virulento de VACV-Br, mantenha-se como uma infecção localizada, adaptada ao hospedeiro murino, como sugerido no parágrafo anterior. Por outro lado, não podemos descartar a hipótese de que o vírus apresente uma menor capacidade infecciosa que GP1V e WR, como sugerido pelos experimentos de curva de multiplicação. Os vírus GP1V e WR, demonstraram a capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica. Foi observado no cérebro dos animais infectados com esses dois vírus, altos títulos de DNA viral,  $3 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  para o grupo infectado com GP1V e WR respectivamente (**figura 24**). Essa capacidade de causar uma infecção sistêmica, confirma o padrão de virulência acentuado de GP1V e WR. Esse resultado corrobora também os dados de escore clínico e curva de peso, uma vez que os animais infectados com esses dois vírus, apresentam sinais pronunciados da infecção e perdem mais de 25% do peso corporal. Por fim, os dados confirmam e corroboram o fato de que o PSTV não é capaz de causar infecção sistêmica. Além disso, o título de DNA viral do WR no cérebro desses animais, pode ser explicada pela sua adaptação em modelo murino, uma vez que esta amostra é, de fato, considerada neuropotogênica (WILLIAMSON *et al*;1990). Não observamos DNA viral, de nenhuma das amostras investigadas nesse estudo, no intestino dos animais infectados, pela metodologia utilizada neste trabalho. Ferreira e colaboradores (2008), descreveram infecção sistêmica por GP1V e WR, utilizando PCR convencional de diversos órgãos, corroborando os achados deste trabalho. Não obstante, a ocorrência de partículas virais de VACV nas fezes já foi

observada, sugerindo que o vírus alcança, em algum momento, o intestino (FERREIRA *et al.*, 2008).

Os poxvírus são capazes de codificar proteínas que interagem com sistema celular do hospedeiro, a fim de tornar o meio mais propício a sua replicação. Quando os vírus se multiplicam, ocorre uma grande produção de proteínas virais e essa produção exacerbada, acaba por sobrecarregar o RE, ativando assim vias de resposta ao estresse. A via UPR é ativada quando é detectado um acúmulo de proteínas mal-formadas no lúmen do RE. Um dos três sensores da via UPR é denominado IRE1 e a ativação desse domínio inicia o processamento do fator de transcrição XBP-1. Esse processo resulta na expressão de chaperonas, enzimas modificadoras e remodelamento de membrana e quando a homeostase celular não é restabelecida, IRE1 pode induzir a apoptose (RON & WALTER, 2007; HUSSAIN & RAMAIAH, 2007, LIN *et al.*, 2007; SCHRÖDER & KAUFMAN, 2006; XU *et al.*, 2005).

Para avaliar a capacidade de modulação dos vírus PSTV, GP1V e WR, foi observado o efeito da infecção desse vírus em resposta ao braço IRE1 da via UPR. A infecção pelas amostras investigadas aqui reduziu o processamento do mRNA de XBP1, em relação ao controle tratado com tunicamicina (**figura 25**). Leão e colaboradores (manuscrito em preparação) investigaram a capacidade dos VACV-MVA em comparação com VACV-WR em modular negativamente a ativação de IRE1. Os resultados mostraram que a infecção pelo MVA e WR também reduziu os níveis da forma processada de XBP1, corroborando assim os resultados apresentados neste trabalho. Na infecção pelo Herpes vírus humano tipo 1, foi observado que a proteína UL41, uma proteína do tegumento de HSV-1, tem papel importante na redução da ativação de XBP1, dessa forma podemos presumir que PSTV, GP1V e WR também apresentem proteínas que exerçam interação com IRE1, modulando assim essa via (ZHANG *et al.*; 2017).

A avaliação do título de anticorpos neutralizantes presentes nos soros dos animais infectados com os vírus PSTV, GP1V e WR foi realizada em conjunto com a investigação da capacidade de neutralização cruzada desses soros (**tabela 2**). Esse experimento foi realizado de acordo com a metodologia descrita no item 5.5 deste trabalho. A análise de soroneutralização dos animais infectados com WR, revelou que a diluição 1:80 apresentava mais de 50% do número de placas de lise (**figura 26/C**). Quando testamos os soros dos animais infectados com WR contra o vírus GP1V, a capacidade de neutralização de mais de 50% do número de placas de lise, foi observada na diluição de 1:20 (**figura**

**26/B**). Porém quando avaliamos a neutralização dos soros desse grupo contra a infecção pelo vírus PSTV, o título de anticorpos neutralizantes foi maior que o encontrado frente a GP1V, apresentando-se positivos na diluição 1:40 (**figura 26/A**). Dessa forma, parece lógico que o perfil de virulência desses vírus, também se reflete na capacidade neutralização desses soros. Uma vez que a neutralização do vírus GP1V é menor quando comparada com o vírus PSTV, amostra menos virulenta abordada neste estudo.

Surpreendentemente, não foi observado redução mais de 50% do número de placas de lise nas diluições dos soros dos animais infectados com GP1V, testadas contra infecções pelo mesmo vírus (**figura 27/C**). É possível observar através da barra de desvio padrão, que alguns soros apresentaram títulos positivos, entretanto, numa avaliação global dos dados, esse perfil não se manteve. De qualquer forma, estes experimentos precisam ser repetidos para que este perfil de neutralização possa ser confirmado ou não. Já o soro dos animais infectados com GP1V apresentou capacidade neutralizante contra o vírus PSTV, na diluição 1:20 (**figura 27/A**). Isso demonstra a capacidade da infecção por GP1V de gerar anticorpos neutralizantes contra amostras menos virulentas. Contudo quando os soros dos animais GP1V foram testados contra o vírus WR, nós não observamos redução de mais de 50% do número de placas de lise (**figura 27/B**).

Os soros dos animais infectados com PSTV apresentam capacidade neutralizante na diluição 1:20 quanto testados contra o próprio PSTV (**figura 28/C**). Curiosamente, quando testamos os soros desses animais contra os vírus GP1V e WR nós não observamos redução de 50% do número de placas de lise (**figura 28 A e B**). Dessa forma presumimos que a infecção pelo vírus PSTV não é capaz de gerar anticorpos suficientes para neutralizar a infecção por pelos vírus GP1V e WR, amostras mais virulentas que PSTV.

Por fim, este estudo revelou que as amostras virais GP1V e PSTV, apresentam um perfil de virulência diferente tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Corroborando dados de diversos estudos que evidenciaram padrões de virulência diferentes para VACV-Br pertencentes a grupos filogenéticos diferentes (TRINDADE *et al*; 2006; TRINDADE *et al*; 2007; FERREIRA *et al*; 2008; ABRAHÃO *et al*; 2009; CAMPOS *et al*; 2011; ASSIS *et al*; 2012; ASSIS *et al*; 2013; OLIVEIRA *et al*; 2013).

## 7 – CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que:

- ✓ As amostras GP1V e WR apresentam perfil similar na produção de partículas virais infecciosas *in vitro*.
- ✓ A amostra PSTV apresenta menor produção de partículas virais infecciosas *in vitro* quando comparado a GP1V e WR, presumivelmente no que tange a partículas extracelulares.
- ✓ Foi possível encontrar DNA viral de GP1V e WR no pulmão, baço e cérebro dos animais, de forma que estes vírus estabelecem uma infecção sistêmica
- ✓ O vírus PSTV não é capaz de causar uma infecção sistêmica.
- ✓ As amostras PSTV, GP1V e WR reduziram o processamento do mRNA de XBP1, modulando negativamente o sensor IRE1 da via UPR.
- ✓ A infecção por WR em Balb/c induz a produção de anticorpos neutralizantes contra infecções pelos vírus GP1V e PSTV.
- ✓ A infecção por GP1V em Balb/c induz a produção de anticorpos neutralizantes contra infecções pelo vírus PSTV, mas não contra WR.
- ✓ A infecção por PSTV em Balb/c não induz a produção de anticorpos neutralizantes contra infecções pelos vírus GP1V e WR.

## 7 - REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, et al. Outbreak of Severe Zoonotic Vaccinia Virus Infection, Southeastern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, p. 665-668, Abril 2015.

ABRAHÃO, J. S. et al. One More Piece in the VACV Ecological Puzzle: Could Peridomestic Rodents Be the Link between Wildlife and Bovine Vaccinia Outbreaks in Brazil? **PLOS ONE**, v. 4, outubro 2009.

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

ANDREW, E.; COUPAR, B. E. H.; BOYLE, D. B. Humoral and cell-mediated immune responses to recombinant vaccinia viruses in mice. **Immunology and Cell Biology**, v. 67, p. 331–337, Junho 1989.

BALDICK, ; MOSS, B. Characterization and Temporal Regulation of mRNAs Encoded by Vaccinia Virus Intermediate-Stage Genes. **JOURNAL OF VIROLOGY**, v. 67, p. 3515-3527, JUNHO 1993.

CAMPOS, et al. Assessing the variability of Brazilian Vaccinia virus isolates from a horse exanthematic lesion: coinfection with distinct viruses. **Springer**, p. 275–283, 2011.

CHINALIA, L.. Caracterização e comparação da resposta imune de camundongos Balb/c durante a infecção aguda pelos isolados zoonóticos Vaccinia vírus Guarani P1 (GP1) e Passatempo (PST). **Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, p. 1-114, Março 2013.

CHUNG, C.-S.; HUANG, C.-Y.; CHANG, W. Vaccinia Virus Penetration Requires Cholesterol and Results in Specific Viral Envelope Proteins Associated with Lipid Rafts. **JOURNAL OF VIROLOGY**, v. 79, p. 1623–1634, fevereiro 2005.

CUSH, S. S. et al. Locally Produced IL-10 Limits Cutaneous Vaccinia Virus Spread. **PLOS Pathogens**, p. 1- 23, Março 2016.

DA FONSECA, F. et al. Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. **Archives of Virology**, p. 1171–1186, Janeiro 1998.

DA FONSECA, G. et al. Characterization of a vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. **Journal of General Virology**, p. 223–228, 2002.

DA FONSECA, G. et al. Zoonotic vaccinia virus outbreaks in Brazil. **Future Medicine**, p. 697–707, 2011.

DAMASO, 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**, p. 439- 449, 2000.

DE ASSIS, F. et al. Group 2 Vaccinia Virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, p. 2035-2038, Dezembro 2012.

DE ASSIS, L. et al. Reemergence of Vaccinia Virus during Zoonotic Outbreak, Pará State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, p. 2017-2020, DEZEMBRO 2013.

DEHAVEN, B. C. et al. Poxvirus Complement Control Proteins Are Expressed on the Cell Surface through an Intermolecular Disulfide Bridge with the Viral A56 Protein. **JOURNAL OF VIROLOGY**, v. 84, p. 11245–11254, novembro 2010.

DI GIULIO, D. B.; ECKBURG, P. B. Human monkeypox: an emerging zoonosis. **The Lancet Infectious Diseases**, p. 15-25, janeiro 2004.

DRUMOND, B. P. et al. Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. **Microbes and Infection**, v. 10, p. 185-197, fevereiro 2008.

EARL, P. L.; AMERICO, J. L.; MOSS, B. Insufficient Innate Immunity Contributes to the Susceptibility of the Castaneous Mouse to Orthopoxvirus Infection. **Journal Virology**, p. 1-43, Julho 2017.

FAGONE, P.; JACKOWSKI, J. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. **The Journal of Lipid Research**, p. 311–316, Abril 2009.

FERREIRA, J. M. S. et al. Vaccinia virus: shedding and horizontal transmission in a murine model. **Journal of General Virology**, p. 2986–2991, Agosto 2008.

FERREIRA, J. M. S. et al. Virulence in Murine Model Shows the Existence of Two. **Plos one**, v. 3, p. 1-10, Agosto 2008.

FILHO, L. S. **História geral da medicina brasileira**. São Paulo: Hucitec/Edusp, v. 2, 1991.

FRANCO-LUIZ, A. P. et al. The detection of Vaccinia virus confirms the high circulation of Orthopoxvirus in buffaloes living in geographical isolation, Marajó Island, Brazilian Amazon. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, p. 16-19, 2016.

GOMES, A. S. et al. Immune Modulation in Primary Vaccinia virus Zoonotic Human Infections. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1-11, setembro 2012.

GRAHAM, K. A. et al. The T1/35kDa family of poxvirus-secreted proteins bind chemokines and modulate leukocyte influx into virus-infected tissues. **Virology**, p. 12-24, Março 1997.

GUBSER, et al. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. **Journal of General Virology**, p. 105–117, 2004.

HALLER, S. L. et al. Poxviruses and the Evolution of Host Range and Virulence. **Elsevier**, Janeiro 2014. 15-40.

HANSSON, O.; JOHANSSON, G. O.; VAHLQUIST, B. Vaccinia Gangrenosa with normal humoral antibodies. A case possibly due to deficient cellular immunity treated with N-methylisatin beta-thiosemicarbazone. **Acta paediatrica**, p. 264-72, 1966.

HAYASAKA, D.; ENNIS, F. A.; TERAJIMA, J. Pathogenesis of respiratory infections with virulent and attenuated vaccinia viruses. **Virology Journal**, p. 1-14, Fevereiro 2007.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. **ICTV**, 2015. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>>. Acesso em: 3 Junho 2016.

JARAHIAN, et al. Modulation of NKp30- and NKp46-Mediated Natural Killer Cell Responses by Poxviral Hemagglutinin. **PLoS Pathogens**, v. 7, p. 1-18, Agosto 2011.

JOHNSTON, J. B.; GRANT MCFADDEN. Poxvirus Immunomodulatory Strategies: Current Perspectives. **Journal of virology**, v. 77, p. 6093–6100, Junho 2003.

KARUPIAH, G. et al. Elevated natural killer cell responses in mice infected with recombinant vaccinia virus encoding murine IL-2. **The Journal of Immunology**, v. 144, p. 290-298, Janeiro 1990.

KETTLE, et al. Vaccinia virus serpin B13R (SPI-2) inhibits interleukin-1beta-converting enzyme and protects virus-infected cells from TNF- and Fas-mediated apoptosis, but does not prevent IL-1beta-induced fever. **Journal of General Virology**, p. 677–685, 1997.

LÊAO, T. L. EFEITOS DA INFECÇÃO POR VACCINIA VIRUS SOBRE A ATIVAÇÃO DE COMPONENTES DA VIA DE RESPOSTA A PROTEÍNAS MAL FORMADAS (UPR) EM FIBROBLASTOS DE EMBRIÕES DE CAMUNDONGO (MEFS), BELO HORIZONTE, DEZEMBRO 2017.

LEFKOWITZ, E. J.; WANG, C.; UPTON, C. Poxviruses: past, present and future. **Elsevier**, FEVEREIRO 2006. 105–118.

LEITE, A. et al. Passatempo Virus, a Vaccinia Virus Strain, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 1935-1938, Dezembro 2005.

LIU, Q. et al. Bioluminescent imaging of vaccinia virus infection in immunocompetent and immunodeficient rats as a model for human smallpox. **Scientific Reports**, p. 1-11, Agosto 2015.

MARSCHANG, R. E. Viruses Infecting Reptiles. **Viruses**, v. 3, p. 2087-2126, Novembro 2011.

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

MEGID, et al. Vaccinia Virus in Humans and Cattle in Southwest Region of São Paulo State, Brazil. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, p. 647–651, 2008.

MORETTA, L. et al. On the pathogenesis of perforin defects and related immunodeficiencies. **Immunology Today**, p. 593, Novembro 2000.

MOSS, B. Poxvirus entry and membrane fusion. **Elsevier**, p. 48–54, Setembro 2005.

MOSS, B. Poxviridae. In: KNIPE, D. M., et al. **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, v. 1, 2013. Cap. 66, p. 2129-2159.

OHTA, et al. Effect of Complement Depletion by Cobra Venom Factor on Fowlpox Virus Infection in Chickens and Chicken Embryos. **JOURNAL OF VIROLOGY**, p. 670-673, Fevereiro 1986.

OLIVEIRA, D. et al. Group 1 Vaccinia virus Zoonotic Outbreak in Maranhão State, Brazil. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, p. 1142–1145, 2013.

OLIVEIRA, et al. Short Report: Group 1 Vaccinia virus Zoonotic Outbreak in Maranhão State, Brazil. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, p. 1142–1145, 2013.

OLIVEIRA, G. et al. From Lesions to Viral Clones: Biological and Molecular Diversity amongst Autochthonous Brazilian Vaccinia Virus. **Viruses**, p. 1218-1237, Março 2015.

ORGANIZATION, W. H. World Health Organization. **World Health Organization**, 1979. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/195316/1/WHA33\\_3\\_spa.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/195316/1/WHA33_3_spa.pdf?ua=1)>. Acesso em: 31 DE MAIO DE 2016 MAIO 2016.

PANCHANATHAN, V.; CHAUDHRI, ; KARUPIAH,. Correlates of protective immunity in poxvirus infection: where does antibody stand? **Immunology and Cell Biology**, p. 80-86, 2008.

PARRINO, J.; GRAHAM, B. S. Smallpox vaccines: Past, present, and future. **J ALLERGY CLIN IMMUNOL**, v. 118, p. 1320-1326, Dezembro 2006.

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

REARDON, S. SMALLPOX WATCH. **NATURE**, 30 Abril 2014. 22-24.

REED, K. D. et al. The Detection of Monkeypox in Humans. **The new england journal of medicine**, p. 342-350, janeiro 2004.

ROBERTS, L.; SMITH, L. Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 472–479, OUTUBRO 2008.

SAKALA, I. G. et al. Poxvirus-Encoded Gamma Interferon Binding Protein Dampens the Host Immune Response to Infection. **Jornal of Virology**, v. 81, p. 3346–3353, Abril 2007.

SCHMIDT, F. I. et al. Vaccinia Virus Entry Is Followed by Core Activation and Proteasome-Mediated Release of the Immunomodulatory Effector VH1 from Lateral Bodies. **Cell Reports**, p. 464–476, Agosto 2013.

SCHMIDT, I.; BLECK, C. K. E.; MERCER,. Poxvirus host cell entry. **Elsevier**, p. 20–27, 2012.

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

SEET, B. T. et al. POXVIRUSES AND IMMUNE EVASION. **Annu. Rev. Immunol**, p. 377–423, Janeiro 2003.

SMITH, L. ; MCFADDEN, G. Smallpox: anything to declare? **NATURE**, v. 2, p. 521-527, Julho 2002.

SMITH, G. L. et al. Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. **Journal of General Virology**, v. 94, p. 2367–2392, Agosto 2013.

SMITH, S. A.; KOTWAL, G. J. Immune Response to Poxvirus Infections in Various Animals. **Critical Reviews in Microbiology**, p. 149–185, 2002.

STANFORD, M. M. et al. Immunopathogenesis of poxvirus infections: forecasting the impending storm. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, p. 93–102, 2007.

STEWART, M. K.; COOKSON, B. T. Evasion and interference: intracellular pathogens modulate caspase-dependent inflammatory responses. **Nature**, v. 14, p. 346-349, Junho 2016.

TRINDADE, 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**, p. 2015–2021, 2004.

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

TRINDADE, D. S. et al. Zoonotic Vaccinia Virus Infection in Brazil: Clinical Description and Implications for Health Professionals. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 45, p. 1370–1372, Abril 2007.

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

TRINDADE, et al. Zoonotic Vaccinia Virus: Clinical and Immunological Characteristics in a Naturally Infected Patient. **Clinical Infectious Diseases**, p. 37–40, 2009.

TRINDADE, G. D. S. et al. Real-time PCR assay to identify variants of Vaccinia virus: Implications for the diagnosis of bovine vaccinia in Brazil. **Journal of Virological Methods**, p. 63-71, Maio 2008.

TRINDADE, G. D. S. et al. Real-time PCR assay to identify variants of Vaccinia virus: Implications for the diagnosis of bovine vaccinia in Brazil. **Journal of Virological Methods**, p. 63–71, 2008.

TRINDADE, S. et al. Zoonotic Vaccinia Virus: Clinical and Immunological Characteristics in a Naturally Infected Patient. **BRIEF REPORT**, p. 37-40, FEVEREIRO 2008.

TSURU, et al. Mechanism of Protection During the Early Phase of a Generalized Viral Infection. II. Contribution of Polymorphonuclear Leukocytes to Protection against Intravenous Infection with Influenza Virus. **Journal of General Virology**, v. 68, p. 419-424, 1987.

UEDA, ; MORIKAWA, S.; WATANABE,. Unclassified Poxvirus: Characterization and Physical Mapping of Cotia Virus DNA and Location of a Sequence Capable of Encoding a Thymidine Kinase. **Virology**, p. 67-72, Março 1995.

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

VIRALZONE. ViralZone. **ViralZone**, 2014. Disponível em: <[http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/174.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/174.html)>. Acesso em: 1 Junho 2016.

WANG, Y. et al. IL-12p40 and IL-18 Play Pivotal Roles in Orchestrating the Cell-Mediated Immune Response to a Poxvirus Infection. **The Journal of Immunology**, p. 3324-3331, Agosto 2009.

WEST, B. C. et al. Neutrophil Uptake of Vaccinia Virus in Vitro. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 156, p. 597–606, 1987.

WHO. World Health Organization. **World Health Organization**, 1979. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/195316/1/WHA33\\_3\\_spa.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/195316/1/WHA33_3_spa.pdf?ua=1)>. Acesso em: 31 DE MAIO DE 2016 maio 2016.

XU, R. et al. Cellular and Humoral Immunity against Vaccinia Virus Infection of Mice. **The Journal of Immunology**, p. 6265-6271, Março 2004.

## ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 188/2017

**Título do projeto:** CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS ZONÓTICOS DE VACCINIA VIRUS GUARANI P1 (GP1V) E PASSATEMPO (PSTV) E AVALIAÇÃO DE SUA CAPACIDADE EM MODULAR VIAS DE RESPOSTA DO HOSPEDEIRO À INFECÇÃO, IN VIVO E IN VITRO

**Finalidade:** Pesquisa

**Pesquisador responsável:** Flavio Guimaraes da Fonseca

**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas

**Departamento:** Departamento de Microbiologia

**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 25/09/2017. Validade: 25/09/2017 à 24/09/2022  
Belo Horizonte, 25/09/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de [Minas Gerais](#)  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)





