

GISELE OLINTO LIBANIO RODRIGUES

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

***Vaccinia virus*: transmissão vertical e pelo leite em
modelo murino**

Belo Horizonte, fevereiro de 2012

GISELE OLINTO LIBANIO RODRIGUES

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

***Vaccinia virus*: transmissão vertical e pelo leite em
modelo murino**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Erna Geessien Kroon

Co-orientador: Prof. Dr. Bruno Eduardo Fernandes Mota

Co-orientador: Prof. Dr. Jônatas dos Santos Abrahão

Belo Horizonte, fevereiro de 2012

AGRADECIMENTOS

A minha família, pelo que eu sou hoje. Por me apoiar sempre em todas as minhas decisões, por estar por perto em todos os momentos bons e ruins, por respeitar minhas opiniões mesmo que não as compartilhe, por acreditar nos meus sonhos, por me defender, por me incentivar, por me fazer feliz, por ser minha família!

A Chico, por me fazer cada dia mais apaixonada pela ciência, pelo incentivo, pela amizade e pelo companheirismo, por todos os momentos de cumplicidade, pelo cuidado comigo, pelo amor, por dividir sua vida comigo!

A Ema “chefe”, por todos os ensinamentos, pela confiança em meu trabalho, pela liberdade na escolha do projeto e dos experimentos, por perguntar a minha opinião mesmo já sabendo qual seria a melhor opção, e principalmente por não me deixar desistir.

A D. Antonieta e Tete, por me acolherem como filha e irmã com tanto carinho na minha nova família.

A John John, meu amigo e pai, pelas lições de vida, por sempre encher minha bola (mesmo que por arrependimento de tanto me chamar de “borrinha” no passado! rs) e me fazer acreditar no meu potencial, por me mostrar que o limite para o conhecimento cada um impõe o seu, por todos os elogios como profissional e pessoa (eu não sei como vou conseguir encarar um novo laboratório sem você!).

A Mari, pela amizade maravilhosa, pelas confidências, por tornar os momentos ruins mais confortantes e os felizes mais engraçados, e pela certeza de que o que foi construído vai ser para sempre!

A Lele, por ter me acolhido no lab vírus como amiga já nos primeiros dias, por me ensinar que cada amigo é único e as diferenças servem para amadurecermos, pela

convivência por todos esses anos, por me incentivar sempre, pela sua preocupação e sinceridade!

A Barbrinha, por me abrigar na sua casa e no sítio várias vezes, pelo ombro amigo sempre disponível para rir ou chorar, pelos anos de amizade e cachaça!

A Marcela, por tornar a minha vida na pós-graduação infinitamente mais divertida e prazerosa! Pela força no biotério e em todos os experimentos, por abraçar o meu projeto como se fosse o seu, pelas discussões científicas, pelas farras e bagunças, por ser minha amiga!

A Flavinha, Alice e Jonas por fazerem dos meus dias de trabalho os mais engraçados, pela amizade maravilhosa, pela companhia nos congressos e pelas festas que não seriam as mesmas sem vocês!

A Deza, Ildinha e tia Ângela por fazerem o meu trabalho no laboratório de vírus bem menos laborioso, por serem tão solícitas e prestativas, pelo carinho!

A meus co-orientadores e amigos, Jonska e Quelé pela amizade e exemplo de profissionalismo (eu não poderia estar mais bem amparada na virologia!).

A Ana Paula Moreira, pela ajuda fundamental na reta final!

A Profa. Leda pela ajuda com a cesariana dos camundongos.

A Bel por toda ajuda com as histologias.

A CAPES, CNPq, FAPEMIG, pelos auxílios concedidos.

A Tutuxo, pelos trabalhos em conjunto, pelo carinho e pela amizade!

A Eliseu, o meu amigo mais chato de todos! Por querer tanto o meu bem!

Aos labirivianos: Iarinha, tio Gabe, Carlinha, Ana P., Lu Garcia, Kátita, Léo, Pedro, Danilo, Dani, Héline, Taninha, Felipe, Alê, André Baiano, Manu, Rodrigo, Tamara, Tércia, Poly, Lud, Marina, Josi, Kety, Galileu, Grazi, Cesar, Kennedy, Éric, Larica, Andreia, Anselmo, Camila, Pablo, Paula, Rafa Campos (Valeu demais gente!)

Aos ex-labrivianos, Marcelão, Lina, Gustavo, Ju Brasília, Bruninho, Lu Bessa, Breno, Gra, Gui, Lorena, Marcella Baracho, Ana Celi, Beta, Cintilante, Fê Lins, Flavinha Gama, Geraldão, Jamas, Lu Amaral, Rafa Palhares, Vanessa (Foi perfeito ter vivido duas gerações do lab vírus!)

Aos professores do Lab vírus e do departamento de microbiologia, pela contribuição para a minha formação.

A Naty e Kelly pela amizade de uma vida inteira!

Aos amigos dos outros laboratórios do departamento, Lab. da Verinha, Lab. do Flavinho, Lab. do Luis Macedo, Lab. do Jaques, Lab. do Carlos Rosa, Lab da Patrícia (foi muito bom ter conhecido vocês!).

Às amigas dos melhores carnavais Cris, Aline e Carlinha!

Aos amigos da biologia da UFMG e da PUC pelos churrascos, aniversários, Buteco da Bio, churrasqueira do ICB, sítios, confraternizações diversas (para essa turma tudo é motivo de festa!).

A todos os amigos da minha vida!

Dedico

Aos meus pais,
por me amarem de um jeito
que eu ainda não aprendi a amar.

A Chico, por renunciar vários
momentos da sua vida para estar do meu
lado ajudando na realização dos meus ideais.

A Profa Dra. Erna,
por me ensinar a fazer
ciência com ética e respeito.

“O que o bem-estar animal precisa é de pessoas educadas com cabeças frias e corações quentes preparados para ver o sofrimento dos animais e procurando meios práticos de aliviá-los.”

Charles Hume



<i>LISTA DE FIGURAS</i>	I
<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>	IV
<i>RESUMO</i>	VI
<i>ABSTRACT</i>	VII
1- Introdução	1
1.1- Classificação	1
1.1.1- A família Poxviridae.....	1
1.1.2- O gênero <i>Orthopoxvirus</i>	1
1.2- Morfologia da partícula e estratégia de multiplicação	3
1.2.1- Morfologia.....	3
1.2.2- Organização do genoma.....	6
1.2.3- Ciclo de multiplicação	8
1.3- Ocorrência mundial Orthopoxvirus	12
1.3.1- <i>Variola virus</i> : Um breve histórico	12
1.3.2- Cowpox virus.....	14
1.3.3- Monkeypox vírus (MPXV).....	16
1.3.4- Vaccinia virus (VACV).....	18
1.4- Impacto das zoonoses causadas por poxvírus no Brasil	23
1.5- Transmissão do VACV	25
1.5.1- Transmissão horizontal.....	25
1.5.2- Transmissão vertical.....	30
1.6- Patogênese	32
2- Justificativa e Relevância	35
3- Objetivos	37
3.1- Objetivo geral:	37
3.2- Objetivos específicos	37
4- Estratégia de trabalho	38
4.1- Fluxograma:	38
5- Materiais e métodos	39
5.1- Célula	39
5.2- Membrana corioalantóide de ovos embrionados (MCA)	39
5.3- Vírus	40
5.3.1- Multiplicação viral em cultivo celular	40
5.3.2- Purificação viral	41
5.3.3- Titulação viral (CAMPOS e KROON, 1993).....	41
5.3.4- Ensaio de soroneutralização	42
5.4- Animais	43
5.4.1- Infecção de camundongos Balb/c por via intranasal	43
5.4.2- Acasalamento	43
5.4.3- Cesariana <i>post-mortem</i>	44
5.5 - Avaliação da transmissão vertical	44
5.6 - Avaliação da eliminação de VACV no leite	45
5.7- Transmissão de VACV pelo leite	47
5.7.1- Infecções de camundongos Balb/c por via oral	47

5.8- Coleta e processamento de espécimes clínicos	47
5.9- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	48
5.10- Extração de DNA pelo método fenol-Clorofórmio	49
6- Resultados.....	50
6.1- Transmissão vertical em Balb/c grávidas - parto normal.....	50
6.2- Transmissão vertical em Balb/c grávidas - cesariana post-mortem	57
6.2.1- Virulência de GP2V em Balb/c fêmeas adultas.....	64
6.3- Transmissão horizontal em Balb/c lactantes	64
6.4- Presença de DNA viral e partículas virais viáveis no leite de camundongos Balb/c lactantes	67
6.5- Transmissão de VACV-GP2 por via oral em camundongos Balb/c.....	69
6.6- Virulência em camundongos Balb/c nascidos de fêmeas infectadas com GP2V inoculados com GP1V	70
7-Discussão	71
8-Conclusões.....	78
9-Referências.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia e estrutura dos poxvirus.....	5
Figura 2: Eletromicrografia de transmissão de (A) IMV, (B) IEV e (C) EEV.....	6
Figura 3: Representação esquemática do genoma dos vírus do gênero <i>Orthopoxvirus</i>	7
Figura 4: Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos poxvirus.....	11
Figura 5: Evolução da erupção cutânea típica da varíola em criança no 3º, 5º e 7º dias após o período de incubação.	13
Figura 6: Lesões de cowpox em ratos e humanos durante um surto na Alemanha.....	15
Figura 7: Monkeypox humano.	17
Figura 8: Modelo hipotético do ciclo de transmissão do VACV.....	20
Figura 9: Complicações graves da vacinação.	21
Figura 10: Mapa do Brasil mostrando os estados e os biomas ecológicos.....	23
Figura 11: Lesões causadas por infecção por VACV durante a amamentação.	27
Figura 12: Mapa do estado de Minas Gerais demonstrando o número de amostras de leite coletadas em cada cidade.	29
Figura 13: Lesões causadas por infecção pelo Passatempo virus.....	34
Figura 14: Sinais clínicos em camundongos Balb/c infectados com br-VACV.	34
Figura 15: Dispositivo de ordenha para coleta de leite em camundongo.	46
Figura 16: Camundongos Balb/c grávidas infectadas com GP2V.	51
Figura 17: Camundongos Balb/c neonatos nascidos de fêmeas infectadas com GP2V.	52
Figura 18: Peso de camundongos Balb/c grávidas infectadas com GP2V.....	52
Figura 19: Detecção de vírus nas fezes e no sangue dos camundongos grávidas Balb/c infectados com GP2V e no sangue de neonatos em avaliação feita por PCR para o gene <i>vgf</i>	54
Figura 20: Detecção de vírus em amostras de estômago de camundongos neonatos Balb/c nascidos de fêmeas infectadas com GP2V em avaliação feita por Nested- PCR para o gene <i>vgf</i>	54
Figura 21: Isolamento viral do estômago de camundongos neonatos Balb/c nascidos de fêmeas infectadas com GP2V.	54
Figura 22: Camundongos neonatos Balb/C nascidos de fêmeas infectadas com GP2V.	55
Figura 23: Alinhamento de sequências de nucleotídeos amplificadas do gene <i>vgf</i> em amostras de estômago.	55
Figura 24: Ensaio de soroneutralização.....	56
Figura 25: Cesariana <i>post-mortem</i> A.....	58
Figura 26: Cesariana <i>post-mortem</i> B.....	59
Figura 27: Peso de camundongos Balb/c grávidas infectadas com GP2V.....	60
Figura 28: Detecção de DNA viral nas fezes e sangue de camundongos Balb/c grávidas infectadas com GP2V em avaliação feita por Nested-PCR para o gene <i>vgf</i>	61

Figura 29: Detecção de vírus na placenta de camundongos Balb/c grávidas infectados com GP2V em avaliação feita por Nested-PCR para o gene <i>vgf</i> e inoculação em MCA.....	63
Figura 30: Detecção de DNA viral em fetos de camundongos Balb/c nascidos de mãe infectadas com GP2V após cesariana pós-mortem analisados em Nested-PCR para o gene <i>vgf</i>	64
Figura 31: Detecção de DNA viral no sangue de camundongos Balb/c lactentes que amamentaram em fêmeas infectadas com GP2V.....	66
Figura 32: Aparato de ordenhar camundongo.....	68
Figura 33: Ordenha de camundongos Balb/c lactantes.....	68
Figura 34: Inoculação oral em camundongos Balb/c neonatos com GP2V.....	69
Figura 35: Peso de camundongos Balb/c que amamentaram em mães inoculadas com GP2V e foram desafiados com GP1V.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies do gênero Orthopoxvirus com seus respectivos hospedeiros e região geográfica de infecções naturais.	2
Tabela 2: Os dois grupos de VACV isolados no Brasil.....	22
Tabela 3: Transmissão viral durante a amamentação.....	28
Tabela 4: Grupos de animais propostos para avaliação da transmissão vertical de GP2V.	45
Tabela 5: Iniciadores utilizados para a amplificação do gene vgf por Nested- PCR....	48
Tabela 6: Infecção de camundongos Balb/c fêmeas grávidas com parto normal.....	50
Tabela 7: Detecção de vírus em camundongos Balb/c neonatos nascidos de camundongos grávidas infectadas com GP2V em avaliação feita por Nested-PCR para o gene vgf e por isolamento viral.....	53
Tabela 8: Infecção de camundongos Balb/c fêmeas grávidas com parto cesariana e coleta individual de material*.	57
Tabela 9: Detecção de DNA viral nas fezes e sangue de camundongos Balb/c grávidas infectadas com GP2V em avaliação feita por Nested-PCR para o gene <i>vgf</i>	60
Tabela 10: Detecção de vírus em fetos e placentas de camundongos Balb/c infectados GP2V.	62
Tabela 11: Peso de camundongos Balb/c lactantes e dias de eutanásia.	65
Tabela 12: Camundongos Balb/c lactantes infectados com GP2V. Positividade em Nested-PCR para o gene vgf em sangue e fezes.	66
Tabela 13: Detecção de DNA viral em camundongos Balb/c lactentes que amamentaram em fêmeas infectadas com GP2V. Positividade em Nested-PCR para o gene vgf em sangue e no estômago.....	66
Tabela 14: Camundongos Balb/c lactantes utilizados para detecção de vírus no leite.	67
Tabela 15: Escala de eutanásia dos filhotes de camundongos Balb/c inoculados por via oral.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ARAV: *Araçatuba virus*.
ATCC: American Type Culture Collection.
ATI: Corpúsculo de inclusão do tipo acidófilo.
BAV: *BeAn 58058 virus*.
bp: Pares de base.
BPXV: *Buffalopox virus*.
BSA: *Bovine serum albumin*, albumina sérica bovina.
BSC-40: Células epiteliais de rim de macaco verde
CDC: Centers for Disease Control and Prevention
CEV: Vírus envelopado associado à célula
CO₂: Monóxido de carbono
CPXV: *Cowpox virus*
CTGV: *Cantagalo viru*
d.p.i.: dias pós-infecção.
DNA: Ácido desoxirribonucléico
dNTP's: Deoxnucleotídeos trifosfato
ECP: Efeito citopático
ECTV: *Ectromelia virus*
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético
EEV: Vírus envelopado extracelular
ELISA: *Enzyme – linked immunosorbent assay*
EUA: Estados Unidos da América
EV: Vírus extracelulares
GP1V: *Guarani virus P1*
GP2V: *Guarani virus P2*
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄: Ácido sulfúrico
ha: Hemaglutinina
ICB: Instituto de Ciências Biológicas
ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses
IEV: Vírus envelopado intracelular
IMV: Vírus maduro intracelular
ITRs: Repetições terminais invertidas
IV: vírus imaturos.
Kb: mil pares de base.
µL: microlitros.
MCA: Membrana corioalantóide
MEM: Meio mínimo de Eagle
mg/mL: miligramas por mililitros.
MgCl₂: Cloreto de magnésio
mL: Mililitros.
mM: milimolar.

MOI: Multiplicidade de infecção.
MPXV: *Monkeypox virus*
mRNA: RNA mensageiro
MV: vírus maduros.
nm: nanômetros.
nt: nucleotídeo
°C: Graus Celsius
OMS: Organização Mundial de Saúde.
OPD: Ortofenilenodiamino
OPV: *Orthopoxvirus*
OPXV: *Orthopoxvirus*
PAGE: Gel de poliacrilamida
pb: pares de base.
PBS: Solução tampão fosfato salina
PCR: Reação em cadeia da polimerase
PFU: Unidades formadoras de placas.
pH: Potencial hidrogeniônico
PSTV: *Passatempo virus*
RNA: Ácido ribonucleico
Rpm: rotações por minuto.
SAV: *SPAn232 virus*
SFB: soro fetal bovino.
U/mL: unidades internacionais por mililitro.
UI: Unidades internacionais
VACV: *Vaccinia virus*.
VACV WR: *Vaccinia virus Western Reserve*
VARV: *Variola virus*
VB: *Vaccinia bovina*
VBH: *Belo Horizonte virus*
Vero: Células fibroblastóides de rim de macaco verde africano
Vgf: Fator de crescimento de VACV
WV: *Wrapped virus* – vírus envelopado

RESUMO

A família *Poxviridae* contém os maiores vírus animais conhecidos, capazes de infectar hospedeiros vertebrados e invertebrados. O *Vaccinia virus* (VACV) pertence ao gênero *Orthopoxvirus* (OPV) e é o protótipo do gênero, sendo utilizado como vacina durante a campanha da erradicação da varíola, coordenada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A vaccinia bovina (VB) é uma doença exantemática emergente e tem ocorrido freqüentemente no Brasil nos últimos 10 anos acometendo vacas e ordenhadores e causando prejuízos econômicos e problemas relacionados à Saúde Pública em diversas regiões. Há poucos estudos sobre a transmissão vertical de amostras de VACV e sobre a patogênese e reações imunológicas de infecções por VACV durante a gravidez, e não se sabe sobre o potencial de transmissão viral através do consumo de leite contaminado. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar em modelo murino a transmissão vertical e pelo leite de amostras de *Vaccinia virus* brasileiras (Br- VACV), empregando camundongos fêmeas Balb/c grávidas e lactantes. Para isso, camundongos Balb/c fêmeas grávidas, não grávidas e lactantes foram inoculadas com GP2V por via intranasal e acompanhadas quanto à sinais clínicos e detecção de DNA viral ou anticorpos neutralizantes para VACV. Os resultados demonstraram que os animais não apresentam morbidade ou mortalidade após a infecção com a amostra GP2V. DNA viral em amostras de fetos e neonatos nascidos de fêmeas infectadas com GP2V, bem como nos filhotes de fêmeas infectadas durante o período de lactação, confirmando a transmissão de VACV de mãe para filho em modelo murino. A detecção de DNA nas amostras de placenta e feto coletadas durante cesariana *post mortem* indicam a transmissão vertical em modelo murino. Com esse estudo foram obtidos avanços no conhecimento deste vírus no esclarecimento dos fatores envolvidos no estabelecimento dos surtos de VB no Brasil, como a origem dos VACV, seus reservatórios naturais e os mecanismos pelos quais os vírus persistem na natureza.

ABSTRACT

Poxviridae contains the largest known animal viruses that infect vertebrate and invertebrate hosts. *Vaccinia virus* (VACV) belongs to the genus (OPV) *Orthopoxvirus* and is the prototype of the family, being used as attenuated virus vaccine during the smallpox eradication campaign, coordinated by the World Health Organization (WHO). Bovine vaccinia (VB) is an emerging and exanthematic outbreak that occurred frequently in the last 10 years in Brazil affecting cows and milkers and causing economic losses and problems related to public health in various regions of the country. There are few studies about vertical transmission of VACV and about the pathogenesis and immunological reactions of VACV infections during pregnancy and lack of knowledge about the potential viral transmission through contaminated milk. Therefore, the objective was to evaluate the vertical and milk transmission of brazilian *Vaccinia virus* (Br- VACV), in pregnant and lactating mice model. Pregnant, non-pregnant and lactating Balb/c mice were inoculated intranasally with GP2V and clinical signs, viral DNA detection and neutralizing antibodies to VACV were evaluated. The results showed that the mice did not show morbidity or mortality after infection with GP2V. Viral DNA was detected in fetuses and neonate born mice infected with GP2V as well as females infected during the lactation period, confirming VACV transmission from mother to child in a murine model. Detection of DNA in placenta and fetus obtained from *post mortem* cesarean indicated vertical transmission in mice. Advances were obtained in the elucidation of factors involved in the establishment of outbreaks of VB in Brazil, as the origin of VACV their natural reservoirs, and the mechanisms by which the virus persists in nature.

1- Introdução

1.1- Classificação

1.1.1- A família Poxviridae

A família *Poxviridae* é composta por complexos vírus de DNA dupla fita que se multiplicam no citoplasma da célula hospedeira. Os poxvirus são classificados em duas grandes subfamílias de acordo com o tipo de hospedeiro: *Chordopoxvirinae* e *Entomopoxvirinae*, que infectam respectivamente vertebrados e invertebrados (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES [ICTV], 2008). A subfamília *Entomopoxvirinae* é dividida em três gêneros que infectam insetos das ordens *Diptera*, *Coleoptera*, *Orthoptera* e *Lepidoptera*. Os membros da subfamília *Chordopoxvirinae* são geneticamente relacionados e possuem morfologia e espectro de hospedeiro similares. Esta subfamília possui oito gêneros: *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Molluscipoxviru* e *Yatapoxvirus* (MOSS, 2007; INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES [ICTV], 2008).

1.1.2- O gênero *Orthopoxvirus*

O gênero *Orthopoxvirus* (OPV) agrupa dez espécies de vírus (Tabela 1), dentre estas espécies encontra-se o *Vaccinia virus* (VACV), o protótipo do gênero OPV que infecta humanos e animais de interesse veterinário (FENNER, 2000; MCFADDEN, 2005; MOSS, 2007). Além do VACV, outros OPV foram identificados infectando humanos, como o *Variola virus* (VARV), agente etiológico da varíola, erradicado em 1980 em uma campanha mundial de vacinação (FENNER *et al.*, 1989), o *Cowpox virus* (CPXV) que tem casos relatados na Europa (PAHLITZSCH *et al.*,

2006), o *Monkey poxvirus* (MPV), endêmico nas aldeias das florestas tropicais da África central e ocidental acometendo humanos esporadicamente (LEVINE *et al.*, 2007), embora casos humanos tenham sido recentemente relatados nos Estados Unidos (KAREM *et al.*, 2005). Os surtos de um VACV Bufalopox virus (BPV) afetando búfalos, vacas e humanos foram relatados em países como Índia, Egito e Bangladesh (SINGH *et al.*, 2007).

Tabela 1: Espécies do gênero Orthopoxvirus com seus respectivos hospedeiros e região geográfica de infecções naturais.

Fonte: FENNER, 2000; MCFADDEN, 2005; DAMON, 2007 – modificado.

Espécies	Hospedeiros	Distribuição geográfica	Referências
<i>Camelpox virus</i>	Camelos	África e Ásia	DAMON, 2007; FENNER, 2000
<i>Cowpox virus</i>	Carnívoros, bovinos, elefantes, seres humanos e pequenos roedores como reservatórios naturais	Europa e oeste da Ásia	FENNER, 2000; MCFADDEN, 2005; DAMON, 2007
<i>Ectromelia virus</i>	Camundongos	Europa	FENNER, 2000; MCFADDEN, 2005; DAMON, 2007
<i>Monkeypox virus</i>	Esquilos e primatas, incluindo o ser humano	Oeste e centro da África	FENNER, 2000; MCFADDEN, 2005; DAMON, 2007
<i>Raccoonpox virus</i>	Roedores e guaxinins	Estados Unidos	FENNER, 2000; DAMON, 2007
<i>Taterapox virus</i>	Gerbil	Oeste da África	FENNER, 2000; DAMON, 2007
<i>Uasin Gishu disease virus</i>	Cavalos, reservatório natural ainda desconhecido	Leste da África	FENNER, 2000; DAMON, 2007

<i>Vaccinia virus</i>	Ampla espectro de hospedeiros. Reservatório natural ainda desconhecido.	Brasil	FENNER, 2000; MCFADDEN, 2005; DAMON, 2007
<i>Variola virus</i>	Seres humanos	Erradicado	FENNER, 2000; MCFADDEN, 2005; DAMON, 2007
<i>Volepox virus</i>	Ratos silvestres (“Voles”)	Estados Unidos	FENNER, 2000; DAMON, 2007

1.2- Morfologia da partícula e estratégia de multiplicação

1.2.1- Morfologia

As partículas dos poxvirus são consideradas grandes quando comparadas com a maioria dos outros vírus animais, sendo geralmente ovóides, em forma de tijolo ou pleomórficas e medindo aproximadamente 140-260 nanômetros (nm) de diâmetro e 220-450 nm de comprimento (Figura 1B) (CYRKLALFF *et al.*, 2005; MOSS, 2007). As partículas consistem de uma membrana de superfície, um cerne e corpúsculos laterais, podendo ou não, apresentar um envelope adicional externo (Figura-1A e C). O material genético é envolvido por um cerne que pode ser bicôncavo (Figura 1A e 1C) unilateralmente côncavo ou cilíndrico, com um ou dois corpúsculos laterais, constituídos por um material heterogêneo sem organização aparente (MALKIN *et al.*, 2003; MOSS, 2007). Uma membrana lipídica contendo proteínas globulares ou tubulares (Figura 1B e C) circunda o cerne e os corpúsculos laterais (MOSS, 2007).

Assim, durante o ciclo de multiplicação são produzidas partículas intracelulares e extracelulares, sendo que, a montagem das partículas virais ocorre através de uma série de estruturas intermediárias que resultam em duas diferentes formas virais infecciosas (CYRKLALFF *et al.*, 2005, MOSS, 2007). A forma infecciosa básica dos poxvirus é o vírus maduro (MV). Os vírus envelopados extracelulares (EV) consistem

essencialmente de MV envolvidos por uma membrana adicional (MOSS & WARD, 2001). Essa nomenclatura para as partículas virais foi proposta por MOSS em 2007, que classificou os vírus maduros intracelulares (IMV) (Figura 2A) como vírus maduros (MV), partículas que possuem apenas uma membrana constituída por bicamada lipídica. Os vírus intracelulares envelopados (SHCHELKUNOV *et al.*, 2002) (Figura2B), por adquirirem um envelope composto por duas membranas que circundam o MV, foram chamados de vírus envelopados (WV). Por fim, as partículas (EEV) vírus envelopado extracelular e (CEV) vírus envelopado associado à célula (Figura2C), por ocorrerem fora da célula, foram denominadas vírus extracelulares (EV), e possuem uma membrana a menos que os WV (Figura 2) (MOSS & WARD, 2001).

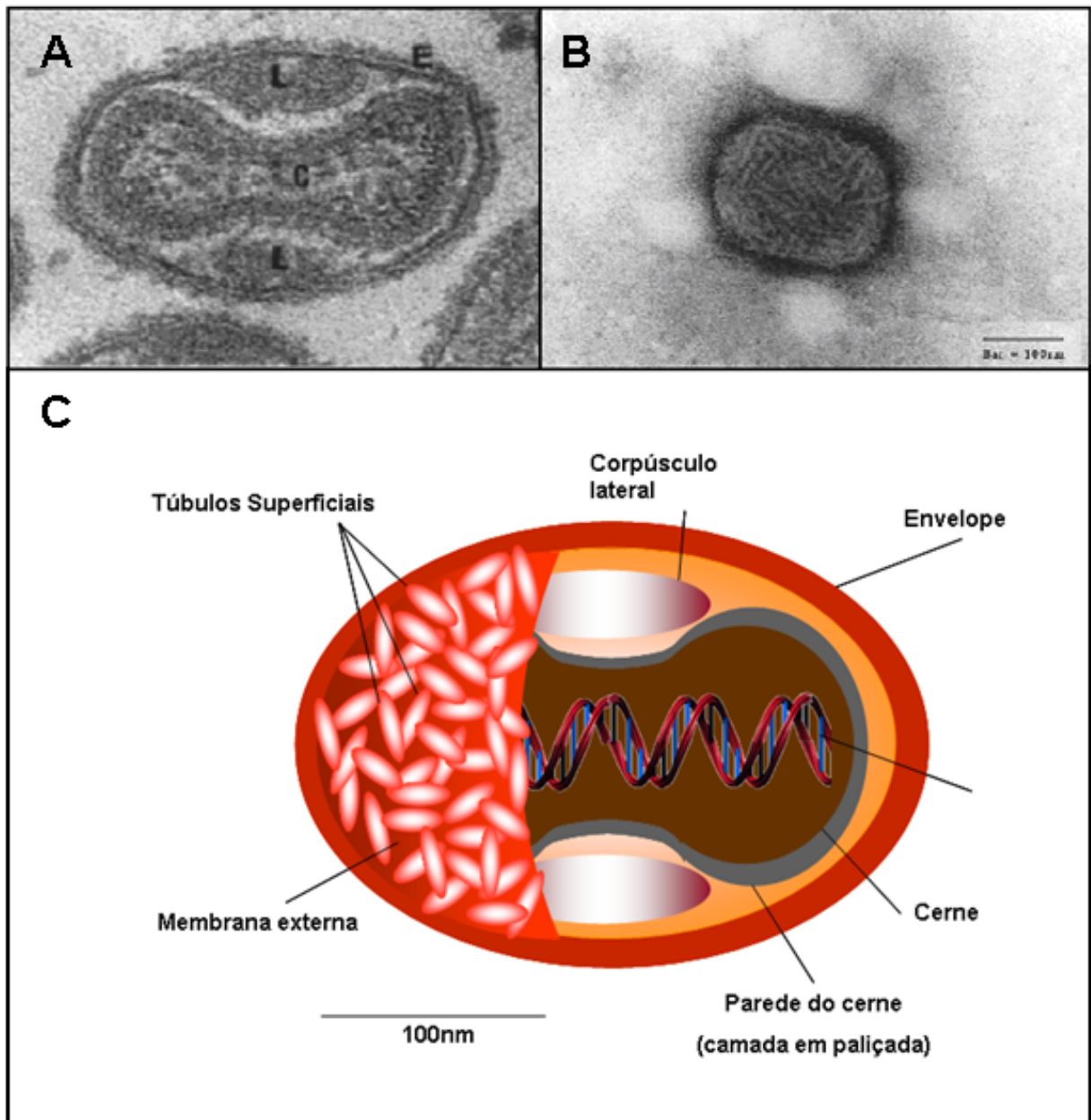


Figura 1: Morfologia e estrutura dos poxvirus.

A- Microscopia eletrônica de transmissão de *Vaccinia vírus*, partícula intracelular madura (MV). L: corpúsculos laterais; C: core ou cerne; E: membrana externa. **B-** Eletromicrografia de um vírus do gênero *Orthopoxvirus*. **C-** Representação esquemática de um poxvírus. **Fonte: MOSS, 2001; ICTV, 2006 e FENNER, 1989 – modificado.**

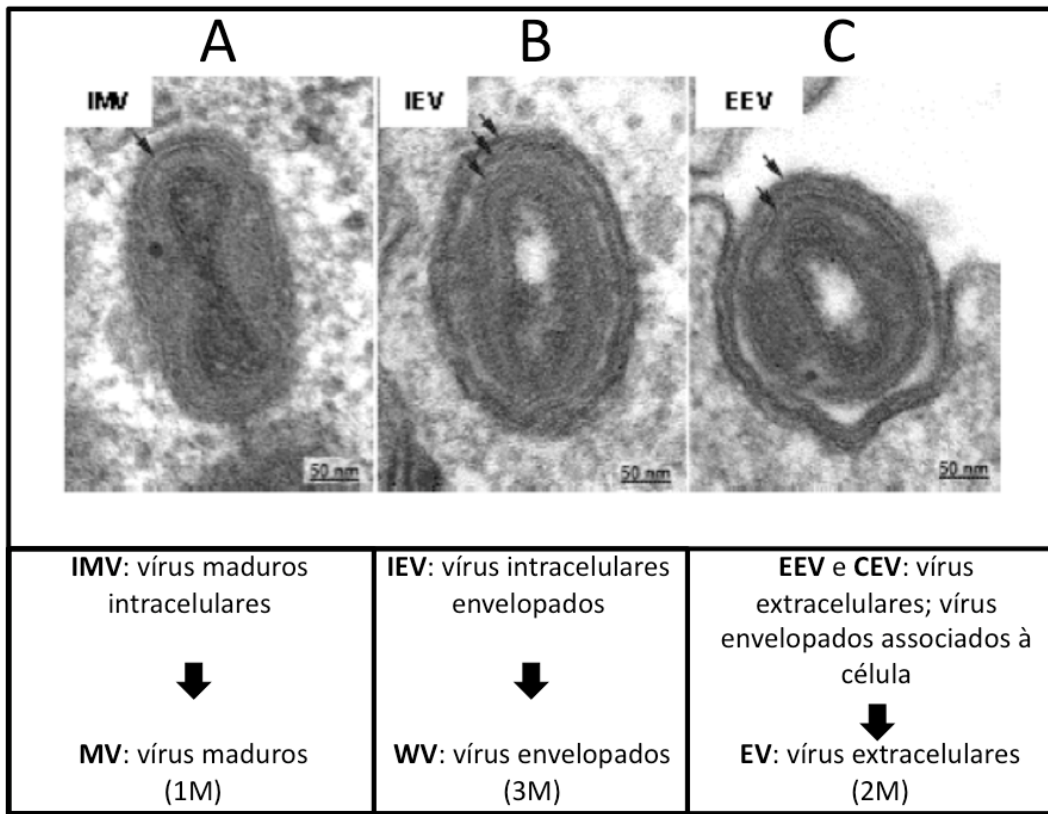


Figura 2: Eletromicrografia de transmissão de (A) IMV, (B) IEV e (C) EEV.

As setas indicam as membranas presentes nas partículas. *M: indica o número de membranas. **Fonte: MOSS, 2007 – modificado.**

1.2.2- Organização do genoma

O genoma dos vírus que constituem a família *Poxviridae* é composto por uma única molécula de DNA (ácido desoxirribonucléico) de dupla fita linear que varia de aproximadamente de 134 kpb (mil pares de base) em parapoxvirus até mais de 300 kpb em alguns avipoxvirus. Este DNA linear é ligado covalentemente por alças de fita simples em suas extremidades (MOSS & WARD, 2001; INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES [ICTV], 2008). Todos os poxvirus possuem regiões denominadas ITR's (repetições terminais invertidas), que consistem de sequencias idênticas, mas com orientações opostas nas duas extremidades do genoma (MOSS & WARD, 2001), os genes que constituem estas sequências são

O seqüenciamento do genoma de VACV revelou um potencial de codificação de aproximadamente 200 genes, estes não possuem introns e cada gene conta com seu próprio promotor transcricional. Além disso, 25 das proteínas codificadas por esses genes tem papel conhecido ou presumido na transcrição viral e processamento do mRNA (RNA mensageiro) (CONDIT, 2007).

1.2.3- Ciclo de multiplicação

Um dos parâmetros comumente utilizados para a caracterização dos vírus que constituem a família *Poxviridae* é a multiplicação dos mesmos inteiramente no citoplasma da célula hospedeira, exigindo que as partículas virais codifiquem toda a maquinaria necessária para a síntese do mRNA adequado para a tradução em um ambiente eucariótico (CONDIT, 2007)

O estudo dos mecanismos usados pelos VACV, o protótipo do gênero OPV, para penetrar na célula hospedeira é complicado devido à existência de múltiplas formas infecciosas que diferem uma da outra pela presença de uma membrana externa como citado acima (Figura 2). Entretanto cada forma é composta por um mesmo cerne de DNA e várias enzimas e fatores para expressão precoce de genes, envolvidos por uma membrana lipídica que possuem dezenas de proteínas virais não glicosiladas (MOSS & WARD, 2001; SENKEVICH *et al.*, 2004; MOSS, 2007). Contudo, essas diferentes formas infecciosas diferem na abundância, estrutura, localização e papel no ciclo de multiplicação do vírus (SMITH & MCFADDEN, 2002). A forma mais simples e mais abundante é o MV (MOSS, 2007; TOWNSLEY *et al.*, 2006). Dois diferentes tipos de partículas infecciosas: MV e EV podem dar início ao ciclo de multiplicação (Figura 4), com a adsorção e subsequente fusão das membranas virais com a membrana celular do hospedeiro. O MV e EV diferem em suas glicoproteínas de superfície, no número de membranas que os envolve e no mecanismo de penetração na célula hospedeira (MCFADDEN, 2005). Acredita-se que várias proteínas virais sejam importantes para a adsorção da partícula viral na superfície celular, entretanto, estudos utilizando purificação por imunoafinidade e

espectrometrias de massa revelaram oito proteínas formando um complexo estável relacionado com a fusão e penetração viral (SENKEVICH *et al.*, 2004). TOWNSLEY e colaboradores (2006) demonstraram que o VACV também pode penetrar na célula hospedeira pelo mecanismo de endocitose mediada por receptor, em uma via endossômica que requer acidificação.

Pouco se conhece a respeito da fusão entre as partículas virais e a membrana da célula hospedeira, entretanto, acredita-se que a forma MV penetre na célula através da fusão do seu envelope com a membrana celular, enquanto que a forma EV perca uma de suas membranas externas e em seguida ocorra a fusão da membrana interna com a membrana citoplasmática (BROYLES, 2003). Esses dois processos são denominados desnudamento primário e resultam na liberação do cerne viral no citoplasma celular, seguido pelo desnudamento secundário que consiste na degradação do cerne e consequente liberação do DNA (Figura 4). Uma vez no citoplasma, o DNA viral é transcrito por meio de uma série de proteínas virais presentes no capsídeo viral. A maioria dos poxvírus coordena o processo de replicação do genoma e montagem da partícula viral, através de uma fina regulação da expressão de genes individuais. Deste modo, as proteínas que participam na replicação do DNA, biossíntese de nucleotídeos e transcrição de genes intermediários são sintetizadas precocemente, caracterizando a transcrição de genes precoces e aquelas proteínas que participam na montagem e morfogênese da partícula são expressas após a replicação do DNA caracterizando a expressão dos genes tardios (Figura 4) (BROYLES, 2003).

A montagem e maturação das partículas virais ocorrem em locais específicos do citoplasma denominados “fábricas virais” (Figura 4), de modo que a primeira estrutura visível dentro destas fábricas virais são estruturas denominadas “crescentes” que são compostas por lipídeos e proteínas virais. Estes crescentes por sua vez, vão se arranjando de forma ovalada em torno das proteínas e DNA viral, esse empacotamento dá origem aos vírus imaturos que passam por um processo de maturação, envolvendo uma série de clivagens proteolíticas das proteínas do capsídeo e condensação do cerne para formar os MVs (Figura 4) (SMITH *et al.*, 2003).

Apesar das formas MVs serem infecciosas, a maioria dos permanece intracelularmente e é liberado somente quando ocorre a lise celular (SMITH et al., 2003). Porém, os MVs podem adquirir mais duas membranas no complexo de Golgi formando os WVs, que se movem através de microtubulos para a periferia da célula. Quando ocorre o encontro com a membrana plasmática a membrana externa do WV se funde com a membrana citoplasmática resultando em exocitose e formando os EVs (Figura 4). Entretanto, eventualmente algumas partículas podem permanecer associadas à membrana citoplasmática, dando origem aos vírus envelopados associados à célula, também classificado como um EV (DOCEUL *et al.*, 2010; MOSS, 2007). Contudo os EVs são liberados rapidamente e medeiam uma eficiente disseminação célula-célula e uma disseminação de longo alcance (DOCEUL *et al.*, 2010)

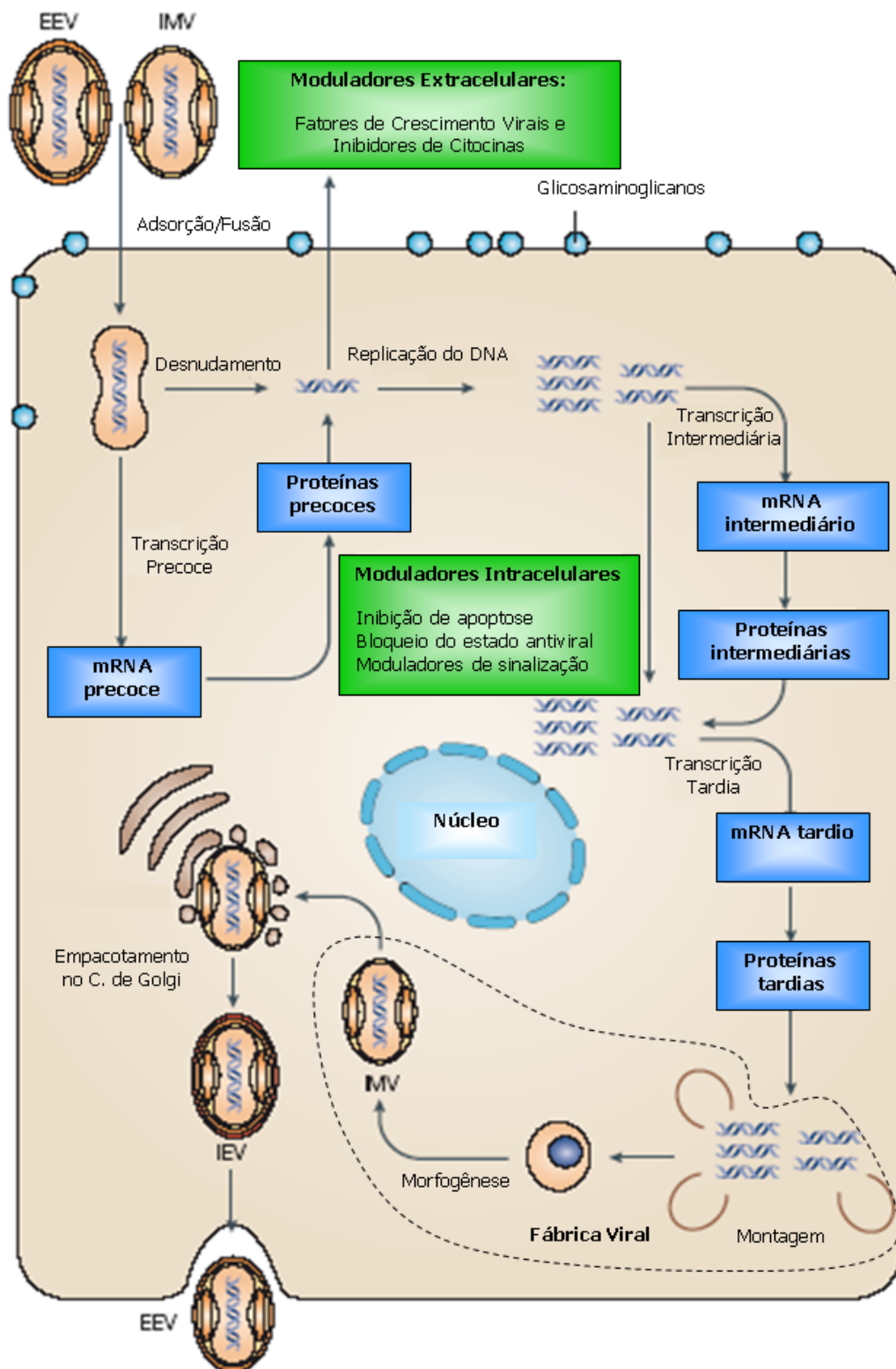


Figura 4: Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos poxvirus.
Fonte: McFADDEN, 2005 – modificado por ABRAHÃO, 2010.

1.3- Ocorrência mundial Orthopoxvirus

1.3.1- Variola virus: Um breve histórico

Infecções humanas causadas por OPXV estão intimamente ligadas à história do desenvolvimento médico-científico. A varíola humana é, até hoje, considerada uma das doenças infecciosas mais importantes da história da humanidade, e sua erradicação, no final da década de 1970, coordenada pela OMS, constituiu uma das maiores vitórias da medicina em sua história recente (FENNER, 1989). A primeira medida de controle da varíola foi a variolação, um processo no qual o *Variola virus* “vivo” era obtido de uma pessoa infectada com varíola e administrada em um indivíduo não infectado. Esse processo tinha uma taxa de mortalidade de aproximadamente 1%, muito mais baixa do que a taxa de mortalidade que resultava da infecção natural pela rota respiratória, que chegava a ter uma taxa de mortalidade superior a 40%. A variolação foi praticada na Índia e na China por séculos antes da sua introdução no leste da Europa em 1723, onde foi utilizada amplamente como o único meio de proteção contra a varíola, até Edward Jenner introduzir a vacinação em 1796. Edward Jenner observou que ordenhadoras eram infectadas em seus braços por um agente contagioso como resultado da ordenha de vacas e que elas ficavam protegidas da infecção subsequente de varíola. A partir destas observações Jenner retirou material das lesões das ordenhadoras e vacinou um garoto que foi subsequentemente desafiado com *Variola virus*, que permaneceu livre da varíola. Este trabalho marcou o início da era da vacinação (SMITH & MCFADDEN, 2002).

Apesar de a varíola ter sido designada por diferentes nomes em diferentes línguas, a necessidade de distinguir as variedades da doença tornou-se eminente com a observação da divergência dos sinais clínicos, que variavam de acordo com a região geográfica do mundo. Essas diferenças deram origem às designações “variola minor” usada para a doença mais branda e o termo “variola major” para a varíola clássica (TOGNOTTI, 2010).

A infecção natural ocorria através da implantação do vírus na orofaringe ou na mucosa respiratória (HENDERSON *et al.*, 1999) e os sintomas clínicos eram descritos como, febre alta, mal estar, cefaléia, prostração, dores abdominais, podendo ocorrer delírio. Em seguida se desenvolvia na mucosa da boca e da faringe a erupção cutânea maculopapular se disseminando posteriormente para o rosto, braços, antebraços, tronco e pernas (Figura 5). (FENNER, 1989; HENDERSON *et al.*, 1999; TOGNOTTI *et al.*, 2010).



Figura 5: Evolução da erupção cutânea típica da varíola em criança no 3º, 5º e 7º dias após o período de incubação.

As lesões são mais densas na face e nos membros do que no tronco. **Fonte: HENDERSON *et al.*, 1999 – modificado.**

No entanto mesmo depois de demonstrado o potencial da vacinação, a erradicação da varíola demorou quase dois séculos para ser alcançada. Vários foram os fatores que ajudaram a explicar esse cenário. Dentre eles destacam-se: a oferta

limitada da vacina, pois cowpox era uma doença relativamente rara no leste da Europa e ausente nas Américas, e os problemas com o transporte da vacina de modo que ela continuasse infecciosa. Dessa forma, somente depois de 1950, com o advento da vacina liofilizada é que houve um grande progresso no sentido da erradicação mundial da varíola (FENNER, 1989; SMITH & MCFADDEN, 2002).

Após a erradicação da varíola, o interesse médico pelo grupo dos OPXV diminuiu dramaticamente. Entretanto, as recentes mudanças político-sociais no mundo trouxeram de volta o temor de que OPXV possam estar novamente associados a importantes surtos infecciosos humanos. Este temor se concentra, principalmente, no uso ou liberação indevida do VARV como ato bioterrorista. Além disso, infecções causadas por outros membros do gênero OPXV têm surgido ou aumentado de forma alarmante, causando um grande impacto na saúde humana e de outros animais devido a emergência e re-emergência destes agentes zoonóticos (ESSBAUER et al., 2008; HENDERSON *et al.*, 1999).

1.3.2- Cowpox virus

O *Cowpox virus* (CPXV) recebeu esse nome porque esse vírus foi isolado de bovinos infectados, no entanto a infecção do gado é esporádica da mesma forma que para humanos e felídeos, mas é grande entre animais selvagens. O reservatório natural de CPXV ainda é incerto, mas estudos demonstram que os roedores devem ser os responsáveis pela sua circulação (FENNER, 1989). Cowpox ou “varíola bovina” é a doença causada pela infecção por CPXV, e tem sido reconhecida na Europa a várias centenas de anos como doença do gado que é transmissível ao homem produzindo uma doença leve caracterizada por erupções nas tetas das vacas ou nas mãos do ordenhador. Embora as infecções humanas sejam autolimitadas elas podem se tornar generalizadas ou fatais para pacientes imunossuprimidos. Atualmente, a infecção por CPXV raramente está associada com as vacas como hospedeiro natural. Nos últimos anos, um grande número de amostras foi isolado a partir de uma variedade de diferentes espécies animais, tais como animais de

zoológico e em especial os gatos. Essas amostras se mostraram muito similares as amostras de CPXV isoladas de vacas e humanos, tanto em suas propriedades biológicas como em suas características genéticas (MEYER *et al.*, 1999). Desta forma, a hipótese dos hospedeiros zoonóticos acidentais, corrobora com o resultado de vários inquéritos epidemiológicos que tem identificado os gatos como os hospedeiros mais comuns para CPXV. Além disso, anticorpos específicos contra OPVs frequentemente são identificados em roedores e carnívoros (PAHLITZSCH *et al.*, 2006).

Em 2007 um elefante (*Elephans maximus*) de circo do norte da Alemanha exibiu lesões ulcerativas na pele e mucosas causadas por uma infecção por CPXV, apesar de várias tentativas terem sido feitas para sua recuperação, todas foram sem sucesso culminando na eutanásia do animal. Neste relato, a principal fonte provável da infecção foram roedores silvestres que haviam se propagado e infestado a área devido ao inverno (KURTH *et al.*, 2008).

Muitos casos de infecções humanas causadas por CPXV têm sido relatados na Europa e estados do oeste da antiga União Soviética (BABIX *et al.*, 1994). Como um caso de erisipela e celulite facial causada por uma infecção por CPXV que acometeu uma garota de sete anos de idade, tendo como fonte mais provável da infecção o contato com gatos domésticos (PAHLITZSCH *et al.*, 2006). Apesar da transmissão de CPXV de roedores silvestres para humanos ter sido relatada recentemente (WOLFS, *et al.*, 2002), alguns surtos de cowpox acometendo humanos e roedores domésticos também tem sido relatados na Alemanha e França (Figura 6) (CAMPE *et al.*, 2009; NINOVE *et al.*, 2009).



Figura 6: Lesões de cowpox em ratos e humanos durante um surto na Alemanha.

A- Roedor com lesões nos membros posteriores. B- Lesões no pescoço de uma criança sem vacinação prévia com VACV. C- Lesão no pescoço de uma pessoa com histórico de vacinação contra VARV. Fonte: NINOVE *et al.*, 2009.

1.3.3- Monkeypox vírus (MPXV)

MPXV presumivelmente surgiu na África subsaariana há milhares de anos, desde que os seres humanos adquiriram o vírus, através do contato direto com animais infectados. Entretanto, o reservatório pra MPXV ainda é desconhecido, porém, há dados que sugerem que primatas não humanos sejam os hospedeiros acidentais, e que o reservatório provável seja uma ou várias espécies de roedores e esquilos que habitam as regiões de florestas tropicais da África central e ocidental (ARITA & HENDERSON, 1976; SHCHELKUNOV *et al.*, 2002; NALCA *et al.*, 2005; ESSBAUER *et al.*, 2008).

O monkeypox MPX foi descrito pela primeira vez como uma doença que causava erupção cutânea em macacos de cativeiro em um zoológico de Copenhagen em 1957 (ARITA & HENDERSON, 1976; ESSBAUER *et al.*, 2008). E o primeiro relato de MPX como uma doença humana foi em uma criança de nove meses de idade do Zaire em 1970 (NALCA *et al.*, 2005). Assim como nas outras doenças causadas por poxvirus zoonóticos, os sinais clínicos causados pela infecção pelo MPXV são lesões cutâneas que aparecem após um período de incubação, evoluindo de uma fase com pústulas a crostas, frequentemente em um período de várias semanas. Entretanto, na maioria das outras doenças causadas por OPV, o número de lesões é geralmente pequeno, ao contrário das infecções por MPXV, que apresenta lesões frequentemente dispersas se assemelhando a varíola (Figura 7) (LEWIS-JONES, 2004; NALCA *et al.*, 2005).

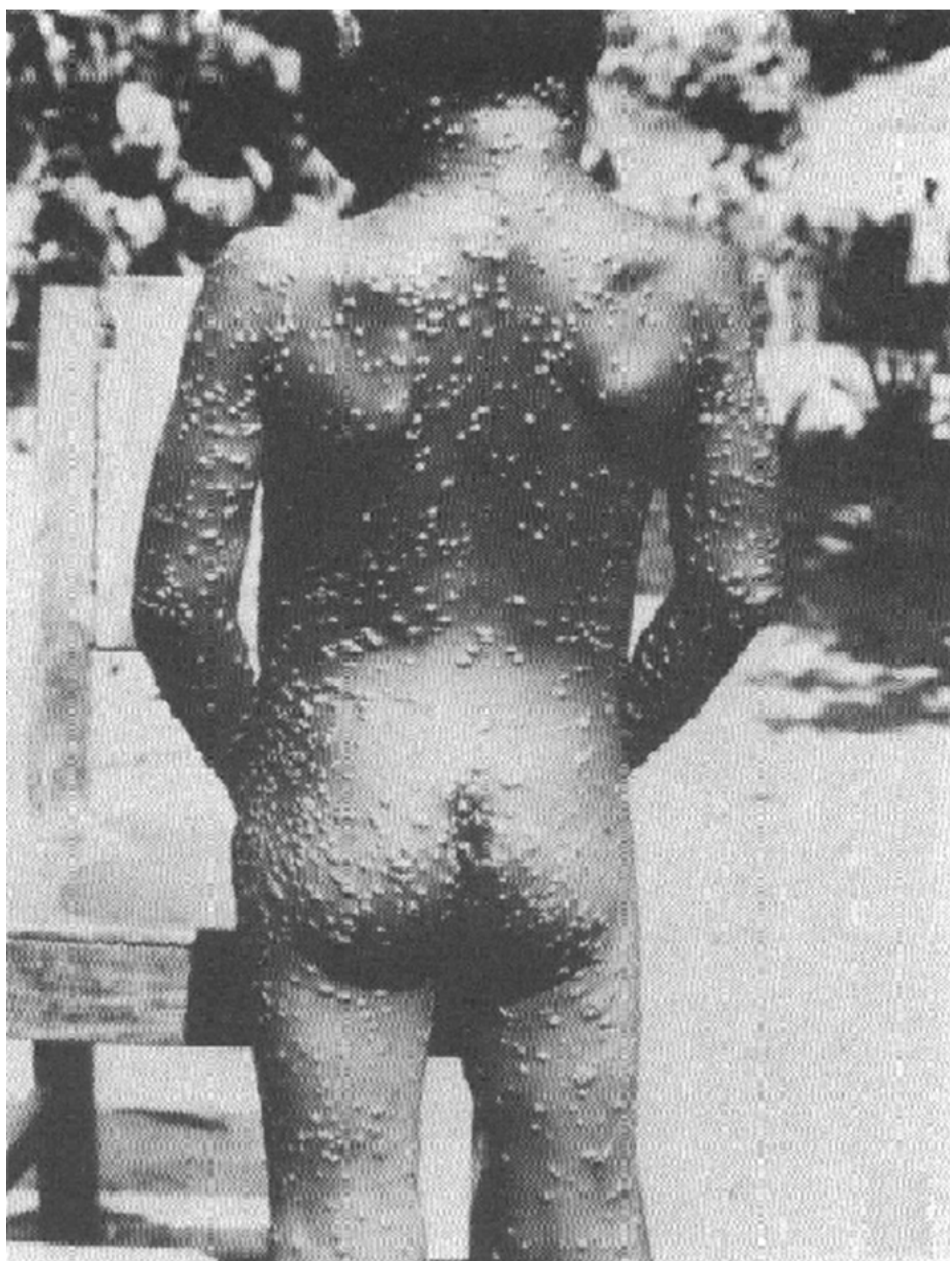


Figura 7:Monkeypox humano.

O 8º dia das lesões cutâneas causadas por monkeypox em uma garota de 7 anos de idade da Republica Democrática do Congo. **Fonte: BREMAN et al., 1980.**

Apesar de MPXV ocorrer naturalmente na África, sendo os casos clínicos, portanto restritos a essa região, recentemente no ano de 2003, uma inadvertida importação de roedores africanos causou um surto de MPXV no centro-norte dos

Estados Unidos (DI-GIULIO & ECKBURG, 2004; NALACA *et al.*, 2005). Foram relatados 81 casos com sinais clínicos, sendo 40 confirmados por testes laboratoriais, acometendo principalmente veterinários e vendedores de animais (GUARNER *et al.*, 2004).

1.3.4- Vaccinia virus (VACV)

A maioria dos trabalhos experimentais com os vírus do gênero *Orthopoxvirus* e a família *Poxviridae* têm sido realizados com o VACV. Além disso, essa espécie foi amplamente utilizada como vacina de vírus vivo e por um período muito maior do que qualquer outro agente imunizante (FENNER, 1989). Atualmente o VACV é utilizado no esquema de vacinação contra varíola que é destinado a pessoas que trabalham em laboratórios com OPVs, profissionais da saúde e militares nos Estados Unidos (DAMON, 2007).

A vacina desenvolvida por Jenner era produzida com CPXV e durante o século IX o vírus utilizado na vacinação era derivado de lesões em vacas e algumas vezes de cavalos em vários países da Europa. Em 1939, Downie descreveu as características biológicas de CPXV, esses estudos demonstraram que a vacina contra varíola utilizadas na época da caracterização e provavelmente por muitos anos antes de 1930 não consistia do CPXV, mas de outro OPV que era chamado de "*Vaccinia virus*", mas que possuía propriedades biológicas diferentes do CPXV (FENNER, 1989). As origens do VACV são desconhecidas, mas várias hipóteses existem para explicar a sua origem. Algumas hipóteses defendem que ele pode ter surgido de uma recombinação entre CPXV e VARV ou pode ter surgido do CPXV ou de algum outro OPV através de passagens seriadas sob condições artificiais de cultura (FENNER, 1989). Foi sugerido também por BAXBY, em 1981, que ele pode ser um vírus de laboratório e que foi extinto da natureza.

Quanto à origem dos VACV brasileiros alguns pesquisadores sugerem a possibilidade de que esses vírus tenham escapado da vacina contra varíola, particularmente a VACV-IOC e VACV-Lister. (DAMASO *et al.*, 2000). De fato, o gene que codifica a *ha* tem sido um marcador potencial para diagnóstico molecular e

estudos filogenéticos. Em particular, uma deleção de 18 nucleotídeos (nt) dentro deste gene tem sido proposta para identificar os VACV brasileiros (DAMASO *et al.*, 2000). Entretanto, estudos posteriores da comparação das sequências de três genes e uma região variável do genoma dos OPVs brasileiros com a vacina utilizada na campanha da erradicação da varíola no Brasil demonstraram que não existe essa correlação e que registros históricos levantaram a possibilidade de que as amostras que circulam atualmente no Brasil foram introduzidas através do comércio de escravos em meados do século IX, por meio da introdução da vacina cultivada em animais no final do século IX ou subsequentemente pela introdução de VACV através da compra da vacina contra varíola durante o programa de erradicação em meados do século XX, assim as origens do VACV na natureza permanece um mistério (LEITE *et al.*, 2005; TRINDADE *et al.*, 2007).

A circulação do VACV dentro ou entre as fazendas durante os surtos de vaccinia bovina (VB) no Brasil é normalmente promovido por ordenhadores infectados que disseminam o vírus para o rebanho pelo contato com mãos infectadas e através do comércio do gado infectado entre as propriedades (LEITE *et al.*, 2005). Entretanto, alguns surtos de VACV são temporalmente e espacialmente distantes das áreas com VB notificadas previamente. Além disso, a VB ocorre normalmente durante a estação seca, quando alguns biomas brasileiros apresentam uma escassez de alimentos, levando algumas espécies silvestres a procurar alimento nos celeiros e currais das fazendas. Ratos, camundongos, gambás, raposas, cachorros do mato e pequenos felinos são freqüentemente observados ao redor das fazendas. Em teoria, algumas dessas espécies, principalmente roedores, podem ser os reservatórios de VACV (ABRAHÃO *et al.*, 2009a).

De fato, as amostras de VACV: Cotia virus (CTV)/SPAN 232 virus (SAV) e BeAn 58058 vírus (BAV) (LOPES *et al.*, 1065; da FONSECA *et al.*, 1998; da FONSECA *et al.*, 2002) foram isoladas nas florestas brasileiras, longe dos ambientes rurais (da FONSECA *et al.*, 1998; MARQUES *et al.*, 2001; TRINDADE *et al.*, 2007) e estudos sorológicos com animais silvestres capturados no cerrado brasileiro e animais da Amazônia, revelaram alta prevalência de mamíferos soro positivos contra OPVs (ABRAHÃO *et al.*, 2010a). Adicionalmente, um estudo recente, realizado para

avaliar a soroprevalência de OPVs em uma comunidade rural da região Amazônica onde surtos de OPVs ainda não foram notificados, demonstrou uma soroprevalência de 27,89% da população avaliada, sendo que destes, 26,38% não eram vacinados contra varíola. Assim, existem fortes evidências de que os OPVs circulam nessa população uma vez que surtos anteriores nunca foram relatados anteriormente (MOTA *et al.*, 2010).

Abrahão em 2009, após isolar pela primeira vez um VACV de um roedor durante um surto de VB que ocorreu na região da cidade de Mariana no estado de Minas Gerais, juntamente com os dados disponíveis anteriormente, propôs um modelo hipotético do ciclo de transmissão do VACV envolvendo roedores peridomésticos (Figura 8). Neste modelo, acredita-se que os roedores peridomiciliares podem promover a transmissão de VACV entre animais selvagens e o gado ou humanos, uma vez que eles circulam tanto em fazendas quanto em seus arredores.

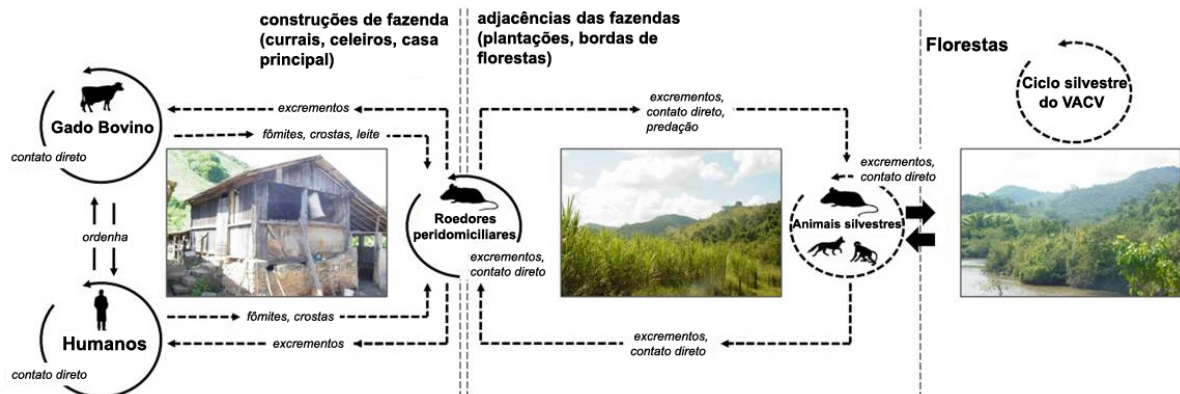


Figura 8: Modelo hipotético do ciclo de transmissão do VACV.

Esse diagrama foi proposto com base na publicação de dados laboratoriais e epidemiológicos do VACV e de acordo com as características comportamentais dos animais selvagens e os roedores brasileiros. As linhas contínuas determinam dados determinados experimentalmente e as linhas pontilhadas indicam propostas hipotéticas que ainda estão sob investigação. **Fonte: ABRAHÃO *et al.*, 2009a - modificado por CAMPOS.**

Dessa forma, ao contrário do VARV que possui um espectro de hospedeiro restrito, o VACV possui um amplo espectro de hospedeiros e se multiplica rapidamente e em altos títulos em muitas espécies de animais e na maioria dos tipos de cultura celular. Em ovos embrionados o vírus produz pocks grandes na membrana corioalantóide (MCA) em 48 horas, enquanto que outros OPVs produzem pocks

menores e levam três dias para alcançar o tamanho ideal para a contagem (FENNER, 1989). A infecção por VACV comumente progride através em diversos estágios que variam de pápulas a vesículas, pústulas e crostas. Entretanto, a vacina contra varíola que compreende o VACV, possui alta taxa de eventos adversos. As maiores complicações incluem a vaccinia progressiva, eczema vaccinatum, vaccinia generalizada, encefalite pos-vacinal, infecções acidentais e miocardites (Figura 9) (DAMON, 2007).

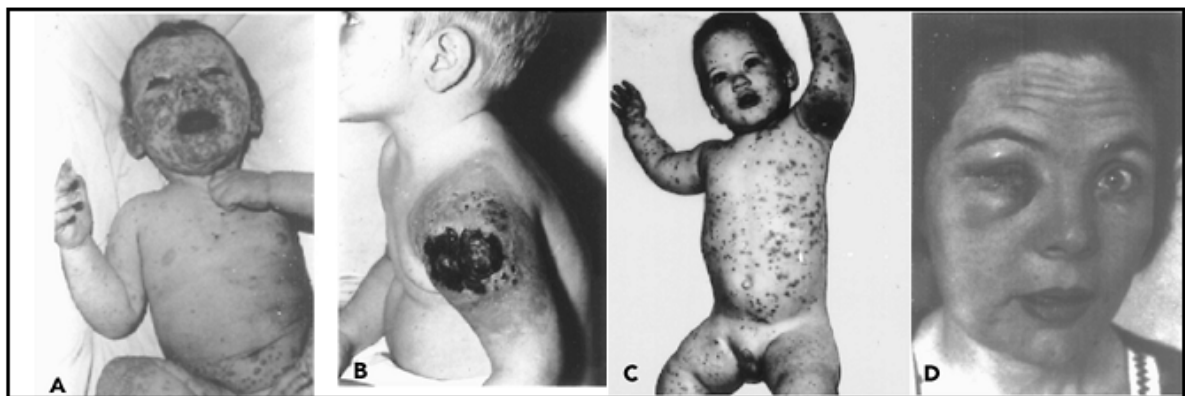


Figura 9: Complicações graves da vacinação.

A: Eczema vaccinatum em um indivíduo não vacinado que entrou em contato com seu irmão vacinado. B: Vaccinia progressiva, anteriormente conhecida como vaccinia necrosum, em uma criança com defeito congênito na imunidade mediada por células. C: Vaccinia generalizado dez dias após a vacinação. D: Vaccinia ocular. **Fonte: Damon, 2007 – modificado.**

Apesar de todos os VACV isolados no Brasil terem sido igualmente patogênicos para o gado produzindo o mesmo padrão de lesões macroscópicas característica da VB, estudos de caracterização dessas amostras demonstraram que existe uma variabilidade genética entre essas amostras que pode refletir em diferentes características biológicas (FERREIRA *et al.*, 2008a).

Leite e colaboradores em 2007, baseados na estrutura do gene de inclusão tipo-A (*ati*) evidenciaram a existência de três grupos distintos de VACVs brasileiros (Br-VACV). Posteriormente, em análises filogenéticas baseadas nas sequências dos genes A56R, B19R, E3L (TRINDADE *et al.*, 2007) e dez genes relacionados com virulência e espectro de hospedeiros Ferreira e colaboradores em 2008

demonstraram a existência de pelo menos dois grupos bem definidos de Br-VACV (Tabela 2).

Tabela 2: Os dois grupos de VACV isolados no Brasil.
Fonte: TRINDADE et al., 2007; CAMPOS et al., 2010 – modificado.

Grupo 1 - Ano de isolamento	Grupo 2 - Ano de isolamento
ARAV – 1999	SPAn 232 – 1961
CTGV – 1999	BeAn 58058 - 1963
GP2V – 2001	VBH – 1993
PSTV – 2003	GP1V – 2001
P2V – 2010	P1V - 2010

Devido à existência dessa diversidade genética observada nas amostras de VAC brasileiros, Ferreira e colaboradores em 2008 realizaram estudos de características biológicas desses dois grupos estabelecidos anteriormente através da observação dos padrões de tropismo e virulência dessas amostras após a infecção de camundongos BALB/c por via intranasal. Esses experimentos demonstraram que os VACV brasileiros possuem perfis de virulência diferentes no modelo utilizado, e baseando nas características biológicas foi possível dividir os VACV brasileiros em dois grupos corroborando com os dados genéticos dos estudos anteriores. As amostras que demonstraram maior virulência foram reunidas em um grupo: SAV (*SPAn232 virus*), VBH (Belo Horizonte virus), BAV (*BeAn 58058 virus*), GP1 (*Guarani virus P1*) e *Pelotas 1 virus* (P1V) e o segundo grupo foi representado pelas amostras menos virulentas: ARAV (Araçatuba virus), GP2 (Guarani virus P2), PSTV (Passatempo virus) e *Pelotas 2 virus* (P2V) (FERREIRA et al., 2008; CAMPOS et al., 2010).

Diante do exposto, evidencia-se que muitos dos fatores envolvidos no estabelecimento dos surtos de VB no Brasil, bem como dados sobre a origem dos VACV, seus reservatórios naturais e os mecanismos pelos quais o vírus persiste na natureza permanecem desconhecidos (FENNER, 1989; TRINDADE, et al., 2007; LEITE et al., 2008; ABRAHÃO et al., 2009a).

1.4- Impacto das zoonoses causadas por poxvírus no Brasil

Infecções zoonóticas humanas causadas pelo VACV no Brasil alcançaram projeção mundial. Desde 1960 os OPVs têm sido repetidamente isolados no Brasil e identificados como VACV (Figura 10) através várias ferramentas dentro da virologia, imunologia clássica e métodos moleculares (da FONSECA *et al.*, 1999; DAMASO *et al.*, 2000, TRINDADE *et al.*, 2006, TRINDADE *et al.*, 2007).

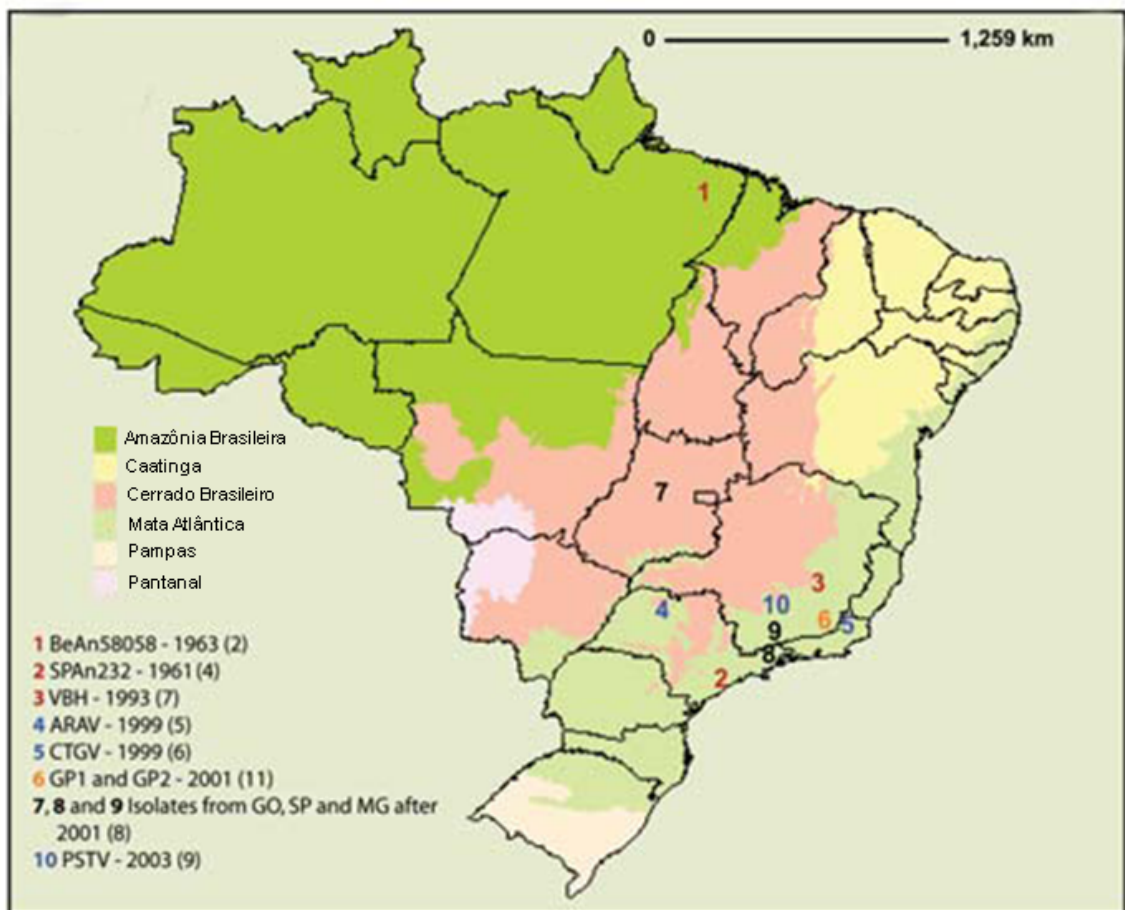


Figura 10: Mapa do Brasil mostrando os estados e os biomas ecológicos.

Os locais de coleta estão representados por números que referem ao isolado brasileiro e seu respectivo ano de isolamento. **Fonte: TRINDADE *et al.*, 2007 – modificado.**

Em 1963, o vírus BeAn 58058 (da FONSECA *et al.*, 1998) foi isolado do sangue de um roedor (*Oryzomys SP.*) capturado próximo a borda de uma área desmatada, limitada pela floresta tropical Amazônica (Figura 10). Este vírus está entre os primeiros OPVs isolados de um roedor silvestre no Brasil (da FONSECA, *et al.*, 1999; MARQUES *et al.*, 2001; TRINDADE *et al.*, 2006).

Durante as décadas de 1960 e 1970, o governo brasileiro e o Instituto Adolfo Lutz conduziram um inquérito epidemiológico de arboviroses nas áreas florestais em torno da cidade de São Paulo, região sudeste do Brasil. Durante a investigação um poxvirus foi repetidamente isolado, no município de Cotia, de um camundongo sentinela e chamado de *Cotia virus* e posteriormente outra amostra de SPAn 232 (SAV) (da FONSECA, *et al.*, 1999). Posteriormente, foi proposto que esse vírus fosse um recombinante entre *Leporipoxvirus* e *Orthopoxvirus* (ESPOSITO, *et al.*, 1980; AFONSO, *et al.*, 2012).

Em 1998, *Belo Horizonte virus* (VBH) foi isolado de amostras congeladas que haviam sido coletadas de camundongos durante um surto no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Minas Gerais em 1993 (Figura 10) (TRINDADE *et al.*, 2004). Surtos exantemáticos afetando o gado leiteiro e seus ordenhadores foram relatados no Brasil em 1999 e dois novos VACVs, ARAV e CTGV foram isolados de vacas doentes em localização geográfica distinta na região sudeste do Brasil (Figura10) (DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2003).

Desde então, um aumento no número de surtos zoonóticos similares tem sido relatados em diferentes regiões do Brasil, principalmente nas regiões sudeste e sudoeste (Figura 10) (NAGASSE-SUGAHARA *et al.*, 2004; TRINDADE *et al.*, 2007; SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009). Em 2001, GP1 e GP2 foram isolados de vacas infectadas de fazendas vizinhas próximo a região onde CTGV foi encontrado. Apesar do local coincidente, os dois novos isolados constituíam amostras diferentes de VACV (Figura 10) (TRINDADE, *et al.*, 2006).

Após um surto em março de 2003, que emergiu na cidade de Passa-Tempo no estado de Minas Gerais acometendo o gado e os ordenhadores, Passatempo vírus (PSTV) foi isolado (Figura 10) (LEITE *et al.*, 2005). Recentemente, um surto de doença cutânea associada com infecção por *Orthopoxvirus* em cavalos foi descrito

em uma fazenda localizada na cidade de Pelotas no estado do Rio Grande do Sul (BRUM, *et al.*, 2010).

O grupo de pesquisadores do Laboratório de Vírus/ICB/UFMG tem estudado estes surtos desde meados da década de 1980, estudando OPXV isolados, inclusive aqueles identificados nas décadas de 1960 e 1970 (da FONSECA *et al.*, 1998; da FONSECA, *et al.*, 2002; TRINDADE, *et al.*, 2003; TRINDADE, *et al.*, 2004; LEITE, *et al.*, 2005; TRINDADE, *et al.*, 2006; TRINDADE *et al.*, 2007). Estes surtos afetam zonas rurais das regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste afetando, principalmente, pequenos produtores de leite, comprometendo centenas de propriedades e acarretando grande perda econômica.

1.5- Transmissão do VACV

1.5.1- Transmissão horizontal

Devido à ampla distribuição e ao crescente número de zoonoses no mundo causadas por OPV, estes têm sido detectados em várias espécies animais infectadas naturalmente. Alguns estudos descreveram a eliminação de OPV, incluindo CPXV, VARV e *Ectromelia virus*, via excretas ou secreções, tais como fezes, urina e secreções da conjuntiva (GLEDHILL, 1962; SARKAR, *et al.*, 1973; MAIBORODA, 1982) Ferreira e colaboradores em 2008 descreveram a transmissão horizontal de VACV que foi comprovada através da exposição de camundongos sentinelas a maravalha contaminadas com excretas de camundongos infectados, sugerindo que as excretas apresentam um papel relevante na disseminação e transmissão dos vírus. Estes estudos sugerem que a transmissão via excretas possa também ocorrer na natureza e contribua para a disseminação e manutenção do VACV na natureza por roedores.

A disseminação e manutenção de VACV na natureza e seu espectro de hospedeiros são importantes fatores ecológicos associados com a circulação dos vírus entre diferentes espécies animais (MAIBORODA, 1982). A resistência dos

VACV (ESSBAUER, *et al.*, 2007; ABRAHÃO, *et al.*, 2009; TRINDADE, *et al.*, 2009) associada à variedade de micro-nichos presentes nas fezes podem contribuir para a manutenção da viabilidade de vírus infecciosos por algum tempo após a excreção. Reservatórios selvagens em contato com excretas podem se tornar infectados, levando ao estabelecimento de uma infecção subclínica com baixos títulos virais sem doença aguda ou letal, como observado no estudo de transmissão horizontal com camundongos sentinelas (FERREIRA, *et al.*, 2008b). A capacidade de OPV multiplicar no intestino, como previamente observado em outros estudos (GOFF, *et al.*, 2007), pode ser um recurso permanente de contaminação fecal por VACV (MAIBORODA, 1982). Assim, infecções inaparentes poderiam contribuir para a manutenção viral em seus hospedeiros.

Uma decisão recente de iniciar a vacinação de militares contra o VARV trouxe novamente a preocupação e o interesse em se estudar a transmissão horizontal desta doença. Já foi reportado (LEDERMAN, *et al.*, 2009) um caso de *eczema vaccinatum* nos Estados Unidos relacionado com a vacinação contra varíola. Neste caso, uma criança com dermatite atópica refratária desenvolveu *eczema vaccinatum* após contato com seu pai, um membro das forças militares dos EUA que havia recentemente recebido a vacina, e que não manifestou nenhum efeito colateral. Além disso, vários casos de transmissão sexual de VACV caracterizados por lesões na vagina, frequentemente são relatados após o contato íntimo de soldados recentemente vacinados com suas esposas (EGAN, *et al.*, 2004; LORICH *et al.*, 2004; MUZNY *et al.*, 2009).

Em 2008, o CDC (Centro de Prevenção e Controle de Doenças), foi notificado de um caso suspeito de auto-inoculação acidental de um homem que trabalhava em um laboratório de uma instituição acadêmica do estado da Virginia, região sudeste dos Estados Unidos. Após a confirmação do VACV como agente etiológico os estudos indicaram que a fonte da infecção seria a exposição do paciente a uma amostra de VACV que havia contaminado o estoque semente do laboratório onde o paciente trabalhava (EGAN, *et al.*, 2004).

Um caso também envolvendo a prática da vacinação de militares contra varíola aconteceu em maio de 2003. Este destaca-se por ser o primeiro caso documentado

em que uma criança foi infectada durante a amamentação em sua mãe que por sua vez tinha tido contato com seu marido que havia recebido a vacina contra varíola. A criança desenvolveu uma papula sobre o seu lábio superior, que progrediu para vesícula, pústula até formar crosta (Figura 11). A mãe da criança havia desenvolvido lesões nas duas aureolas poucos dias antes dos sintomas da criança tornarem-se evidentes (GARDE, *et al.*, 2004).



Figura 11: Lesões causadas por infecção por VACV durante a amamentação.
Fonte: GARDE *et al.*, 2004.

Portanto, as potenciais complicações associadas à infecção por VACV tem levado o Comitê dos Estados Unidos sobre práticas de imunização a recomendar que crianças com menos de 1 ano de idade e adultos com sistema imune debilitado ou com doenças de pele como eczema ou dermatite atópica não sejam vacinados na ausência de uma clara exposição a varíola ou monkeypox.

Atualmente, sabe-se que para a maioria dos vírus que infectam humanos a transmissão através do leite é rara (Tabela 3). Entretanto, a transmissão através da amamentação é bem documentada para *Human herpesvirus 5*, *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1) e *Human T lymphotropic virus 1 e 2* (HTLV-1 e 2) (LAWRENCE & LAWRENCE, 2004). Outros relatos de vírus transmitido através do leite de mãe para filho incluem *Papillomavirus*, *Simian immunodeficiency virus* e o *Mouse mammary tumor virus* (MMTV), sendo este último, o vírus transmitido pelo leite mais bem estudado. O MMTV causa câncer de mama em camundongos a infecção *in vivo* ocorre primeiro nas células dendríticas do intestino, as quais

transferem o vírus para os linfócitos. O tráfego de linfócitos infectados para a glândula mamária resulta na infecção das células epiteliais mamárias durante a puberdade e gravidez. Os camundongos lactantes eliminam altos níveis de partículas virais no leite, que então adquirido pela prole na primeira semana de vida (OKEOMA, *et al.*, 2010).

Tabela 3: Transmissão viral durante a amamentação.
Fonte: LAWRENCE & LAWRENCE, 2004 – modificado.

Vírus	Modo predominante de transmissão	Período usual de infecção	Evidências de transmissão pelo leite
<i>Human herpes virus 5</i>	Contato - fluidos do corpo	Congenita, perinatal e posnatal	Cultura e detecção do DNA viral por PCR
<i>Enterovirus</i>	Contato - oral/fecal	Perinatal e pos-natal	Nenhuma
<i>Picornaviridae</i> <i>Hepatitis A virus</i>	Comida; água, contato-fluidos corporais	Pos-natal	Um caso relatado
<i>Hepadnaviridae</i> <i>Hepatitis B virus</i>	Sangue; fluidos corporais ; sexual	Pos-natal	Antígeno de superfície Hepatite B
<i>Flaviviridae</i> <i>Hepatitis C virus</i>	Sangue; fluidos corporais	Pre-natal, perinatal	? possível RNA HCV
<i>Human herpes virus 1 e 2</i> <i>HSV1 e HSV2</i>	Contato	Perinatal (congenital posnatal)	Transferência apenas com lesões no seio
<i>Human immunodeficiency virus1</i> <i>HIV-1</i>	Sangue; fluidos corporais;sexual	Perinatal, pré-natal e pos-natal	Detecção do RNA viral por PCR cultura
<i>Human immunodeficiency virus2</i> <i>HIV-2</i>	Sangue; fluidos corporais;sexual	Perinatal, pré-natal	Informação limitada
<i>Human T lymphotropic virus 1</i> <i>HTLV-1</i>	Sangue; fluidos corporais	Perinatal, pré-natal e pos-natal	Detecção do RNA viral por PCR
<i>Parvovirus</i>	Contato-fluidos corporais	Pre-natal	Desconhecido
<i>Human respiratory syncytial virus</i> <i>HRSV</i>	Contato	Pos-natal	Nenhuma
<i>Human herpes virus 3</i>	Contato	Pos-natal	Apenas com lesões no seio; VZV-DNA

Apesar do risco de infecção por VACV através do consumo de leite produzido em áreas afetadas por VB ser desconhecido, um caso associado com BPXV na Índia acometendo um humano que manifestou lesões exantemáticas na boca após o consumo de leite supostamente infectado, já foi relatado (BERKELMAN, 2003; ABRAHÃO *et al.*, 2009c).

ABRAHÃO e colaboradores em 2009 descreveram a detecção de DNA de VACV e partículas infecciosas em amostras de leite coletadas do gado leiteiro infectado durante surtos de VB no período de 2005 à 2008 nas cidades de Bambuí, Paraguaçu e Mariana (Figura 12). Embora não tenha sido possível confirmar a fonte nas partículas virais no leite, duas hipóteses foram levantadas. A primeira sugere que a manipulação das lesões exantemáticas nas tetas durante a ordenha manual, pode ter levado à fragmentação da crosta e conseqüentemente a contaminação do leite, ou a detecção de VACV nas amostras de leite foram o resultado de uma infecção sistêmica e conseqüente dispersão para as glândulas mamárias (ABRAHÃO, *et al.*, 2009c).

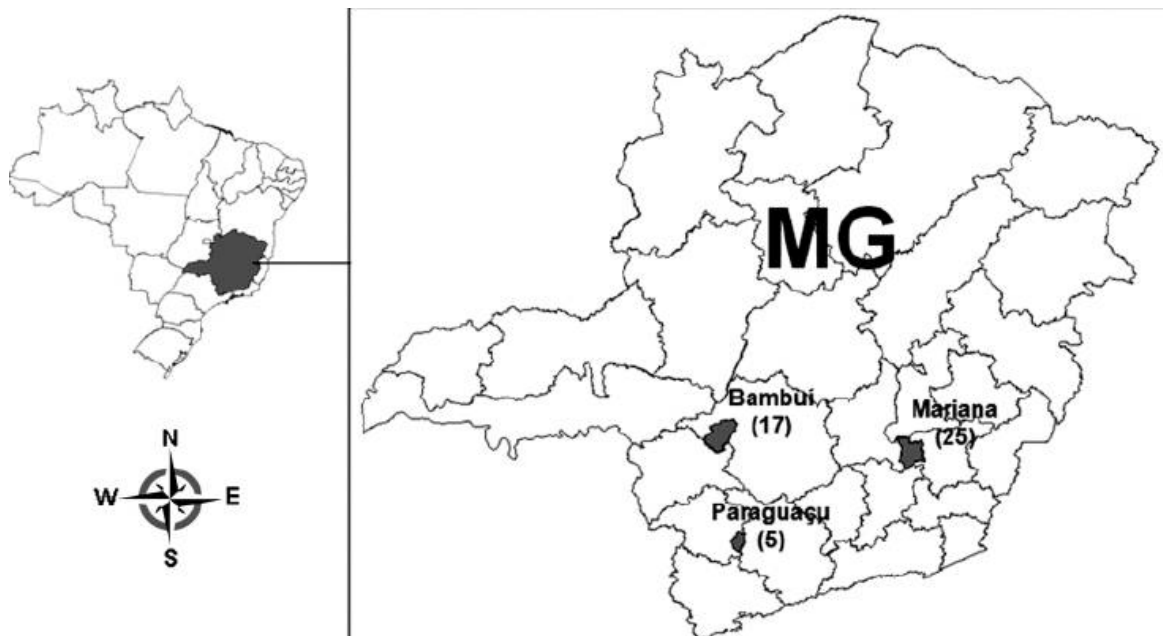


Figura 12: Mapa do estado de Minas Gerais demonstrando o número de amostras de leite coletadas em cada cidade.
Número de amostras coletada por município: Bambuí (17), Mariana (25), Paraguaçu (6). **Fonte: ABRAHÃO *et al.*, 2009.**

De fato, estudos recentes da patogênese do VACV, utilizando a via intranasal de infecção em modelo murino demonstraram que os VACV brasileiros podem dispersar do local da infecção primária no caso deste modelo as vias aéreas superiores, para diferentes órgãos incluindo o fígado, rim, linfonodos, cérebro e intestinos, caracterizando uma infecção sistêmica (FERREIRA, *et al.*, 2008a). Assim, esses dados podem sustentar a segunda hipótese, apesar da diferença dos locais de infecção entre os dois estudos. Além disso, como descrito acima, a liberação de VACV em excretas e secreções de camundongos já foram descritas (FERREIRA, *et al.*, 2008b), e DNA viral tem sido detectado em amostras de sangue bovino e humano (SILVA-FERNANDES, *et al.*, 2009). Sendo assim, ambas as hipóteses permanecem sob investigação.

Além disso, estudos recentes realizados para testar a viabilidade do VACV no leite após o tratamento térmico e produção de queijo, utilizando leite contaminado experimentalmente demonstraram que as partículas virais permanecem viáveis no leite após o armazenamento por 48 horas tanto em câmara fria quanto em freezer e também após o tratamento térmico à 65°C por 30 minutos, indicando um potencial risco para a saúde pública (LUDOULFO *et al.*, 2010).

1.5.2- Transmissão vertical

Assim como preconizado para crianças e indivíduos imunodebilitados, o Comitê dos Estados Unidos sobre práticas de imunização não tem recomendado a vacinação a mulheres grávidas ou mulheres que estão tentando engravidar devido ao potencial de transmissão vertical de VACV da mãe para o feto. Existem na literatura médica menos que 50 casos documentados de transmissão vertical de VACV durante a gravidez, a maioria resultando na morte do feto acometido, entretanto não se sabe se o vírus infecta o feto através do sangue ou pelo contato direto com o líquido amniótico infectado (CONO, *et al.*, 2003).

Em humanos a maioria das infecções virais em recém-nascidos e crianças ocorre através da transmissão intraparto ou transplacentaria (LAWRENCE & LAWRENCE, 2004). Dentre os vírus relevantes clinicamente que são transmitidos

para o feto subsequente à infecção materna destacam-se HIV, *Hepatitis B virus*, *Hepatitis C virus*, *Human herpesvirus 3*, *Rubella virus*, *Human parvovirus B19* e *Human herpesvirus 5* (KOY, *et al.*, 2001).

Assim, vários vírus podem ultrapassar a barreira fetal-materna e causar doenças para o feto ou para o recém nascido. Recentemente, entretanto, se tornou óbvio que os vírus podem invadir órgãos e células fetais através de diferentes rotas sem conseqüências agudas. Espermatozoides, líquido seminal e linfócitos no esperma podem transferir vírus para o zigoto humano. Os vírus já se mostraram integrados nos cromossomos humanos e dessa forma serem transferidos para os tecidos fetais. O transporte fetal-materno regular de células maternas também foi descoberto, este transporte implica que vírus linfotrópicos podem ser liberados dentro dos tecidos fetais e posterior invasão celular. Tem sido mostrado que muitos vírus podem se replicar em células do trofoblasto e sinciciotrofoblasto humano ultrapassando dessa forma a barreira fetal-materna (YOUNES *et al.*, 2009).

Com o objetivo de determinar a via que o VACV utiliza para cruzar a placenta e o alvo de multiplicação viral dentro do tecido reprodutivo materno e no feto, Benning e Hassett em 2004 examinaram a capacidade de uma amostra laboratorial comum de VACV infectar com sucesso a placenta murina e dispersar verticalmente para o feto antes do nascimento. Os experimentos demonstraram que tanto a inoculação intraperitoneal como a intravenosa WRV (Western Reserve Virus), podem levar primeiro a infecção da placenta e posteriormente a infecção do feto em modelo murino. Sendo assim, o conhecimento das conseqüências patológicas e imunológicas das infecções causadas por amostras de VACV são limitadas, e é importante a utilização de amostras de VACV que apresentam perfis de virulência diferentes em um modelo murino que mimetize a infecção natural para estudar a transmissão vertical destas amostras

1.6- Patogênese

As infecções por OPV podem ser classificadas como sistêmicas ou localizadas, sendo que o tipo de infecção vai depender da espécie de OPV envolvida, da rota de entrada, da susceptibilidade do hospedeiro e do seu estado imunológico. Entretanto, em alguns casos como o VACV, o entendimento da patogênese é limitado devida a falta de dados sobre a patogênese da doença em seu hospedeiro natural (DAMON, et al., 2007). O trato respiratório é a via de transmissão que ocorre com mais frequência entre os OPV, e provavelmente a principal rota de entrada *Camelpox virus*, VARV e MPXV, sendo que para muitas espécies a infecção pode ocorrer através de microabrasões na pele, como descrito para VACV, CPXV e *Ectromelia virus* (ECMV) (revisado por FENNER, 1989).

O ECMV tem sido utilizado em estudos que ajudaram a elucidar mecanismos de defesa do hospedeiro e patogênese viral. A infecção experimental mimetizando a rota natural de infecção por abrasões na pele utilizando ECMV em camundongos, demonstrou que a multiplicação na epiderme e liberação da progênie viral do local inicial da infecção, resulta na dispersão viral para linfonodos, corrente sanguínea e outros órgãos (revisado por ESTEBAN & BULLER, 2005).

Os sintomas clínicos destas infecções em humanos incluem o surgimento de áreas focais avermelhadas que coincidem com aparecimento de febre e sintomas gerais semelhantes a um quadro gripal, incluindo-se dores de cabeça, dores musculares e náusea. A próxima fase é marcada pelo surgimento de pústulas e lesões ulcerativas margeadas por edema e eritema, principalmente nas mãos e antebraços. Frequentemente, desenvolve-se uma linfadenopatia local que pode persistir por várias semanas. A cura e cicatrização das lesões ocorrem ao longo de várias semanas e deixam uma cicatriz típica na pele das pessoas e animais acometidos (Figura 13) (TRINDADE, et al., 2003; LEWIS-JONES, 2004; KROON, et al., 2011).

Embora as lesões sejam normalmente observadas nos dedos e braços de ordenhadores afetados, a dispersão das pústulas para outras partes do corpo como face, olhos, mucosa, tórax e genitálias também tem sido relatadas, possivelmente

como resultado de auto-inoculação (da FONSECA, *et al.*, 2011). Além disso, infecções bacterianas secundárias ou outras infecções virais ulcerativas podem também ocorrer (LEITE, *et al.*, 2005; LOBATO, *et al.*, 2005; revisado por da FONSECA, *et al.*, 2011).

O processo todo, desde o aparecimento dos sinais clínicos iniciais até a cicatrização total leva aproximadamente vinte e um dias, embora o período de incubação inicial seja difícil de determinar devido ao contato contínuo entre indivíduos doentes e vacas infectadas durante um surto em andamento. Complicações da doença são extremamente raras, e embora descrições não oficiais relatando ulcerações generalizadas já foram feitas em regiões de surtos, nenhuma confirmação independente foi obtida. Além disso, quando comparados indivíduos doentes e indivíduos que foram possivelmente expostos, mas não desenvolveram a doença em reação ao seu “status” vacinal, as pessoas que foram vacinadas, possivelmente vacinadas ou que apresentam a cicatriz típica da vacina, demonstram uma redução significativa na propensão de desenvolverem a doença. Esses resultados indicam claramente que o número de pessoas não vacinadas contra varíola é um fator importante na explicação do número de indivíduos infectados com VACV durante os surtos de VB (da FONSECA, *et al.*, 2011).

No caso dos animais as vesículas ocorrem no úbere, principalmente na parte dos tetos com uma confluência de vesículas que resultam em grandes lesões cobertas por crostas. Lesões orais, no focinho e na língua de bezerros também são observadas. A contaminação bacteriana nas vesículas já foi demonstrada, e em alguns casos o úbere pode apresentar lesões permanentes. Estas condições estão associadas á grande impacto econômico (SCHATZMAYR *et al.*, 2011).

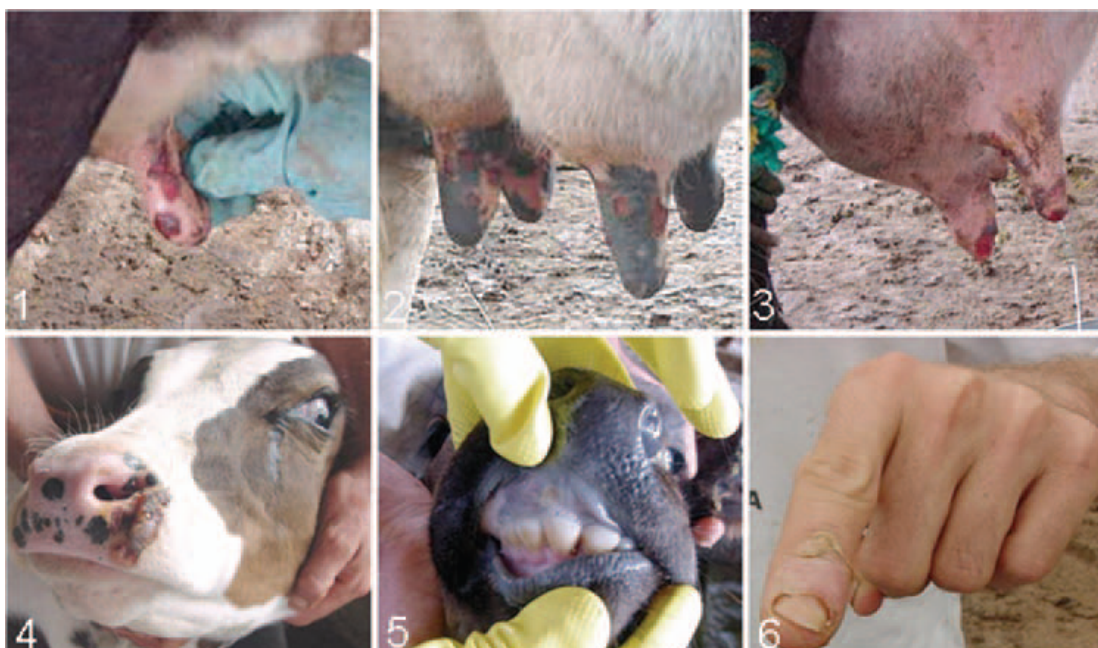


Figura 13: Lesões causadas por infecção pelo Passatempo virus.

(1) e (2) Lesões ulcerativas em tetas de vacas, (3) mastite causada por infecção bacteriana secundária, (4) e (5) lesões no focinho e mucosa oral de bezerros, (6) lesão na mão de um ordenhador. **Fonte: LEITE et al., 2005. Modificado - Por FERNANDES-TAVARES.**

Como referido acima, Ferreira e colaboradores em 2008, demonstraram que algumas amostras de Br-VACV podem causar grave morbidade em camundongos Balb/c, apresentando sinais clínicos como arqueamento de dorso, pilo-ereção, alopecia periocular, balanopostite e perda de peso (Figura 14). Além disso, o estudo demonstra a presença de vírus em diferentes órgãos dando suporte à idéia de que essas amostras sejam capazes de causar doença sistêmica após a infecção intranasal (FERREIRA, et al., 2008a).



Figura 14: Sinais clínicos em camundongos Balb/c infectados com br-VACV.

VBH: amostra *Belo Horizonte virus* causando arqueamento de dorso. **BAV:** amostra BeAn58058 causando alopecia periocular. **GP1V:** amostra *Guarani Propriedade 1 virus* causando. **Fonte: FERREIRA et al., 2008a – modificado.**

2- Justificativa e Relevância

VACV, membro protótipo dos OPV e intimamente relacionado ao VARV, foi utilizado como vacina atenuada na campanha global de erradicação contra a varíola vírus ocorrida no final da década de 1970. A recente decisão de iniciar uma vacinação contra a varíola nos militares, e a possibilidade da re-emergência de poxvírus zoonóticos em diferentes partes do mundo, causada pela adaptação de OPV como MPXV, CPXV e VACV ao hospedeiro humano, têm atraído o interesse de pesquisadores e dos órgãos de saúde em estudar a patogênese das infecções agudas e crônicas causadas por poxvírus. Além disso, a imunidade adquirida pela vacinação à população mundial há 30 anos está diminuindo devido à descontinuidade da vacinação.

A vaccínia fetal, que é a transferência de VACV da mãe para o feto, pode se tornar uma complicação fatal através da vacinação primária durante a gravidez, em crianças muito jovens e em indivíduos imunocomprometidos. Um número estimado de 15 a 50 pessoas a cada 1 milhão que recebem vacinações primárias de VACV irão desenvolver efeitos colaterais incluindo reações alérgicas nos locais de vacinação, disseminação do vírus para outras partes do corpo e infecção do sistema nervoso central.

Desde 1999, as notificações de surtos de VB com infecções zoonóticas causadas pelo VACV têm crescido no Brasil. Os ordenhadores são o principal grupo de risco uma vez que eles estabelecem o contato direto com o gado. Esta zoonose compromete centenas de propriedades e acarreta grande perda econômica devido a vários fatores, como a diminuição da produção de leite que varia de 40 a 60%; a ocorrência de mamite e outras infecções secundárias e o afastamento do ordenhador do trabalho. Estas infecções são causadas por vírus que apresentam diversidade genética e também diferenças na patogenicidade, como por exemplo, as amostras GP1V e GP2V, tornando-se uma oportunidade para a compreensão dos mecanismos de patogênese e imunológicos associados às infecções por OPV.

Já foi demonstrado que vacas e camundongos infectados por br-VACV apresentam infecção persistente por até 30 dias. Além disso, estudos recentes têm mostrado a presença de br-VACV no leite coletado de vacas que apresentam a VB. Como a doença é típica de vacas em lactação e estas precisam ser ordenhadas devido ao aparecimento de mamite, o leite produzido por estas vacas infectadas é consumido pela população. Além disso, em várias propriedades rurais, muitos consomem o leite sem o devido tratamento prévio. Apesar de a vaccínia fetal ser uma complicação relativamente rara ela é frequentemente fatal.

Há poucos relatos na literatura sobre a transmissão vertical de amostras de VACV e sobre as conseqüências patológicas e imunológicas de infecções por VACV durante a gravidez e não se sabe sobre o potencial de transmissão viral através do consumo de leite contaminado. Assim, este trabalho pretende utilizar um modelo murino para compreender se GP2V é capaz de atravessar a barreira placentária e serem transmitidos ao feto após o nascimento bem como se o vírus pode ser eliminado e transmitido pelo leite. A partir dos experimentos que estão sendo propostos, poderemos avançar no conhecimento deste vírus para melhorar ações preventivas ou de tratamento, visando proteção à saúde humana e diminuição de impactos econômicos causados por surtos de VB no Brasil.

3- Objetivos

3.1- Objetivo geral:

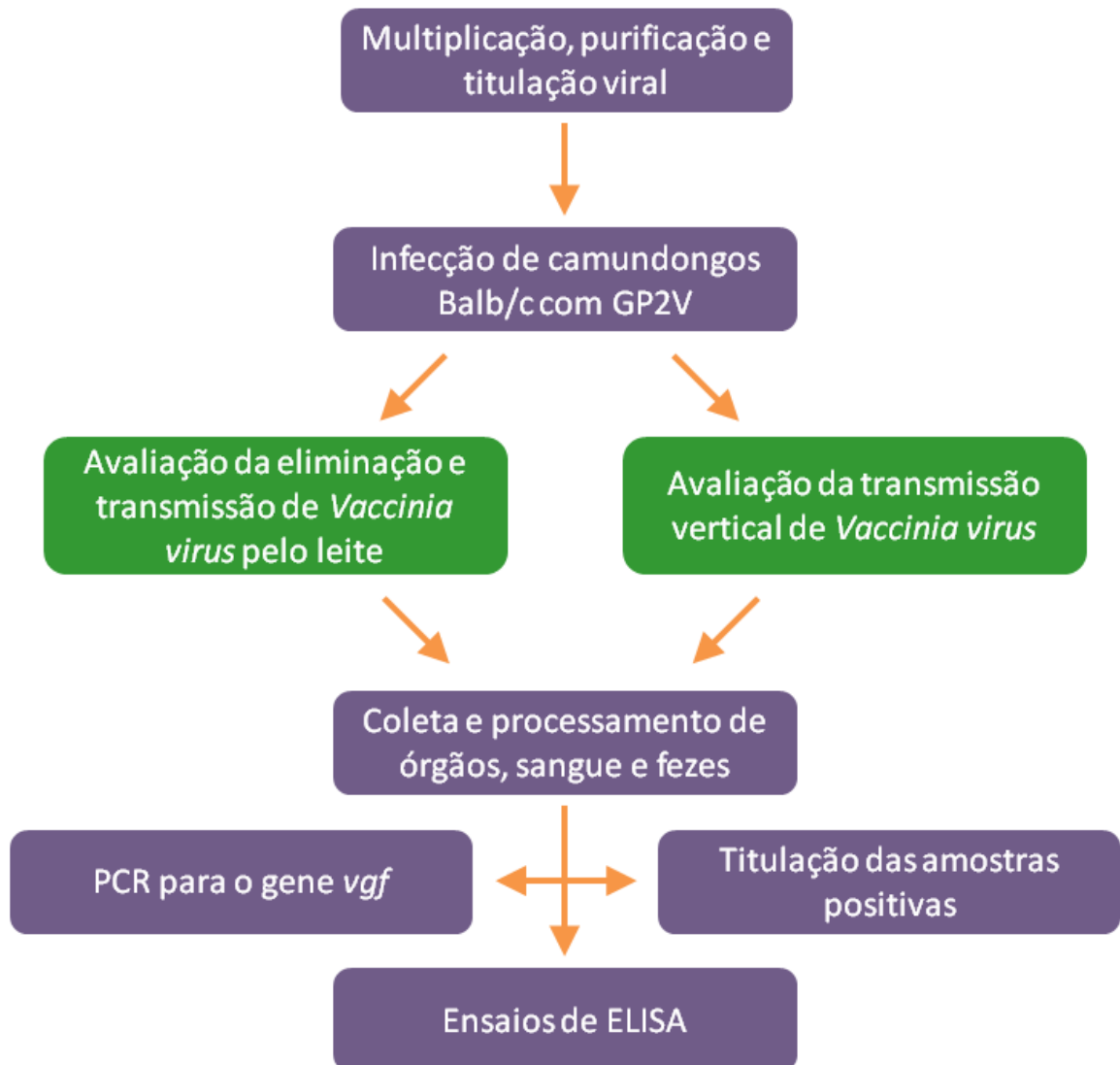
Avaliar a transmissão vertical e pelo leite GP2V, em modelo murino.

3.2- Objetivos específicos

- Analisar os sinais clínicos de camundongos Balb/c fêmeas grávidas, não grávidas ou lactantes infectadas com GP2V;
- Analisar por titulação viral, a presença de GP2V no útero, ovários, pulmões, baço, cérebro, coração, fígado e linfonodos das camundongas mães infectadas por via intranasal e dos seus filhotes;
- Avaliar a presença de GP2V na placenta após cesária de camundongos fêmeas Balb/c infectados por via intranasal;
- Avaliar a soroconversão dos camundongos por ELISA;
- Verificar a eliminação e transmissão de GP2V no leite de camundongos fêmeas infectadas pela via intranasal empregando reação em cadeia da polimerase (PCR);
- Demonstrar a ocorrência da infecção viral nas fêmeas infectadas por via intranasal pela detecção de DNA viral no sangue e fezes e nos fetos/filhotes por PCR;

4- Estratégia de trabalho

4.1- Fluxograma:



5- Materiais e métodos

5.1- Célula

As células BSC-40, linhagens contínuas derivadas de células epiteliais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) foram obtidas da “American Type Culture Collection” (ATCC), (Maryland, E.U.A.). O cultivo celular foi feito em garrafas de 162 cm² contendo 25 mL de meio mínimo essencial de Eagle (MEM) (Gibco™, USA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil), glutamina, gentamicina (50 µg/mL), penicilina potássica (200 U/mL) e anfotericina B (2,5 µg/mL), sob incubação à 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂. Os subcultivos foram feitos três vezes por semana sendo a monocamada celular lavada com solução tampão fosfato salina (PBS) (NaCl 137mM; KCl₂ 7mM; Na₂HPO₄ 1,4mM; pH 7,2) e tratada com solução de tripsina contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (NaCl 136mM; KCl 5mM; glicose 55mM; NaHCO₃ 69mM; 0,5g p/v tripsina 1:250 [Difco]; EDTA 0,5mM; 1% vermelho de fenol). Estas células foram utilizadas para multiplicação, titulação, isolamento viral e ensaios de soroneutralização, quando apresentaram 85-100% de confluência da monocamada.

5.2– Membrana corioalantóide de ovos embrionados (MCA)

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

5.3– Vírus

As amostras virais GP1V e GP2V foram isoladas no Laboratório de Vírus/UFMG, a partir de amostras de lesões coletadas de bovinos de duas propriedades vizinhas, propriedade 1 (P1) e propriedade 2 (P2), durante um surto de VB ocorrido em Guarani – MG em 2001 (TRINDADE, G. S. *et al.* 2006). O VACV amostra Western Reserve (VACVWR) foi gentilmente cedido pelo Dr. C. Jungwirth (Universität Würzburg, Alemanha) e foi utilizado como amostra padrão.

5.3.1– Multiplicação viral em cultivo celular

Os estoques de vírus foram obtidos por multiplicação em células BSC-40 em meio mínimo essencial de Eagle (MEM) (Gibco™) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), glutamina e antibióticos, cultivadas em garrafas quadradas de 162 cm², a 37°C. A monocamada contendo cerca de 20 milhões de células BSC-40 foi lavada duas vezes com PBS e infectadas com multiplicidade de infecção (moi) de 0,01, em 2 mL de MEM 1% de SFB, acrescido de antibióticos. Após 1 hora de adsorção, a 37°C, foram acrescentados 25 mL de MEM suplementado com 1% SFB. Novamente, as células foram incubadas a 37°C e monitoradas diariamente, ao microscópio óptico até a detecção de 90% de efeito citopático (ECP). Em seguida, o meio de cultivo foi desprezado, as células foram lavadas com PBS e desprendidas das garrafas com auxílio de um raspador e utilizando Tris-HCl 10mM, pH 8,0. A suspensão obtida foi centrifugada durante 10 minutos a 1500 rotações por minuto (rpm) (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B), a 4°C e o sedimento resultante da centrifugação foi mantido a – 70°C para posterior purificação das partículas virais.

5.3.2– Purificação viral

Após a multiplicação em células BSC-40, a purificação viral foi realizada segundo metodologia descrita por JOKLIK, 1962 modificado. O sedimento obtido no item anterior foi homogeneizado em 8 mL de Tris-HCl 10mM, pH 8,0 e centrifugado a 2.500 rpm (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B) durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi mantido em banho de gelo e em seguida, o sedimento celular foi lisado duas vezes em 10 mL de solução de lise (MgCl₂ 1mM; Tris10mM, pH 7,0; KCl 10mM). Após a adição desta solução, a suspensão foi incubada em banho de gelo, durante 10 minutos e as células lisadas mecanicamente em homogeneizador do tipo “Douncer” (Wheaton, USA) por 80 vezes. A suspensão viral resultante foi centrifugada a 14.000 rpm (rotor AH 629 Sorvall), 4°C, por 2 horas sobre um colchão de sacarose a 36% em Tris-HCl 10mM, pH 8,0 para separação dos restos celulares. Utilizando-se uma pipeta Pasteur, o sobrenadante e a interface foram coletados e desprezados e o restante foi descartado por inversão do tubo. Os sedimentos obtidos foram homogeneizados em 1mL de Tris 10mM, pH 8,0 e submetidos a 2 ciclos de sonicação por 30 segundos, com 40% de potência de saída (Sonic Desmembrator-50, Fisher Scientific – USA) e distribuídos em alíquotas de 2 µL em microtubos e estocados a – 70°C.

5.3.3- Titulação viral (CAMPOS e KROON, 1993)

A titulação viral foi feita em placas de 6 câmaras, contendo aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células BSC-40/ câmara cultivadas por 16 a 24 horas, a 37°C em MEM, contendo 5% SFB (Cultilab, Brasil). Em cinco câmaras da placa, o meio foi desprezado e 200 µL de uma série de diferentes diluições dos vírus, na razão de 10, em meio MEM, foram adicionados às células. Uma câmara não foi infectada, ficando reservada para o controle da viabilidade celular. Após 1 hora de adsorção a 37°C, 2 mL de MEM contendo 1% de SFB foram adicionados e as placas foram novamente incubadas a 37°C e monitoradas por 48 horas. Em seguida, as células foram fixadas

com solução 10% de formol por 30 minutos, lavadas com água e, posteriormente, coradas com solução 1% (p/v) de cristal violeta por 15 minutos. O título viral foi calculado pelo número de placas obtidas na câmara da diluição que apresentou entre 30 a 300 placas de lise, multiplicado pelo inverso da diluição, em 200 µL, sendo posteriormente convertido para o volume final de 1 mL.

5.3.4-Ensaio de soroneutralização

Amostras de soro foram aquecidas a 56°C por 30 minutos para a inativação do complemento e testadas pelo teste de soroneutralização para detecção da presença de anticorpos contra OPV. Os ensaios foram feitos utilizando a amostra VACV-WR. Para cada soro foram utilizadas placas de seis câmaras, nas quais foram implantadas 10^6 células Vero por câmara. Os vírus, diluídos seriadamente em PBS. Os soros foram diluídos seriadamente, nas diluições de 1:20, 1:40, 1:80 e 1:160. Para cada diluição de soro, foi preparada uma mistura que consistiu de 200µL de diluição de soro mais 200 µL de suspensão viral contendo $1,5 \times 10^2$ UFP, que foram mantidas sob agitação a 37°C, por 1 hora e, em seguida, inoculadas nas células. As placas foram incubadas a 37°C e após 1 hora de adsorção das partículas virais, foi acrescentado meio MEM suplementado com 1% SFB. Novamente, as placas foram incubadas a 37°C no período de 48 a 72 horas até o aparecimento do efeito citopático. Após esta incubação, as células foram fixadas por 15 minutos em solução 10% de formaldeído e em seguida, a monocamada de células foi corada com solução de cristal violeta durante 15 minutos. Foram feitos controles com amostras de soro sabidamente positivas para OPV. A atividade neutralizante contra as partículas virais foi determinada e expressa como a diluição de soro requerida para atingir 50% de redução de unidades formadoras de placa (ufp) por mililitro.

5.4- Animais

Camundongos fêmeas Balb/c grávidas, não grávidas e lactantes foram utilizados como modelo animal, sendo cedidas pelo Centro de Bioterismo da UFMG (CEBIO/UFMG). Os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética (CETEA) da UFMG- Protocolo de aprovação N° **014/09**. Estes animais foram mantidos em microisoladores sob maravalha autoclavada no biotério de experimentação animal da Microbiologia e Bioquímica ICB/UFMG. A alimentação foi feita *ad libitum* com água filtrada e ração comercial.

5.4.1– Infecção de camundongos Balb/c por via intranasal

Camundongos fêmeas Balb/c grávidas, não grávidas e lactantes foram utilizados para infecção experimental com o vírus GP2. Os camundongos foram inoculados com uma concentração de 10^6 pfu/10 μ L pela via intranasal utilizando-se uma placa de superfície plana de 35 mm, sendo a gota inspirada pelos camundongos. Os camundongos pertencentes ao grupo controle negativo foram inoculados com 10 μ L de PBS. Previamente às infecções, os camundongos foram anestesiados com injeção intraperitoneal. As anestésias foram feitas por 50 a 100 μ L de uma solução contendo 1.300 μ L de Ketamina (DopalenÒ, Brasil) a 50 miligramas por mililitros (mg/mL), 200 μ L de Cloridrato de Xilazina (KensolÒ, Brasil) a 20mg/mL e 1.500 μ L de PBS (FERRIER-REMBERT, A. et al. 2007; QUENELLE, D. C. et al. 2004).

5.4.2– Acasalamento

Para o acasalamento, os animais foram solicitados no Centro de Bioterismo da UFMG (CEBIO/UFMG) com quatro semanas de idade e alojados no Biotério de experimentação animal da Microbiologia e Bioquímica ICB/UFMG até alcançarem a idade adulta para o acasalamento, entre seis a oito semanas. Machos e fêmeas foram mantidos em gaiolas diferentes e conforme a maturidade sexual era atingida a

maravilha suja dos machos era distribuída nas gaiolas das fêmeas, para induzir o cio através dos ferormônios. Após três dias os machos eram colocados juntos com as fêmeas na proporção um macho para cada três ou duas fêmeas. O harém era mantido por aproximadamente 24 horas e então os machos eram retirados da gaiola. Três parâmetros foram utilizados a partir daí, para determinação do estado de gravidez das fêmeas. O “plug” vaginal na manhã do dia seguinte ao cruzamento, o aumento gradual do peso e a observação do crescimento da barriga. Todas as inoculações foram realizadas no 14^o dia de gravidez, pois nesse estágio era claro o estado de gravidez. A cesariana foi realizada no 19^o dia de gravidez.

5.4.3- Cesariana *post-mortem*

A cirurgia cesariana *post-mortem* foi realizada com auxílio de um profissional treinado. Em capela de fluxo laminar, após aberto o peritônio, o útero foi amarrado nas duas extremidades próximas aos ovários e na região da vagina com linha 200 jds - Urso extra vero forte J & COATS. O útero então foi cortado na região posterior aos nós e retirado da cavidade abdominal. Uma incisão no útero com o auxílio de tesoura cirúrgica foi realizada e os fetos e suas respectivas placentas retirados e estocados em freezer -20^oc ou fixados em formol tamponado 10% para análises histológicas.

5.5 - Avaliação da transmissão vertical

Para avaliação da transmissão vertical as infecções foram feitas em quatro grupos de fêmeas Balb/c conforme descrito na tabela 4. As infecções de Balb/c grávidas foram feitas em dois grupos. Devido à gravidez de camundongos durar em torno de 21 dias, ambos foram infectados aproximadamente no 14^o dia de gravidez. Sendo um grupo acompanhado até o nascimento dos filhotes que aconteceu no 21^o e outro acompanhado até o 19^o dia de gravidez sendo que neste dia foi realizada uma cirurgia cesariana *post-mortem* com o objetivo de impedir que os fetos entrassem em contato com as excretas e outras possíveis secreções advindas da mãe potencialmente infecciosas.

As infecções de Balb/c lactantes foram realizadas em animais com prole de idade entre dois a cinco dias de nascidos. Tanto as mães quanto a prole foram eutanasiados nos dias 8, 11 e 15 pós-infecção (dpi). As infecções de Balb/c fêmeas (não grávidas e não lactantes) foram realizadas em animais de aproximadamente oito semanas e acompanhados até o 5^o dpi.

Durante o período de experimentação todos os animais foram pesados diariamente e acompanhados quanto a possíveis sinais clínicos. Após a eutanásia foram coletados placentas, tecidos mamários e órgãos (útero, ovários, pulmões, baço, cérebro, coração, fígado, rim, intestino e linfonodos) das fêmeas, e os fetos para reações de PCR para o gene *vgf* e ensaios de titulação. O sangue e fezes dos camundongos também foram coletados diariamente para a PCR para o gene *vgf* e testes de ELISA. Para todos os grupos de animais propostos um grupo para o controle negativo foi submetido aos mesmos procedimentos experimentais (tabela 4).

Tabela 4: Grupos de animais propostos para avaliação da transmissão vertical de GP2V.

Grupos	Vírus	Status do animal	Dias de infecção	Acompanhamento
Grupo A	GP2V	Grávidas	~14 ^o de gravidez	Até 5 ^o dpi- parto normal
	PBS	Grávidas	~14 ^o de gravidez	Até 5 ^o dpi- parto normal
Grupo B	GP2V	Grávidas	~14 ^o de gravidez	Até 5 ^o dpi -cesariana
	PBS	Grávidas	~14 ^o de gravidez	Até 5 ^o dpi –cesariana
Grupo C	GP2V	Lactantes	Prole entre 2-5 dias	Até 8 ^o , 11 ^o , 15 ^o dpi
	PBS	Lactantes	Prole entre 2-5 dias	Até 8 ^o , 11 ^o , 15 ^o dpi
Grupo D	GP2V	Fêmeas	Adultas ~8 semanas	Até 5 ^o dpi
	PBS	Fêmeas	Adultas ~8 semanas	Até 5 ^o dpi

(~) Aproximadamente; (dpi) Dias pós infecção; (GP2V) Guarani virus P2.; (PBS)

5.6 - Avaliação da eliminação de VACV no leite

A avaliação da presença de vírus no leite foi feita em camundongos fêmeas infectadas pela via intranasal com prole entre 2-5 dias de nascidos. O leite foi coletado durante todo o período de experimentação, ou seja, até o 5^o dpi com o auxílio de uma ordenhadora de camundongos acoplada à uma bomba de vácuo, como adaptado de Oskarsson and Möller, 2004 (Figura 15). O leite retido na

mangueira do aparato foi lavado com aproximadamente 300µL de PBS e estocado em um microtubo. Esse volume foi utilizado para lavar a mangueira utilizada para a ordenha de todos os animais do mesmo grupo e esse pool foi estocado em freezer - 20°C. Os animais foram inoculados diariamente antes da ordenha, com oxitocina sintética 10UI (Tortuga Companhia Zootécnica Agrária), licenciado no Ministério da Agricultura: 3.527/90 para auxiliar na eliminação do leite, e a lactação foi induzida com 0,2 a 1mg por quilograma por via subcutânea de plasil (metoclopramida).

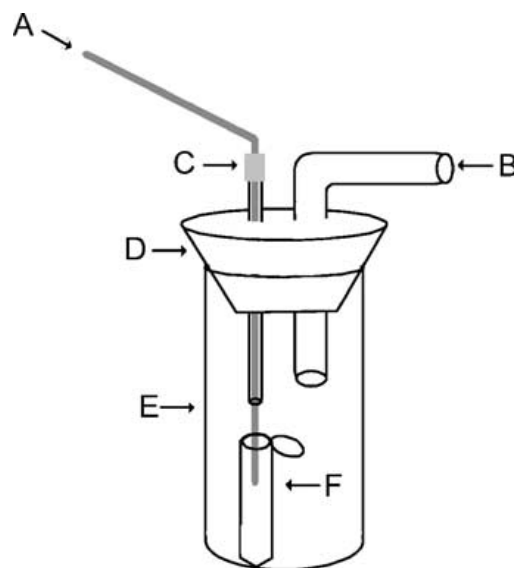


Figura 15: Dispositivo de ordenha para coleta de leite em camundongo.

A: Tubulação de borracha com diâmetro interno de ~1mm que foi utilizado para sugar o mamilo. B: é conectado á uma bomba de vácuo, criando vácuo no recipiente. C: É um parafilm usado para apertar o espaço entre o tubo de teflon e o tubo de vidro com diâmetro interno de 2mm. D: é uma rolha de borracha. E: é um frasco de vidro de 100ml. F: è um microtubo no qual o leite será coletado. **Fonte: Oskarsson & Möller, 2004.**

As amostras de leite coletadas foram submetidas a ensaios de titulação, e PCR para a avaliação de partículas virais viáveis e DNA viral respectivamente. As amostras de sangue e fezes coletadas diariamente foram submetidas à reação de Nested- PCR para o gene *vgf*. Após a eutanásia os tecidos mamários das mães foram coletados para análises histológicas.

5.7- Transmissão de VACV pelo leite

5.7.1- Infecções de camundongos Balb/c por via oral

Para avaliação da transmissão pelo leite camundongos Balb/c neonatos com idade entre 2-5 dias foram utilizados para infecção experimental com $2,6 \times 10^4$ PFU de GP2V em 10 μ L de PBS por via oral utilizando-se uma pipeta de 10 μ L. Os neonatos pertencentes ao grupo controle negativo foram inoculados com 10 μ L de PBS. Amostras de sangue e fezes das mães foram coletadas durante todo o experimento e após a eutanásia amostras de sangue dos filhotes foram coletadas. Todas as amostras foram submetidas a PCR Nested para o gene *vgf*.

5.8- Coleta e processamento de espécimes clínicos

Os órgãos útero, ovários, pulmões, baço, cérebro, coração, fígado, rim, intestino e linfonodos foram coletados dos camundongos fêmeas mães, e as carcaças dos filhotes para ensaios de titulação viral. O processamento dos órgãos foi feito segundo metodologia descrita por SMEE e colaboradores, 2002. Os órgãos foram pesados e uma diluição 1:10 (peso/volume) foi calculada para posteriormente serem triturados em PBS com o auxílio de um pistilo e/ou nitrogênio líquido em gral de porcelana. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 8.000 rpm por 5 minutos, à 4°C em microcentrífuga (Eppendorf, 5415C, Europa). O sobrenadante foi coletado e estocado em freezer -20°C para posteriores ensaios biológicos e moleculares. O sangue foi coletado através de um pequeno corte na ponta da cauda dos camundongos, com o auxílio de uma tesoura cirúrgica. Após este procedimento, a cauda foi massageada para favorecer o fluxo de sangue no local da excisão. A gota de sangue foi acrescida de 20 μ L de ácido etileno tetracético (EDTA) 0,5 mM, para evitar a coagulação. Após congelar e descongelar três vezes para lise celular e liberação das partículas virais as amostras foram diluídas 1:100 em PBS. Todos os espécimes clínicos foram armazenados a -20 °C.

O comportamento típico dos camundongos de defecar durante a manipulação permite que as amostras de fezes sejam coletadas diretamente no ânus do animal com o auxílio de um microtubo *ependorf* de 1,5ml. Esse procedimento garante que os animais sejam analisados individualmente e que a viabilidade da amostra não tenha sido comprometida por exposição prolongada na gaiola. Antes de serem utilizados nas reações de PCR os espécimes foram macerados em PBS (100mg fezes para 900µL de PBS), com o auxílio de um pistilo. Após congelar e descongelar três vezes para lise celular e liberação das partículas virais, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm (Sorvall RT6000 B) por 2 minutos, e armazenadas a -20 °C.

5.9- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a amplificação do gene *vgf*, que codifica para um fator de crescimento viral e tem sido amplamente utilizado como alvo, em associação com outros genes no diagnóstico e estudos filogenéticos de OPVs brasileiros, foi utilizado uma PCR do tipo Nested. A reação *Nested* PCR apresenta duas etapas. Na primeira, foram utilizados os iniciadores VGF F e R, que amplificam um fragmento de 381 pb (pares de base). O produto desta primeira reação foi utilizado como molde para a segunda etapa da amplificação, que utiliza dois iniciadores internos VGF RT F e R, cujo produto final é um amplificado de 170 pb (Tabela 5).

Tabela 5: Iniciadores utilizados para a amplificação do gene *vgf* por Nested- PCR.

Iniciador	Seqüência	Tamanho amplicon (pb)	Referência
VGF F	3' CGCTGCTATGATAATCAGATCATT 5'	381	FONSECA <i>et al.</i> , 1998
VGF R	5' GATATGGTTGTGCCATAATTTTTAT 3'		
VGF RT F	3' ACACGGTGAAGTGTATCCA 5'	170	ABRAHÃO <i>et al.</i> , 2009
VGF RT R	5' CTAATACAAGCATAATAC 3'		

Na primeira etapa de amplificação foram utilizadas as seguintes condições salinas e enzimáticas: 0.4 mM de cada iniciador (VGF-F e VGF-R), 10 mM dNTP's, 2.0 mM MgCl₂, 500 ng albumina bovina sérica (BSA) e 2 U de Taq DNA polimerase (Promega, Madison, USA), usando tampão 10X fornecido pelo fabricante. As seguintes condições térmicas foram utilizadas para a amplificação do gene *vgf* na primeira reação: pré-incubação à 95°C por 9 minutos; 30 ciclos de denaturação (94°C, 1 minuto), pareamento (45°C, 1 minuto) e extensão (72°C, 1 minuto); extensão final (72°C, 10 minutos). O volume de 1 µL desta 1ª reação foi utilizado, sem diluição, como amostra na 2ª reação. Foram utilizadas as mesmas condições químicas e térmicas da primeira reação, com exceção do BSA, que não faz parte da 2ª reação e os iniciadores utilizados são os internos. Como controle positivo foi utilizado 10⁴ ufp/µL de VACV-WR purificado por reação. Para os controles negativos, 1 µL de água foi utilizado para substituir as amostras correspondentes. Os fragmentos amplificados foram fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 8%, sob voltagem de 100V e corados pela prata.

5.10- Extração de DNA pelo método fenol-Clorofórmio

A extração de DNA inclui basicamente dois procedimentos principais, a lise das células presente na amostra e a purificação do DNA. O fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (PCI) foram utilizados na proporção 25:24:1. Foi adicionado 50 µL do sobrenadante do órgão processado em 450 µL de PBS 1X e posteriormente 500 µL de PCI foi adicionado a esta mistura gerando uma proporção de 1:1 v/v de PCI na amostra. Este foi homogeneizado e centrifugado por 2 minutos (Eppendorf 5415C, Europa). Foi feita a coleta do sobrenadante e adicionado 10% do volume de acetato de sódio 3M pH 5,5 e 2,5X do volume do sobrenadante de álcool absoluto. A mistura foi homogeneizada e a reação deixada no gelo por 10 minutos, e centrifugada por 5 minutos (Eppendorf 5415C, Europa), a 4 °C. O sobrenadante foi descartado por inversão e o tubo deixado aberto em estufa. Após a completa evaporação do etanol, o DNA extraído foi homogeneizado em 50 µL de água e quantificado em nanodrop (Uniscience).

6- Resultados

6.1- Transmissão vertical em Balb/c grávidas – parto normal

Para avaliar a transmissão vertical, um grupo de três camundongos Balb/c grávidas que estavam aproximadamente no 14^o dia de gravidez foram infectadas com 10⁶ pfu de GP2V. Os animais foram acompanhados até o nascimento da prole (treze filhotes), que ocorreu no 5^o dpi. Para o controle negativo um animal foi submetido aos mesmos procedimentos experimentais (12 filhotes) e inoculado com PBS (Tabela 6).

Tabela 6: Infecção de camundongos Balb/c fêmeas grávidas com parto normal.

Vírus	Número de animais*	Prole (morte)	Dia da eutanásia dpi
GP2V	3	3 (1)	6 ^o
Controle -PBS	1	12 (0)	6 ^o

*Animais com aproximadamente 14 dias de gravidez; (dpi) dias pós infecção; (GP2V) Guarani virus P2; (PBS) Solução tampão fosfato salina.

Os camundongos fêmea grávidas infectadas com GP2V não apresentaram nenhum sinal clínico e o curso da gravidez foi normal bem como a prole apresentava aparência normal, não sendo observadas anomalias, natimortos ou outras adversidades após o parto (Figuras 16, 17 e 18).

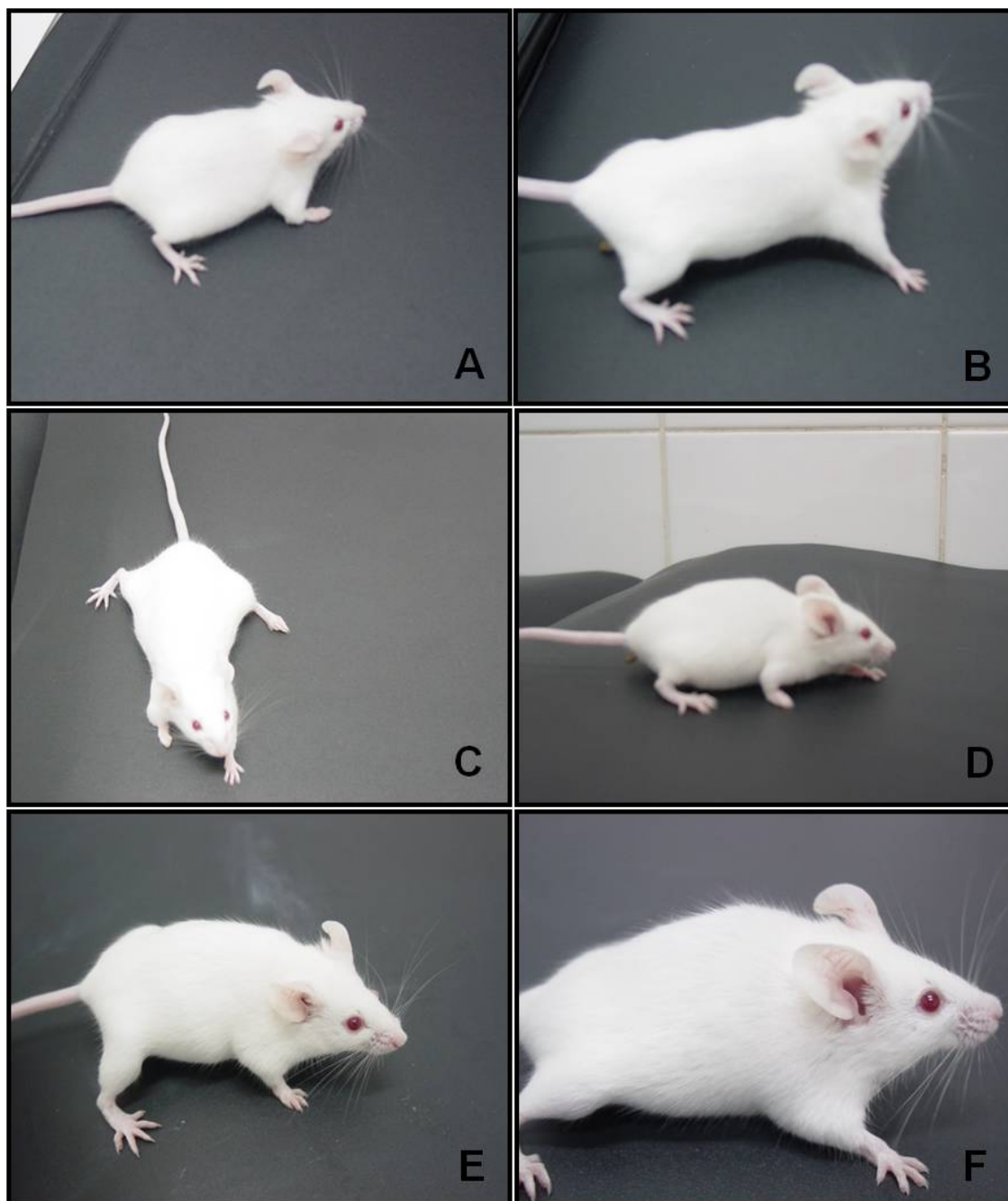


Figura 16: Camundongos Balb/c grávidas infectadas com GP2V.

Grupos de camundongos foram infectados com 10^6 pfu de GP2V e o controle inoculado com PBS. Os animais foram observados nos seguintes dias após a infecção: A-PBS e B-GP2V, no 2º dpi; C-PBS e D-GP2V, no 3º dpi; E-GP2V e F-GP2V, no 4º e 5º dpi respectivamente.

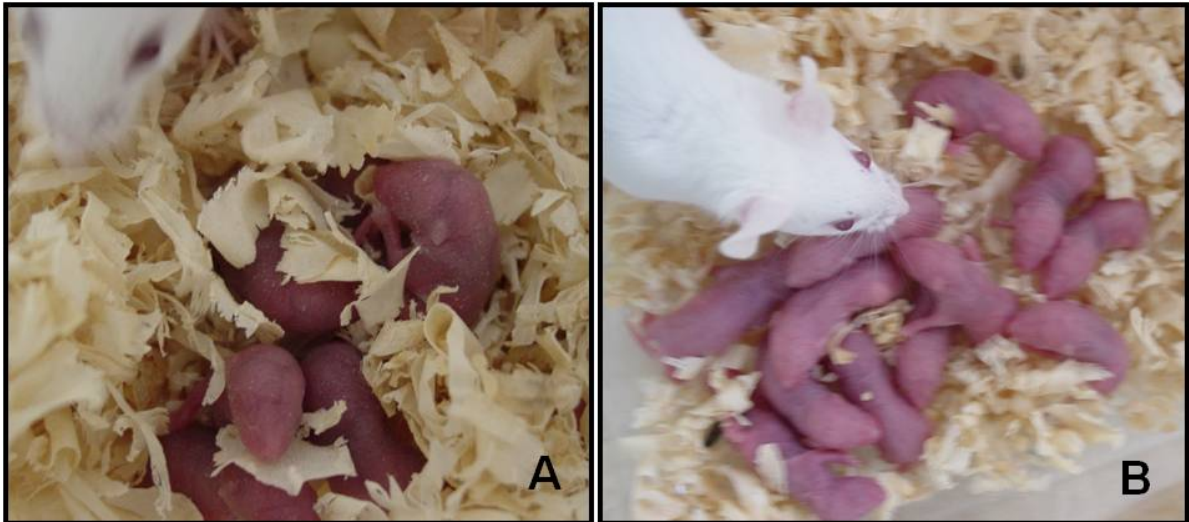


Figura 17: Camundongos Balb/c neonatos nascidos de fêmeas infectadas com GP2V. Grupos de camundongos foram infectados com 10^6 pfu de GP2V e o controle inoculado com PBS. Animais neonatos foram observados nos seguintes dias após a infecção: A-5^o dpi e B-6^o dpi.

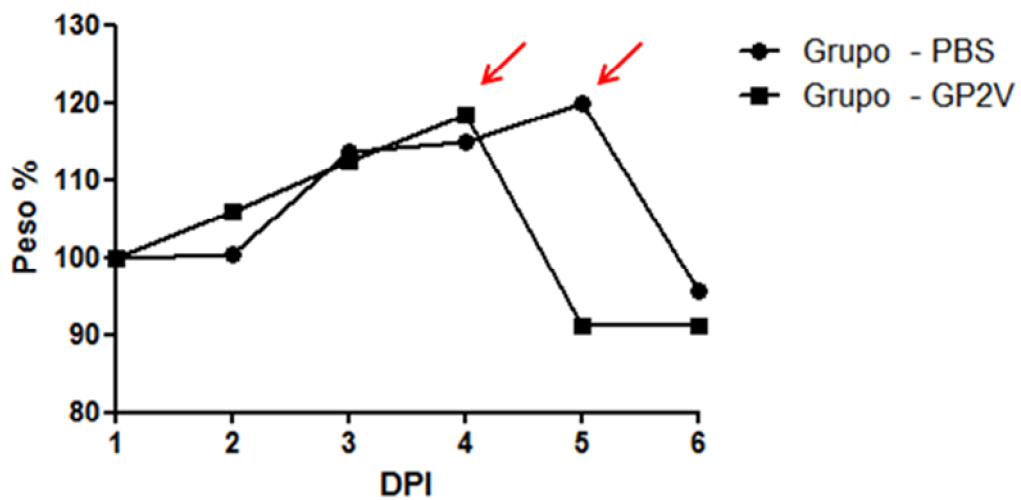


Figura 18: Peso de camundongos Balb/c grávidas infectadas com GP2V. Grupos de camundongos que foram infectados com 10^6 pfu de GP2V (média de um n=3) e o controle inoculado com PBS, tiveram seu peso determinado diariamente. dpi - dias após a infecção. As setas vermelhas indicam o dia de nascimento dos filhotes.

Para avaliar a presença de DNA viral no sangue e fezes das mães, foi feito um “pool” das amostras coletadas no 2º e 5º dpi. As amostras de sangue e fezes das mães foram positivas para a amplificação de um fragmento de DNA do gene *vgf* nos dois dias coletados (Figura 19). Os filhotes foram eutanasiados e tiveram seus estômagos, sangue e carcaças coletados e submetidos a Nested-PCR para o gene *vgf* e isolamento viral após o processamento (Tabela 7). Foi possível detectar DNA viral em dez das onze amostras de estômagos e de sangue dos filhotes (Figura 19 e 20). Além disso, foi possível isolar o vírus em monocamadas de células BSC-40 de sete amostras de estomago, mas não das carcaças dos neonatos (Figura 21 e 22). Em conjunto, esses resultados indicam a transmissão de mãe para filho de GP2V em modelo murino. Não foi possível detectar DNA viral na diluição testada de 1:10 nas amostras de linfonodos, coração, pulmão, cérebro, intestino, baço, rim, útero e ovário das mães e carcaças dos filhotes.

Tabela 7: Detecção de vírus em camundongos Balb/c neonatos nascidos de camundongos grávidas infectadas com GP2V em avaliação feita por Nested-PCR para o gene *vgf* e por isolamento viral.

Neonatos	PCR sangue	PCR Estomago	PCR Carcaça	Isolamento viral	
				Estomago	Carcaça
1 B	N	N	N	N	N
2 B	N	N	N	N	N
1 A	P	P	N	P	N
2 A	N	N	N	N	N
3 A	P	P	N	P	N
4 A	P	P	N	P	N
5 A	P	P	N	P	N
6 A	P	P	N	P	N
7 A	P	P	N	P	N
8 A	P	P	N	N	N
9 A	P	P	N	N	N
10 A	P	P	N	N	N
11 A	P	P	N	P	N

Camundongos neonatos nascidos de camundongos grávidas Balb/c foram inoculados com (A) 10^6 pfu de GP2V; (B) PBS; N- não detectado; P- positivo.

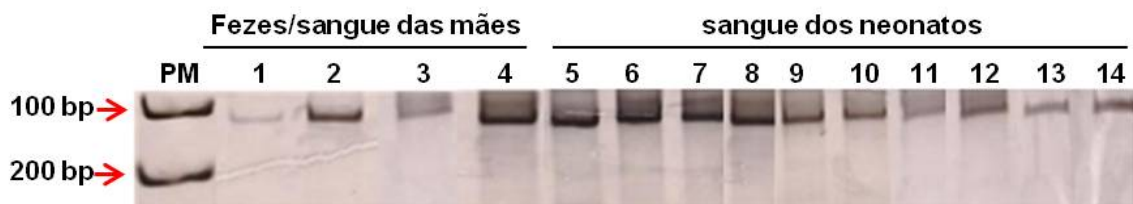


Figura 19: Detecção de vírus nas fezes e no sangue dos camundongos grávidas Balb/c infectados com GP2V e no sangue de neonatos em avaliação feita por PCR para o gene *vgf*.

Grupos de camundongos foram infectados com 10^6 pfu de GP2V e tiveram as fezes e sangue coletados no 2^o e 5^o dpi. Os neonatos foram sacrificados no 6^o dpi. Canaletas: PM - tamanho molecular; 1 e 2 - sangue das mães 2^o e 5^o dpi respectivamente; 3 e 4 - fezes das mães 2^o e 5^o dpi respectivamente; 5 a 14- sangue dos neonatos do grupo infectado com GP2V.

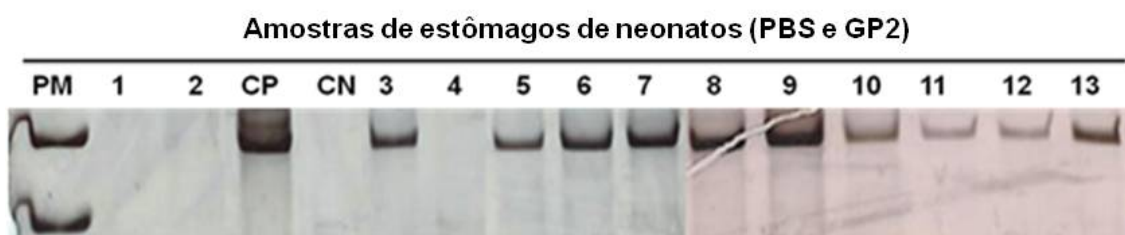


Figura 20: Detecção de vírus em amostras de estômago de camundongos neonatos Balb/c nascidos de fêmeas infectadas com GP2V em avaliação feita por Nested- PCR para o gene *vgf*.

Grupos de camundongos fêmeas foram infectados com 10^6 pfu de GP2V e os estômagos dos neonatos eutanasiados no 6^o dpi foram coletados. Canaletas: PM- tamanho Molecular; 1 e 2 - grupo controle inoculado com PBS; CP - controle positivo da reação com VACV-WR; CN - Controle negativo da reação com água; 3 a 13 - amostras de estômagos de neonatos do grupo infectado com GP2V correspondentes aos filhotes de número 1 ao 11.

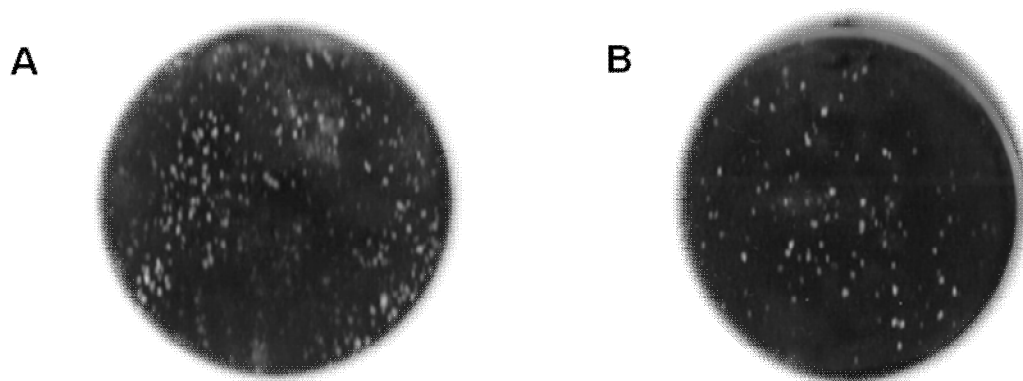


Figura 21: Isolamento viral do estômago de camundongos neonatos Balb/c nascidos de fêmeas infectadas com GP2V.

Os estômagos dos neonatos foram macerados em PBS e inoculados em BSC-40 observando-se as placas de lise em 48 horas. **A** - estômago do neonato 11; **B** - estômago do neonato 5.

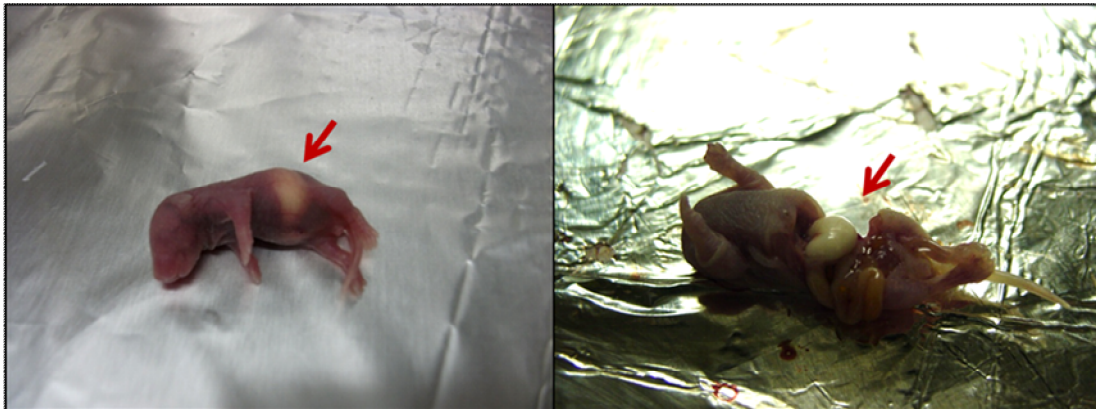


Figura 22: Camundongos neonatos Balb/C nascidos de fêmeas infectadas com GP2V.

Grupos de camundongos fêmeas foram infectados com 10^6 pfu de GP2V e os neonatos foram fotografados no 6^o dpi. As setas vermelhas indicam o estômago.

Para comprovar que os DNAs amplificados obtidos na Nested- PCR para o gene *vgf* de amostras do estomago dos neonatos eram de um OPV, foi feito o sequenciamento direto. A análise das seqüências dos genes *vgf* obtidas a partir de amostras dos neonatos nascidos de camundongos Balb/c infectadas com GP2V, revelou total identidade com a amostra de GP2V inoculada (Figura 23).

```

GOL_1_est5          GAT GCT CTC ATG GTT ATA CAG GCA TTA GAT GTC AGC ATG TAG TAT TAG TAG ACT ATC AAC GTT CAG AA
GOL_1_est6          ...
GOL_1_est7          ...
GOL_1_est9          ...
GOL_1_est11         ...
GOL_1_est13         ...
GOL_1_est10         ...
DQ206440_VACV-Guarani_P1 ...
DQ206441_VACV-Guarani_P2 ...
GQ226041_VACV-MARV  ...
AY523995_VACV-SPAN_232_virus ...
U79140_VACV-BeAn5805 ...
AF503170_VACV-Araçatuba ...
DQ085462_VACV-PSTV ...
DQ121394_VACV-Lister ...
U76180_Cowpox_virus ...
DQ437590_VARR_Somalia_77 ...

```

Figura 23: Alinhamento de seqüências de nucleotídeos amplificadas do gene *vgf* em amostras de estômago.

As sequencias obtidas foram alinhadas com as sequencias depositadas no Genbank: VACV-GP1 (DQ206440), VACV-GP2 (DQ206441), VACV-MARV (GQ226041), VACV-SPAN (AY523995), VACV-BeAn (U79140), VACV-Araçatuba (AF503170), VACV-PSTV (DQ085462), VACV-Lister (DQ121394), Cowpox virus (U76380), VARR-Somalia (DQ437590).

Em paralelo à análise molecular, ensaios sorológicos foram feitos, com o objetivo de demonstrar se as amostras de soro coletadas das fêmeas possuíam anticorpos neutralizantes para VACV. As amostras de soro coletadas das mães no 6° dpi foram submetidas a ensaios de soroneutralização em células BSC-40, mas anticorpos neutralizantes não foram detectados (Figura 24).

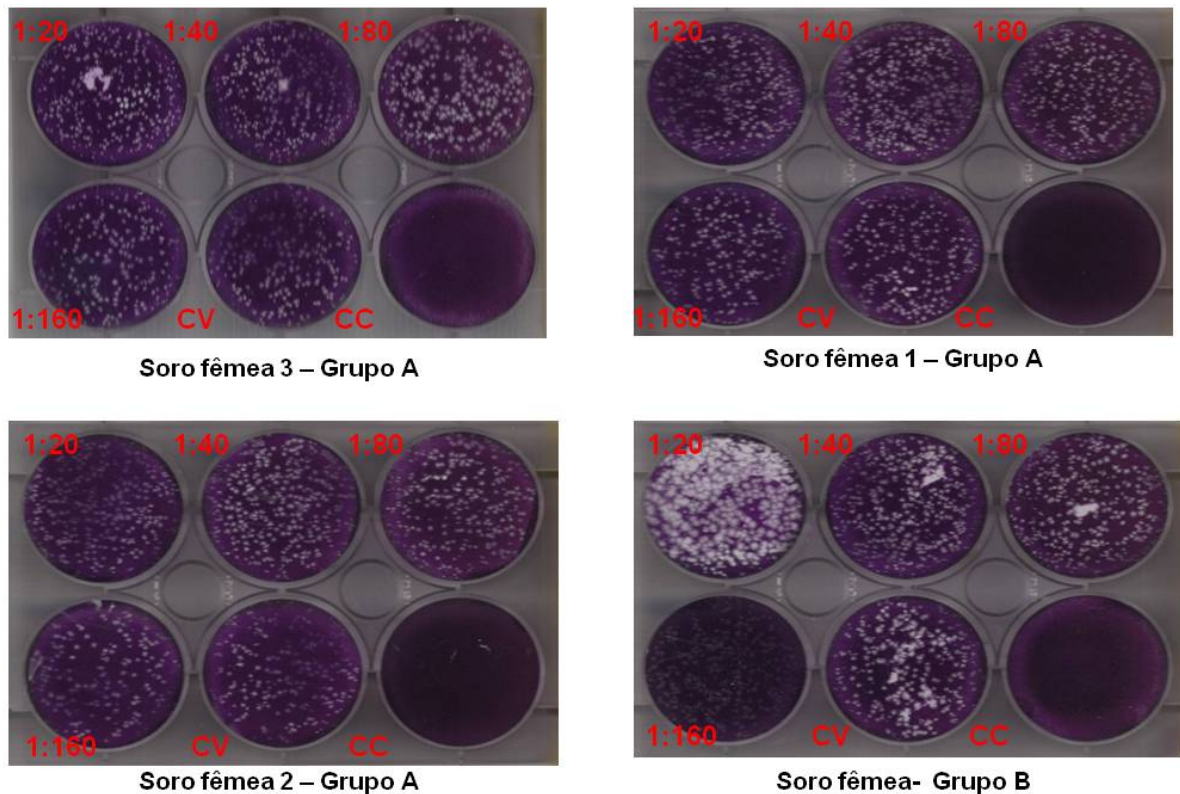


Figura 24: Ensaio de soroneutralização.

Após a eutanásia os camundongos grávidas tiveram o sangue coletado e o soro separado para a pesquisa de anticorpos neutralizantes contra OPV em células BSC-40. **Grupo A:** Soro dos animais infectados com GP2V; **Grupo B:** Soro do animal infectado com PBS. CV: Controle de vírus; CC: Controle de célula.

Não foi possível detectar DNA viral na diluição testada de 1:10 nas amostras de linfonodos, coração, pulmão, cérebro, intestino, baço, rim, útero e ovário das mães e carcaças dos filhotes.

6.2- Transmissão vertical em Balb/c grávidas – cesariana *post-mortem*

Levando em conta os resultados obtidos nos experimentos com Balb/c grávidas e parto normal, foram propostos experimentos de cesariana a fim de buscar respostas sobre a via de transmissão de mãe para filho de VACV-GP2V em modelo murino (Tabela 8). Assim, seis camundongos Balb/c com aproximadamente 14 dias de gravidez, foram inoculadas com 10^6 pfu de GP2V por via intra-nasal e submetidas a uma cirurgia cesariana *post-mortem*, com o objetivo de impedir que os fetos entrassem em contato com as excretas e outras possíveis secreções advindas da mãe potencialmente infecciosas. No grupo controle dois animais foram submetidos aos mesmos procedimentos experimentais (Figura 25 e 26).

Tabela 8: Infecção de camundongos Balb/c fêmeas grávidas com parto cesariana e coleta individual de material*.

Vírus	Número de animais	Prole
GP2V	1	5
	2	3
	3	1
	4	3
	5	3
	6	1
Controle - PBS	1	2
	2	2

(GP2V) Guarani virus P2; (PBS) Solução tampão fosfato salina.

*Dia da cesariana – 5^o dpi

Os animais foram pesados diariamente e amostras de fezes e sangue coletadas e submetidas a Nested-PCR para o gene *vgf*. No 19^o dia de gravidez (5^o dpi), os animais foram eutanasiados e os fetos retirados cirurgicamente de dentro do útero (Figura 25 e 26).

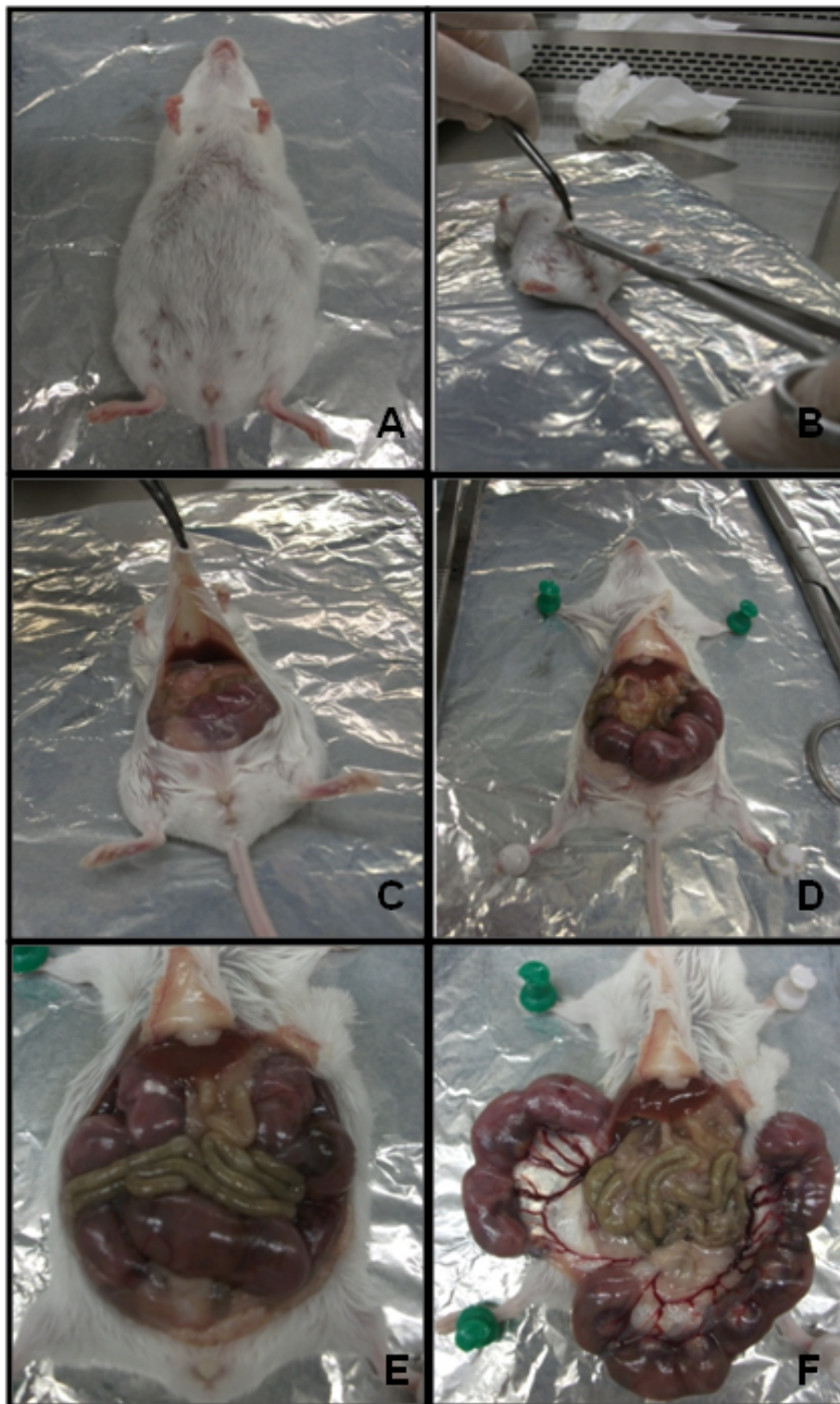


Figura 25: Cesariana *post-mortem* A.
De A-F: abertura do peritônio e exposição do útero.

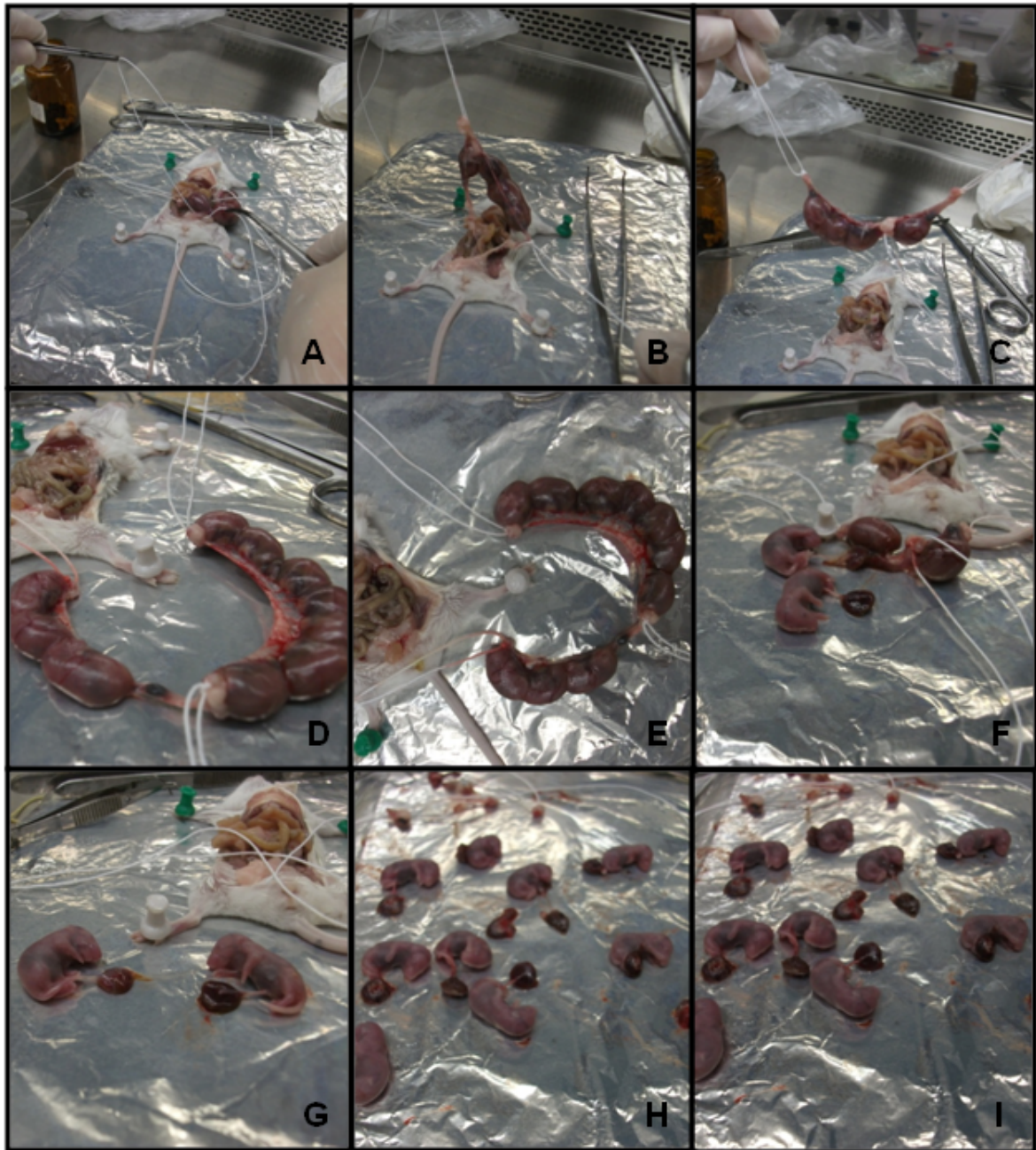


Figura 26: Cesariana *post-mortem* B.

De **A-I**: após amarrado nas extremidades superiores próximo aos dois ovários o útero é retirado da cavidade abdominal. Posteriormente os fetos são retirados de dentro do útero através de uma incisão com o auxílio de uma tesoura cirúrgica.

Os resultados de ausência de sinal clínico obtidos nos experimentos anteriores mais uma vez se repetiram, incluindo a ausência de perda de peso (Figura 27). As amostras de sangue e fezes submetidas à PCR para a detecção de DNA viral demonstram uma variação na positividade. Os animais um e quatro apresentaram positividade em sangue e fezes no primeiro e terceiro dpi, respectivamente. Os animais dois, três e seis apresentaram positividade somente em fezes no terceiro, terceiro e quarto e no segundo dpi, respectivamente. O animal cinco apresentou positividade no sangue no primeiro e terceiro dia e nas fezes do segundo ao quarto dpi conforme demonstrado na Figura 28 e na Tabela 9.

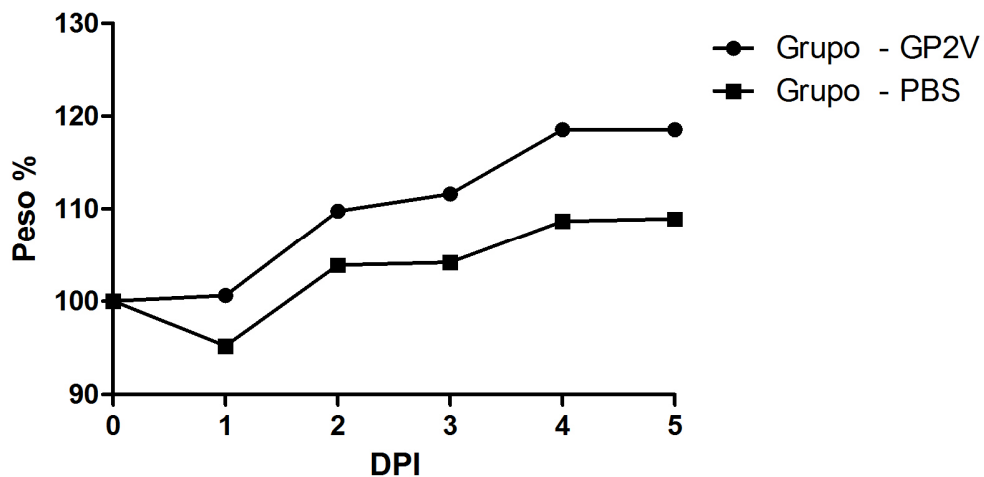


Figura 27: Peso de camundongos Balb/c grávidas infectadas com GP2V.

Grupos de camundongos foram infectados com 10^6 pfu de GP2V (média de um n=6) e o controle inoculado com PBS (n=2), tiveram seu peso determinado diariamente. dpi - dias após a infecção.

Tabela 9: Detecção de DNA viral nas fezes e sangue de camundongos Balb/c grávidas infectadas com GP2V em avaliação feita por Nested-PCR para o gene *vgf*.

Animais*	Positividade PCR				
	1°	2°	3°	4°	5°
1	S/F				
2			F		
3			F	F	
4			S/F		
5	S	F	S/F	F	
6		F			

**Foi utilizado sangue e fezes dos animais antes da cesariana.

F=Fezes S=Sangue

PCR sangue/fezes Balb/c grávidas

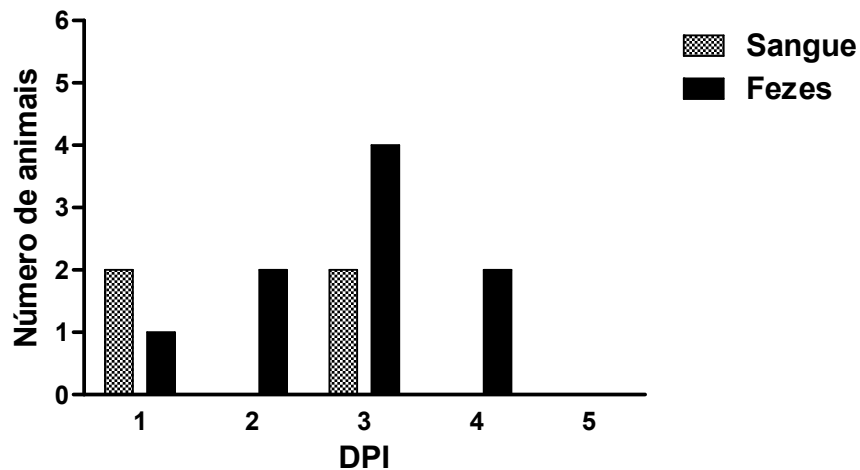


Figura 28: Detecção de DNA viral nas fezes e sangue de camundongos Balb/c grávidas infectadas com GP2V em avaliação feita por Nested-PCR para o gene *vgf*.

Grupos de camundongos grávidas foram infectados com GP2V e foi feita a coleta individual de amostras de sangue e fezes todos os dias. As amostras foram processadas e foi feito PCR para o gene *vgf*

Com a cesariana foi possível ter acesso à amostras como placentas e fetos coletados no 5^o dpi (Tabela 10). Duas placentas, ambas do animal número quatro (referentes aos fetos 1 e 2) foram positivas na Nested -PCR, após a extração de DNA (Figura 29A). Não foi possível detectar nenhuma placa viral em BSC-40. Quando da inoculação em membrana corioalantoide (MCA) de embrião de galinha a placenta da fêmea 4/feto 1 apresentou lesões semelhantes a pocks foi congelada, processada e inoculada novamente em BSC-40 sem sucesso de isolamento viral (Figura 29B).

Tabela 10: Detecção de vírus em fetos e placentas de camundongos Balb/c infectados GP2V.

Placentas		Isolamento		Fetos	
NºFêmea/ NºFeto/Grupo	Nested-PCR	viral	NºFeto/ NºFêmea/Grupo	Nested-PCR	viral
1/1/GP2V	N	N	1/1/GP2V	N	N
1/2/GP2V	N	N	2/1/ GP2V	N	N
1/3/GP2V	N	N	3/1/ GP2V	N	N
1/4/GP2V	N	N	4/1/ GP2V	N	N
1/5/ GP2V	N	N	5/1/ GP2V	N	N
2/1/ GP2V	N	N	1/2/ GP2V	P	N
2/2/ GP2V	N	N	2/2/ GP2V	N	N
2/3/ GP2V	N	N	3/2/ GP2V	N	N
3/1/ GP2V	N	N	1/3/ GP2V	P	N
4/1/ GP2V	P	MCA	1/4/ GP2V	N	N
4/2/ GP2V	P	N	2/4/ GP2V	N	N
4/3/ GP2V	N	N	3/4/ GP2V	N	N
5/1/ GP2V	N	N	1/5/ GP2V	N	N
5/2/ GP2V	N	N	2/5/ GP2V	N	N
5/3/ GP2V	N	N	3/5/ GP2V	N	N
1/1/PBS	N	N	1/1/PBS	N	N
1/3/PBS	N	N	3/1/PBS	N	N
2/1/PBS	N	N	1/2/PBS	N	N
2/2/PBS	N	N	2/2/PBS	N	N

Grupos de camundongos Balb/c com 14 dias de gravidez foram infectados com GP2V. Após 5 dpi foi feita a cesariana e as placentas e os fetos foram removidos. Foi feito Nested- PCR e isolamento de todas as amostras. **N**- não detectado, **P**- positivo, **S**- suspeita.

*As amostras de fetos ou placentas que não foram submetidas a PCR ou ao isolamento foram fixadas para serem analisadas histologicamente.

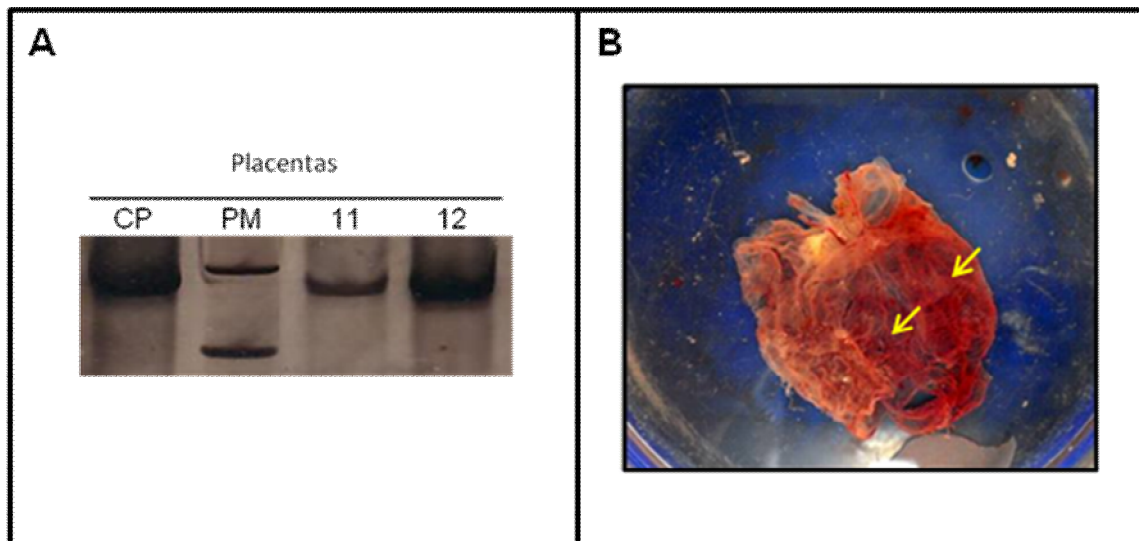


Figura 29: Detecção de vírus na placenta de camundongos Balb/c grávidas infectados com GP2V em avaliação feita por Nested-PCR para o gene *vgf* e inoculação em MCA.

Grupos de camundongos grávidas foram infectados com GP2V e no 6 dpi foi feita a cesariana e foram retiradas as placentas. **A.** As placentas foram submetidas a Nested-PCR para o gene *vgf*. Canaletas: CP - VACV-WR controle positivo; PM - tamanho molecular; 11 - Placenta fêmea 4 feto1 Grupo GP2V; 12 - Placenta fêmea 4 feto 2 Grupo GP2V. Os amplificadores foram fracionados em gel de poliácridamida 8 %, sob a voltagem de 100V e corados por prata. **B** MCA de ovos de galinha embrionados foram inoculadas com as placentas processadas na diluição 1:10. Após 72 horas de incubação, manchas esbranquiçadas (indicadas pelas setas amarelas) indicando formação de *pocks* típicos de VACV foram observadas.

Após a detecção de DNA viral na placenta, o próximo passo a fim de comprovar a transmissão vertical em modelo murino foi avaliar a presença de DNA viral nos fetos. Assim, os fetos retirados cirurgicamente do útero das fêmeas infectadas com GP2V, foram processados e submetidos a Nested- PCR para o gene *vgf*. Desta vez, as amostras foram processadas da seguinte maneira: 1:10 e 1:100 sem extração de DNA e com extração de DNA pelo método fenol/clorofórmio (PCI). Foi possível detectar DNA viral em dois fetos, (Feto 3/Fêmea 1 e Feto 1/Femea 2) indicando que a amostra GP2V pode ser transmitida verticalmente de mãe para filho em modelo murino (Figura 30).

Fetos nascidos de mães infectadas com GP2V – cesariana *post mortem*

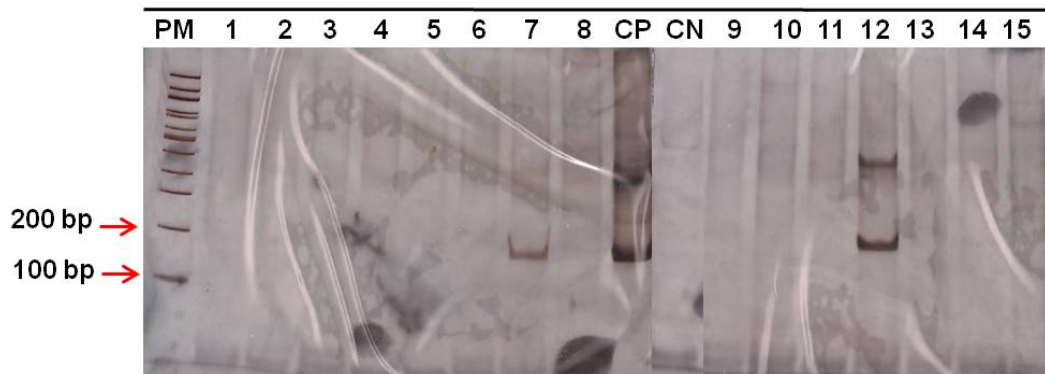


Figura 30: Detecção de DNA viral em fetos de camundongos Balb/c nascidos de mãe infectadas com GP2V após cesariana pós-mortem analisados em Nested-PCR para o gene *vgf*.

Canaletas: CP - VACV-WR controle positivo; PM - tamanho molecular; CN - controle negativo da reação com água; Canaletas 1 a 15 amostras de fetos nascidos de fêmeas infectadas por GP2V, as amostras 7 (referente ao feto 3 da fêmea 1) e 12 (referente ao feto 1 da fêmea 2).

6.2.1- Virulência de GP2V em Balb/c fêmeas adultas

Diante dos resultados obtidos com detecção de DNA viral no sangue e fezes dos animais foi feito um experimento com quatro fêmeas adultas (6-8 semanas de idade), fora do estado de prenhez ou lactação. As fêmeas foram inoculadas com a mesma dose de GP2V dos experimentos anteriores com grávidas e lactantes, 10^6 pfu. As amostras de fezes e sangue foram coletadas diariamente durante cinco dias. Apenas uma fêmea, no 1^o dpi foi positiva para detecção de DNA viral no sangue, e nenhum animal foi positivo nas amostras de fezes analisadas nos cinco dias de infecção.

6.3- Transmissão horizontal em Balb/c lactantes

Com o intuito de determinar se fêmeas lactantes eram capazes de se infectar e transmitir GP2V para sua prole, um grupo de seis camundongos Balb/c lactantes com prole de idade entre 2-5 dias foram inoculados com 10^6 pfu de GP2V e acompanhados diariamente para observar possíveis sinais clínicos, sendo eutanasiados do 8^o ao 15^o dpi para avaliação da infecção e transmissão para a prole (Tabela 11). Não houve perda de peso de nenhum grupo nos dias observados e

nenhum outro sinal clínico foi detectado durante o período de experimentação, tanto dos grupos infectados com GP2V como o grupo controle inoculado com PBS. Além disso, todos os filhotes que amamentaram nas fêmeas infectadas demonstraram um padrão de desenvolvimento aparentemente normal, bem como os filhotes do grupo controle.

Tabela 11: Peso de camundongos Balb/c lactantes e dias de eutanásia.

Grupos (Prole)	dpi														
	1°	2°	3°	4°	5°	6	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°	15°
Controle (4)	33,4	33,7	35,0	37,0	39,0	38,2	38,5	40,5	40,5	40,2	39,3	40,3	41,9	42,5	40,6
1 (4)	27,0	33,0	32,0	32,4	36,4	34,1	35,7	*	-	-	-	-	-	-	-
2 (5)	30,6	33,9	34,0	34,5	36,9	35,3	36,9	*	-	-	-	-	-	-	-
3 (6)	34,2	34,6	34,0	35,0	38,0	37,6	39,4	39,5	39,5	38,7	*	-	-	-	-
4 (4)	24,0	25,8	28,0	29,9	29,2	29,6	29,8	29,7	29,5	29,8	*	-	-	-	-
5 (3)	25,0	26,2	27,0	28,4	28,0	29,3	29,2	29,1	29,1	30,2	30,0	30,3	29,3	29,4	28,0
6 (4)	29,7	34,8	35,0	35,9	38,7	37,0	37,6	37,5	39,1	38,6	40,0	36,4	39,3	40,3	37,7

*Dia da eutanásia; grupos 1 – 6: inoculados com GP2V; Grupo controle inoculado com PBS

A infecção das fêmeas pôde ser confirmada pela detecção de DNA viral no sangue e nas fezes em diferentes dias pós-infecção (Tabela 12). Entretanto, não foram detectadas partículas virais viáveis e DNA viral no estomago dos lactentes, e ao contrário da alta positividade encontrada para os neonatos nascidos de fêmeas infectadas com GP2V demonstrado anteriormente (Tabela 7), foi detectado DNA viral no sangue de apenas dois lactentes, ambos eutanasiados no 11° dpi (Figura 31). Ao todo foram analisadas treze amostras de sangue e treze de estomago de filhotes que amamentaram em fêmeas infectadas com GP2V (Tabela 13).

Tabela 12: Camundongos Balb/c lactantes infectados com GP2V. Positividade em Nested-PCR para o gene *vgf* em sangue e fezes.

Animal*	Nested-PCR Sangue (dpi)	Nested-PCR Fezes (dpi)
CN	-	-
1	P (2,5)	P (2,5)
2	P (2,5)	P (2,5)
3	P (2,5,8)	P (2,5,8)
4	P (2,5,8)	P (2,5,8)
5	P (2,5,8,11, 14)	P (2,5,8,11, 14)
6	P (2,5,8,11,14)	P (2,5,8,11,14)

*Balb/c lactantes com prole de idade entre 2-5 dias foram inoculados com 10^6 pfu de GP2V e coletados sangue e fezes no 2,5,8, 11 e 14^o dpi

P:Positivo ; CN: Grupo Controle

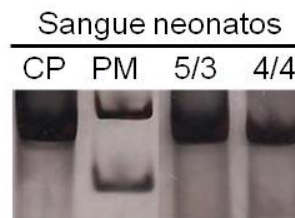


Figura 31: Detecção de DNA viral no sangue de camundongos Balb/c lactentes que amamentaram em fêmeas infectadas com GP2V.

Fêmeas foram infectadas com GP2V e amamentaram os filhotes até 11^o dpi quando foram eutanasiados e o sangue foi retirado para fazer Nested –PCR para o gene *vgf*. Canaleta: CP - Controle positivo; Canaleta: PM - tamanho molecular; Canaleta 5/3: Filho 5 da fêmea 3 ; Canaleta 4/4: Filho 4 da fêmea 4.

Tabela 13: Detecção de DNA viral em camundongos Balb/c lactentes que amamentaram em fêmeas infectadas com GP2V. Positividade em Nested-PCR para o gene *vgf* em sangue e no estômago.

N ^o Filhote / N ^o Mãe	PCR Nested- <i>vgf</i> Estômagos	PCR Nested- <i>vgf</i> Sangue	Dia da eutanásia*
1/CN	N	N	15 ^o
2/CN	N	N	15 ^o
1/3	N	N	11 ^o
2/3	N	N	11 ^o
4/3	N	N	11 ^o
5/3	N	P	11 ^o
6/3	N	N	11 ^o
1/4	N	N	11 ^o
2/4	N	N	11 ^o
3/4	N	N	11 ^o
4/4	N	P	11 ^o
1/5	N	N	15 ^o
2/5	N	N	15 ^o
3/5	N	N	15 ^o
5/5	N	N	15 ^o

* Não foi obtido isolamento de nenhuma amostra

N: Não detectado; P: Positivo ;CN: Grupo Controle

6.4- Presença de DNA viral e partículas virais viáveis no leite de camundongos Balb/c lactantes

Para avaliar a presença de DNA viral no leite de camundongos Balb/c lactantes um grupo de sete fêmeas com prole entre 2-5 dias de idade foram infectadas pela via intranasal com 10^6 pfu de GP2V. A presença de DNA viral em sangue ou em fezes foi detectada em apenas quatro animais dentre todos os animais analisados, conforme demonstrado na tabela 14. Os animais não tiveram perda de peso e nenhum sinal clínico foi observado.

Tabela 14: Camundongos Balb/c lactantes utilizados para detecção de vírus no leite.

Vírus	Animais lactantes**	Prole* (número de filhotes)	PCR <i>vgf</i>
			positividade em fezes- F ou sangue- S (dpi)
GP2V	1	2	F(4)
	2	4	
	3	5	
	4	6	F (5,6)
	5	-	S (5)
	6	4	S (4)
PBS	7	4	

* prole com 2-5 dias/idade;** eutanásia foi feita no 6ºdpi ; (GP2V) Guarani virus P2; (PBS) Solução tampão fosfato salina.

-Dado indisponível.

O leite foi coletado durante todo o período de experimentação, ou seja, até o 6º dpi para sete animais. Conforme descrito anteriormente a coleta foi realizada diariamente com o auxílio de uma ordenhadora (Figuras 32 e 33), após a administração de ocitocina e metaclopramida. O leite sugado pela bomba de vácuo, ficava preso dentro da mangueira que era lavada com aproximadamente 300µL PBS. Esse volume era empregado para lavar as mangueiras utilizadas para a ordenha de todos os outros animais do mesmo grupo e estocado dentro de um microtubo. Esse

“pool” foi submetido à Nested-PCR para o gene *vgf* diretamente sem diluição e também com extração de DNA. Entretanto, não houve amplificação do fragmento esperado, sendo, portanto consideradas como amostras negativas.

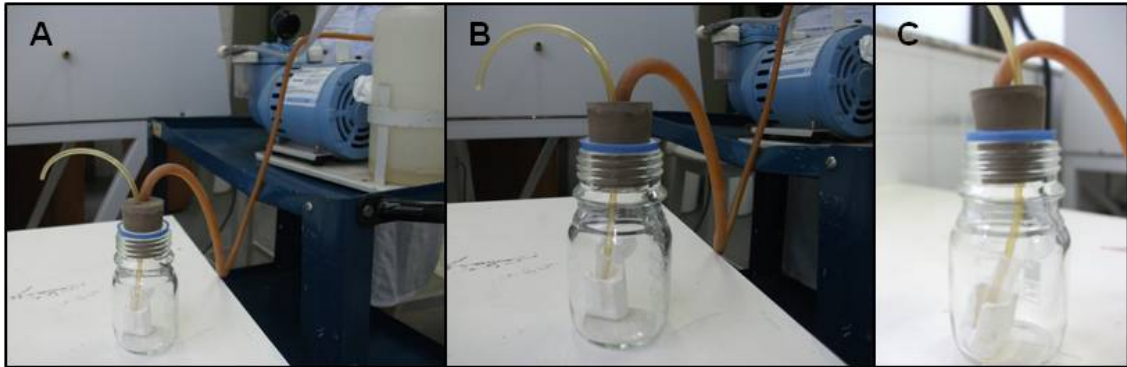


Figura 32: Aparato de ordenhar camundongo.
A e B o aparato ligado à bomba de vácuo; C: apenas o aparato.

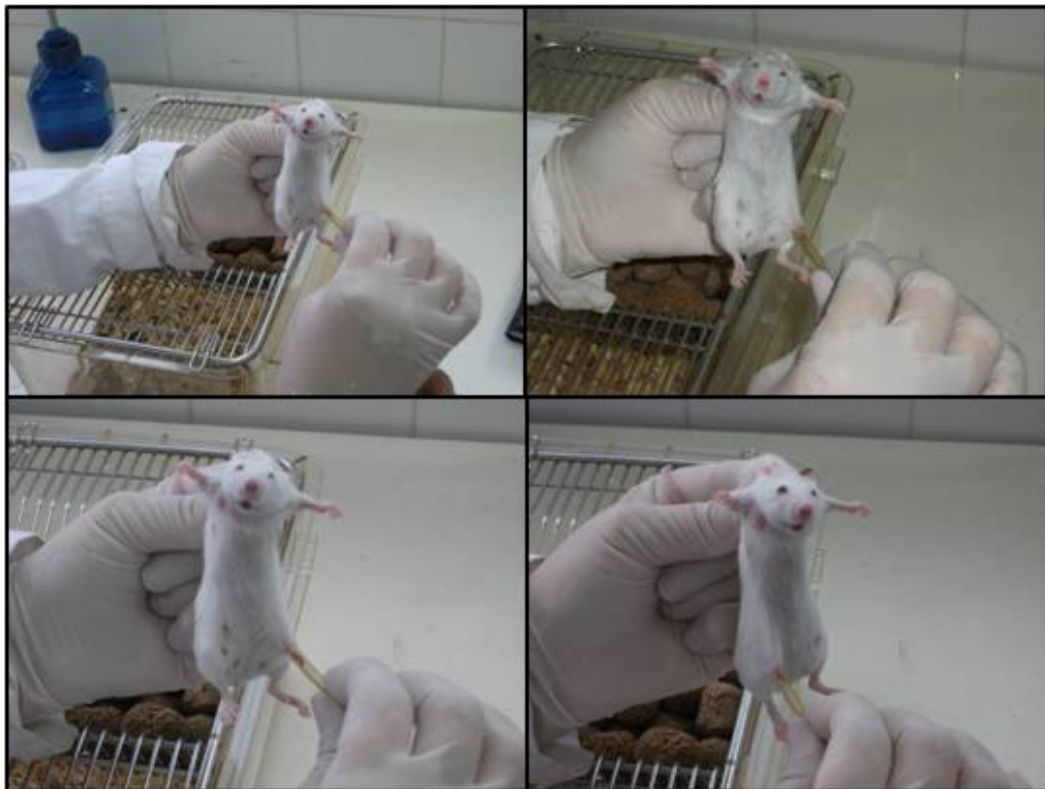


Figura 33: Ordenha de camundongos Balb/c lactantes.

6.5- Transmissão de VACV-GP2 por via oral em camundongos Balb/c

A avaliação da transmissão do GP2V através do leite foi feita em camundongos neonatos de 2-5 dias de idade infectados pela via oral com $2,6 \times 10^4$ pfu de GP2V em 10 μ L de PBS (Figura 34). Os filhotes foram eutanasiados do segundo ao oitavo dpi (Tabela 15). Não foi possível detectar DNA viral no sangue dos filhotes nos dpi analisados e com a dose utilizada. O sangue e fezes da mãe dos filhotes também foram coletados durante todo o experimento e analisados à possível transmissão filho-mãe, entretanto não foi detectado DNA viral em nenhuma das amostras submetidas a análises moleculares. Tanto as mães quanto os filhotes não apresentaram nenhum sinal clínico, apesar do peso dos neonatos não ter sido registrado a fim de evitar interferências no reconhecimento dos mesmos pelas mães.



Figura 34: Inoculação oral em camundongos Balb/c neonatos com GP2V.

Tabela 15: Escala de eutanásia dos filhotes de camundongos Balb/c inoculados por via oral.

Filhotes	1º dpi	2º dpi	3º dpi	4º dpi	5º dpi	6º dpi	7º dpi	8º dpi
1		X						
2		X						
3			X					
4			X					
5					X			
6					X			
7						X		
8								X
9								X

6.6- Virulência em camundongos Balb/c nascidos de fêmeas infectadas com GP2V inoculados com GP1V

Para avaliar se filhotes que amamentaram em fêmeas infectadas com GP2V eram capazes de se desenvolver sem alterações clínicas, e verificar se eles ficariam de alguma forma imune a um desafio contra uma amostra de VACV virulenta, um grupo de quatro animais com idade entre dois a cinco dias que amamentaram durante quinze dias em fêmeas infectadas com 10^6 pfu de GP2V foi desafiado com 10^6 PFU de GP1V por via intranasal ao atingirem aproximadamente quatro semanas de idade. Um grupo controle de dois animais que amamentaram em fêmeas inoculadas com PBS foi submetido aos mesmos procedimentos experimentais. Os animais foram pesados a partir do 3º dpi (Figura 35) e observados quanto aos sinais clínicos. Todos os dois grupos apresentaram sinais clínicos com perda de peso, arqueamento de dorso e pilo-ereção.

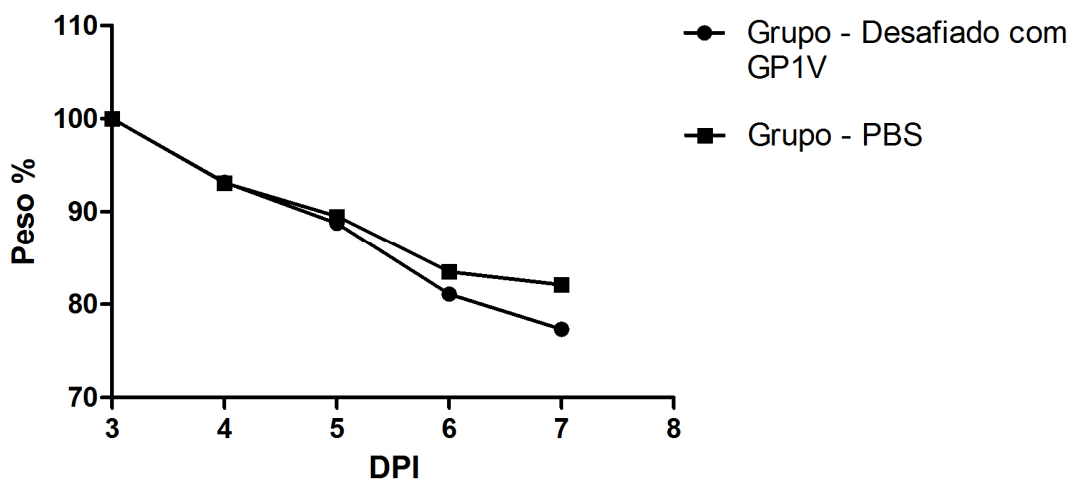


Figura 35: Peso de camundongos Balb/c que amamentaram em mães inoculadas com GP2V e foram desafiados com GP1V.

Quatro animais com idade entre dois a cinco dias que amamentaram durante quinze dias em fêmeas infectadas com 10^6 pfu de GP2V foram desafiados com 10^6 pfu de GP1V por via intranasal ao atingirem aproximadamente quatro semanas de idade. Os animais tiveram seu peso determinado a partir do 3º dpi.

7-Discussão

O uso VACV na ciência produziu diversos benefícios para a humanidade, que incluem a sua utilização em estudos com vetor recombinante e em terapia gênica, o aperfeiçoamento de técnicas de purificação e titulação viral, os estudos de patogênese e ecologia viral e a sua marcante utilização como vacina contra varíola, que sem dúvida revolucionou a medicina, tornando um marco para a vacinologia. Entretanto, as circunstâncias envolvidas na seleção do VACV como vacina contra a varíola não é clara, bem como sua etiologia, seus reservatórios naturais, origem e história evolucionária, sendo frequentemente considerado extinto como um vírus de ocorrência natural (da FONSECA, 2011).

Há mais de uma década surtos de VB são relatados no Brasil acometendo o gado e seus ordenhadores. Diversos estudos propõem que a circulação do VACV dentro e entre as fazendas durante os surtos seja normalmente promovida por ordenhadores infectados que disseminam o vírus para o rebanho pelo do contato com mãos infectadas e através do comércio de gado infectado entre as propriedades vizinhas. Porém, surtos de VACV são temporalmente e espacialmente distantes das áreas com VB notificadas previamente, sugerindo o envolvimento de outras espécies animais como possíveis reservatórios naturais (LEITE *et al.*, 2005; ABRAHÃO *et al.*, 2009a).

Os estudos prévios que sugerem os roedores como possíveis reservatórios naturais, têm ganhado cada vez mais consistência com os dados agregados à literatura de trabalhos recentes na busca pelo entendimento da manutenção do vírus na natureza (da FONSECA *et al.*, 1998; da FONSECA *et al.*, 2002; ABRAHÃO *et al.*, 2009a). Diante desse cenário, aliado à facilidade de experimentação em camundongos e os estudos anteriores para OPXV utilizando esse modelo, a opção pelos roedores nos pareceu a mais assertiva para responder as questões levantadas acerca da possibilidade da transmissão vertical e pelo leite do GP2V.

O GP2V empregado neste trabalho se agrupa com os isolados brasileiros não virulentos em modelo murino. Se comprovada, a capacidade desta amostra de

infectar os camundongos e ser transmitido verticalmente para sua prole, sem mortalidade ou morbidade, o estudo sinalizaria um exemplo de adaptação ao hospedeiro murino e o cenário perfeito para a manutenção do vírus na natureza.

Diversos trabalhos utilizando VACV em modelos animais têm sido publicados utilizando diferentes vias de inoculação, de acordo com o objetivo de estudo. Normalmente as infecções subcutâneas e intra-dermicas são observadas em estudos que visam reproduzir uma infecção localizada, como por exemplos, nas pesquisas que se propõem mimetizar em modelo murino a vacinação nos humanos (TSCHARKE *et al.*, 2002). A via intranasal ou intraperitoneal induz uma infecção sistêmica, e frequentemente são empregados em estudos de eliminação viral, tropismo, transmissão e patogenicidade (MARTINEZ *et al.*, 2000; ABDARHAMAN *et al.*, 2006). Estudos prévios sugerem que as infecções de roedores no campo podem acontecer pela ingestão ou aspiração de fezes contaminadas (Ferreira e Abrahão, 2008), o consumo de carcaças contaminadas ou consumo de comida contendo saliva de um animal infectado (Fenner, 1989; Abrahão, 2009). Levando em conta todos esses estudos e a padronização prévia dessa rota de infecção pelo nosso grupo, a via intranasal foi escolhida para o desenvolvimento desse trabalho.

Já foi demonstrado que o VACV-WR é capaz de infectar a placenta murina e dispersar verticalmente para o feto antes do nascimento, tanto com a inoculação intravenosa como a intraperitoneal (BENNINNG & HASSETT, 2004). Desta forma, o primeiro passo nesse estudo, foi avaliar se camundongos Balb/c grávidas infectadas com GP2V, poderiam transmitir o vírus para sua prole. Para isso, três desenhos experimentais foram avaliados: Balb/c grávidas com parto normal, Balb/c grávidas com cesariana e Balb/c lactante. Em todos os experimentos ficou comprovado que o GP2V é transmitido de mãe para filho no modelo escolhido. No entanto, várias hipóteses foram levantadas acerca da real via de transmissão, pois já é conhecida a capacidade do vírus de ser transmitido para animais adultos através de excretas ou outras secreções contaminadas (FERREIRA *et al.*, 2008b). Desta forma, a cesariana foi proposta para impedir que os fetos entrassem em contato com as excretas na gaiola ou com secreções potencialmente infectadas da mãe.

Durante o primeiro experimento, foram detectadas partículas virais infecciosas no estomago, e DNA viral no sangue e estomago dos filhotes nascidos de grávidas inoculadas no 14^o dpi, bem como no sangue e nas fezes das suas respectivas mães. Não foi possível detectar anticorpos neutralizantes nos ensaios de soroneutralização, pois possivelmente o tempo para a produção dos anticorpos neutralizantes foi insuficiente, ou o título de anticorpos produzidos foi muito baixo, pois os animais foram mantidos apenas seis dias após a infecção. Assim, como todos os outros experimentos propostos para esse trabalho não ultrapassaram muito mais do que uma semana, o ensaio não foi feito para os outros experimentos.

Com relação aos animais submetidos à cesariana *post-mortem*, a intermitência na detecção de DNA no sangue e fezes pode ter sido ocasionada por uma infecção menos eficiente, pois nos camundongos Balb/c macho com quatro semanas analisados individualmente, a detecção pode ser feita a partir do 1^o dpi em ambos os espécimes (COTA, 2012). Outra possível hipótese a ser avaliada é a capacidade de alguns animais terem conseguido eliminar a infecção viral antes de outros, impossibilitando a detecção viral. Também deve ser considerada a idade dos animais, visto que, os estudos que utilizando machos infectados com GP2V foram feitos com animais de quatro semanas e neste estudo todos os animais foram utilizados à partir da sexta semana de vida, devido a necessidade da maturidade sexual (COTA, 2012).

De fato, alguns estudos relatam a diferença na infecção de camundongos de sexo ou idade diferentes (Lima *et al.*, 2012). Machos e fêmeas de várias espécies como humanos, cavalos e roedores diferem na sua resposta a diversos vírus, incluindo HIV, HHV1, *Hantavirus*, *Hepatitis B virus*, Influenza virus, *Human herpes virus 3* e West Nile virus. Os mecanismos que estão por trás das diferenças entre os sexos são complexos e podem envolver fatores imunológicos, hormonais, comportamentais e genéticos (KLEIN *et al.*, 2011), entretanto mais estudos devem ser feitos para comprovar essa hipótese.

Para elucidar a questão levantada sobre a baixa frequência de amostras de sangue e fezes positivas na PCR, um experimento com fêmeas adultas (6-8 semanas), fora do estado de prenhez ou lactação foram inoculadas com a mesma dose de GP2V. Todos os quatro animais apresentaram resultados semelhantes aos

grupos de fêmeas em lactação ou grávidas. Esses dados sugerem a possibilidade desses animais responderem de forma diferente às infecções por GP2V.

Existem duas barreiras que separam os tecidos maternos da circulação sanguínea fetal. O sinciciotrofoblasto e as células endoteliais dos vasos sanguíneos fetal que permitem que os vírus sejam transportados causando a infecção do feto (revisado por YOUNES *et al.*, 2009). Assim, embora existam vários questionamentos que permeiam a baixa frequência de amostras de fezes e sangue positivas na PCR após a infecção de Balb/c fêmeas com GP2V foi possível detectar DNA em duas placentas e dois fetos, indicando uma infecção sistêmica e a transmissão vertical transplacentária.

Até o momento, em todos os experimentos citados utilizando grávidas, a infecção foi feita durante a gestação. A infecção dos animais após o parto teve como objetivo, verificar se a frequência de filhotes infectados se assemelhava com os dados obtidos filhotes nascidos de mães já infectadas. Assim, um grupo de seis animais lactantes com prole ente (2-5 dias) foi inoculado com GP2V e foram sacrificados em diferentes dias após a infecção. Neste experimento em todos os animais inoculados foi demonstrada a presença de DNA viral nas fezes e sangue, em praticamente todos os dias após a infecção. No entanto, em apenas dois filhotes a DNAemia foi detectada e nenhum estomago foi positivo, sugerindo que a transmissão horizontal não seja tão eficiente durante esse período.

De acordo com a literatura, o intestino dos camundongos é imaturo ao nascimento, mas sofrem um rápido crescimento e diferenciação. A absorção seletiva de imunoglobulinas maternas e imunocomplexos ocorrem no intestino de neonatos por causa da presença de receptores Fc nas células epiteliais do duodeno e jejuno proximal. A absorção não seletiva de macromoléculas por células epiteliais imaturas também ocorre, mas principalmente na parte distal do intestino delgado. Ambos os processos param com o surgimento das células epiteliais maduras. Este fenômeno é conhecido por “closure” do intestino e ocorre 14 dias após o nascimento nas espécies de camundongos. Assim, o intestino de camundongos neonatos, é um órgão totalmente diferente do adulto e essa diferença pode ser uma importante

característica no processo de infecção natural por alguns vírus (revisado por HAINAUT, 1983).

No que se refere à avaliação da presença de DNA viral, e partículas virais infecciosas, nas amostras de leite coletadas de Balb/c lactantes tratadas com ocitocina e metaclopramida, não houve amplificação de DNA viral e o isolamento tanto em célula BSC-40 quanto em MCA foi negativos para todos os pools coletados. Embora, a eliminação do vírus pelo do leite não tenha sido detectada, uma nova investigação deve ser realizada, pois a princípio, para que haja a infecção da glândula mamária através da rota de infecção escolhida (via intranasal), necessariamente deve haver uma viremia (ABRAHÃO, et al., 2009b). Como apenas 5 em 72 amostras de sangue ou fezes foram positivas na PCR, é possível que os animais não tenham se infectado eficientemente e portanto a infecção da glândula mamária não tenha ocorrido, justificando os dados encontrados. Entretanto o fato do vírus não infectar o tecido mamário e ser eliminado pelo leite ainda deve ser considerado.

Curiosamente, o experimento realizado com objetivo de analisar a transmissão horizontal de mães lactantes para seus filhotes, foi feito nas mesmas condições que o experimento proposto para analisar a transmissão através do leite. Ou seja, em ambos, as fêmeas foram inoculadas após o nascimento dos filhotes com a mesma dose de GP2V. Porém, no segundo experimento, as fêmeas foram estimuladas à lactação com ocitocina e metaclopramida e as amostras de leite também foram coletadas diariamente. As análises moleculares demonstraram, portanto, uma grande divergência. A detecção de DNA viral nos animais que não foram tratados com ocitocina e metaclopramida foi muito mais expressiva do que nos animais que foram tratados. Sem dúvida, novas análises devem ser feitas para comprovar se realmente existe essa relação. Além disso, os resultados obtidos com fêmeas fora do período de gravidez e lactação também não apresentaram DNA viral no sangue e fezes como observado para as fêmeas lactantes que não tiveram a lactação induzida, sugerindo que não exista de fato correlação entre a administração dessas drogas com o sucesso da multiplicação do vírus.

Os camundongos neonatos não se infectaram, ou não foi possível detectar a infecção após a inoculação oral com $2,6 \times 10^6$ PFU. Nesse caso, talvez a dose

necessária para induzir uma infecção sistêmica tenha sido baixa e a realização de uma cinética da infecção detectaria a dose apropriada. Além disso, os dados são referentes à apenas um animal, demonstrando a necessidade de aumentarmos o *n* experimental para obtermos um dado estatisticamente significativo. Por fim, deve ser levada em consideração a possibilidade do GP2V não ser capaz de causar infecções em neonatos por via oral.

Como se pôde observar ao longo do trabalho, a impossibilidade da detecção de DNA viral no sangue ou fezes do modelo animal escolhido, sem dúvida dificultou as análises e interpretação dos resultados no que diz respeito à transmissão vertical ou pelo do leite. Uma vez que esse parâmetro vem sendo utilizado pelo grupo como marcador para infecção viral, principalmente para as amostras não virulentas em modelo murino, que não induzem sinais clínicos e poderiam servir como parâmetro para comprovar que o animal foi infectado. Uma alternativa para essas questões seria titular as alíquotas utilizadas para a infecção, logo após a inoculação. Esse procedimento garantiria que os inóculos não perderam a viabilidade durante as etapas de diluição ou sonicação que precedem a inoculação. Outra alternativa, seria utilizar uma das amostras que se agrupam com os isolados virulentos como controle, por exemplo o GP1V e WR, assim poderíamos avaliar também os sinais clínicos. Com isso, seria possível avaliar se esses animais respondem de forma diferente às infecções por Br-VACV seja por questão de idade, sexo ou simplesmente pela sua biologia individual.

Tomados em conjunto, os resultados indicam a existência de transmissão vertical via de GP2V em modelo murino. A detecção de DNA viral na placenta e no feto de camundongos infectados por via intranasal sugere que a transmissão pode ocorrer por via transplacentária, uma vez que as amostras foram obtidas cirurgicamente, impedindo o contato do feto com excretas ou secreções advindas da mãe que poderiam ser potencialmente infecciosas. Entretanto essa via parece não ser tão eficiente quanto à de outro vírus como HIV, *Hepatitis B virus*, *Hepatitis C virus*, *Human herpesvirus 3*, *Rubella virus*, *Human parvovirus B19* e *Human herpesvirus 5* (KOY, *et al.*, 2001). Adicionalmente, diferentes diluições dos espécimes previamente às reações de PCR foram realizadas apenas para os fetos. Essa estratégia teve

como objetivo impedir a atuação de possíveis inibidores, gerando resultado falso negativo, uma vez que esta reação ainda não está padronizada para a detecção de DNA viral em todos os tipos de tecidos murino. Contudo é possível que algumas amostras negativas frente à Nested- PCR para o gene *vgf* testadas nesse estudo, se revelem positivas após a padronização do processamento.

8-Conclusões

- O estudo indica a existência de transmissão vertical de GP2V em modelo murino, sugerindo que esta, se dê por via transplacentária, adicionando uma importante informação à gama de questões que permanecem desconhecidas, sobre como os br-VACV se mantêm na natureza.
- Camundongos Balb/c fêmeas entre seis a oito semanas de idade parecem responder de maneira diferente à infecção por GP2V quando comparados à Balb/c machos com quatro semanas de idade. A detecção de DNA viral avaliada por Nested-PCR para o gene *vgf* em amostras de sangue e fazes foi expressivamente mais baixa em relação aos estudos anteriores utilizando machos.
- A transmissão pelo leite utilizando esse modelo parece não ser uma via eficiente de transmissão de GP2V, entretanto novos estudos devem ser realizados, uma vez que a metodologia empregada para ordenha necessita de padronizações.

9-Referências

ABDALRHMAN, I., I. GURT e E. KATZ. Protection induced in mice against a lethal orthopox virus by the Lister strain of vaccinia virus and modified vaccinia virus Ankara (MVA). **Vaccine**, v.24, n.19, May 8, p.4152-60. 2006

ABRAHÃO, J.S., GUEDES, M.I.M., TRINDADE, G.S., FONSECA, F.G., CAMPOS, R.K., MOTA, B.E., LOBATO, Z.I.P., SILVA-FERNANDES, A.T., RODRIGUES, G.O.L., LIMA, L.S., FERREIRA, P.C.P., BONJARDIM, C.A., KROON, E.G. 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, 2009a.

ABRAHÃO, J.S., OLIVEIRA, T.M., CAMPOS, R.K., MADUREIRA, M.C., KROON, E.K., LOBATO, Z.I. Bovine vaccinia outbreaks: detection and isolation of vaccinia virus in milk samples. **Foodborne Pathogens and disease**. v.6, n.9, p.1141-1146, 2009b.

ABRAHÃO, J.S., SILVA-FERNANDES, A.T., LIMA, L.S., CAMPOS, R.K., GUEDES, M.I.M., COTA, M.M.G., ASSIS, F.L., BORGES, I.A., SOUZA-JÚNIOR, M.F., LOBATO, Z.I.P., BONJARDIM, C.A., FERREIRA, P.C.P., TRINDADE, G.S., KROON, E.G. Vaccinia Virus Infection in Monkeys, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, n.6, p.976-979, 2010.

AFONSO, P.P, SILVA, P.M., SHNELLRATH, L.C., JESUS, D.M., HU, J., YANG, Y., RENNE, R., ATTIAS, M., CONDIT, R.C., MOUSSATCHÉS, N., DAMASO, C.R. Biological characterization and next-generation genome sequencing of the 2 unclassified Cotia virus SPAn232 (*Poxviridae*). **Journal of Virology**. v.p., 2012

ARITA, I., HENDERSON, D.A. Monkeypox and whitepox viruses in West and Central Africa. **Bull. World Health Organ**. v.53, p.347-353, 1976.

BABIX, D., BENNETT, M., GETTY, B. Human cowpox 1969-93: a review based on 54 cases. *The British Journal of Dermatology*. v.5, p. 598-607, 1994.

BENNING, N., HASSETT, D.E. Vaccinia virus infection during murine pregnancy: a new pathogenesis model for **vaccinia fetal**. *Journal of Virology*. v.78, n.6, p.3133-3139, 2004.

BERKELMAM, R.L. Human Illness Associated with Use of Veterinary Vaccines. **Emerging Infections**. v.37, p.407-414, 2003.

BROYLES, S.S. Vaccinia virus transcription. *Journal of General Virology*. v.84, p. 2293-2303, 2003.

BRUM, M.C.S., ANJOS, B.L., NOGUEIRA, C.E.W., AMARAL, L.A., WEIBLEN, R., FLORES, E.F. An outbreak of orthopoxvirus-associated disease in horse in southern Brazil. **J Vet Diagn Invest**, v.22, p.143-147, 2010.

CAMPE, H., ZIMMERMANN, P., GLOS, K., BAYER, M., BERGEMANN, H., DREWECK, C., GRAF, P., WEBER, B.K., MEYER, H., BUTTNER, M., BUSCH, U., SING, A. Cowpox Virus Transmission from Pet Rats to Humans, Germany. **Emerging Infectious Disease**, v.15, n.5, p.777-780, 2009.

CAMPOS, M.A.S. & KROON, E.G. Critical period of irreversible block of VACV replication. **Review Microbiology**, 1993.

CAMPOS, R.K., BRUM, M.C.S., NOGUEIRA, C.E.W., DRUMOND, B.P., ALVES, P.A., SIQUEIRA-LIMA, L., ASSIS, F.L., TRINDADE, G.S., BONJARDIM, C.A., FERREIRA, P.C., WEIBLEN, R., FLORES, E.F., KROON, E.G., ABRAHÃO, J.S. Assessing the variability of Brazilian Vaccinia virus isolates from a horse exanthematic lesion: coinfection with distinct viruses. **Arch Virol**, 2010.

CONDIT, R.C. Principles of Virology. In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. Lippincott Williams & Wilkins, 5ª edição: 2007.

CONO, J., CASEY, C.G., BELL, D.M. **Smallpox vaccination and adverse reactions**. Guidance for clinicians. MMWR Recomm Rep. CDC. v.52, p.1-28, 2003.

COTA, M.M.G. Co-infecção utilizando amostras GP1V e GP2V em modelo murino. Dissertação apresentada ao Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas **ICB**, da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, 2012

CYRKLAFF, M., RISCO, C., FERNÁNDEZ, J.J., JIMÉNEZ, M.V., ESTÉBAN, M., BAUMEISTER, W., CARRASCOSA, J.L. Cryo-electron tomography of vaccinia virus. **PNAS**. v.102, n.8, p.2772-2777, 2005.

DAMASO, C.R.A., ESPOSITO, J.J., CONDIT, R.C., MOUSSATCHÉ, N. Na Emergent Poxvirus from Human and Cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo Virus May Derive from Brazilian Smallpox Vaccine. **Virology**, v.277, p.439-449, 2000.

DI GIULIO, D.B., ECKBURG, P.B. Human monkeypox: an emerging zoonosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v.4, p.15-25, 2004.

DOCEUL, V., HOLLINSHEAD, M., LINDER, L.V., SMITH, G.L. Repulsion of Superinfecting Virions: A Mechanism for Rapid Virus Spread. **Science**. v.327, p.873-876, 2010.

EGAN, C., KELLY, C.D., RUSH-WILSON, K., DAVIS, S.W., SAMSONOFF, W.A., PFEIFFER, H., MILLER, J., TAYLOR, J., CIRINO, N.M. Laboratory-Confirmed

Transmission of Vaccinia Virus Infection through Sexual Contact with a Military Vaccinee. **Journal of Clinical Microbiology**. v.42, n.11, p.5409-5411, 2004.

ESPOSITO, J.J., PLAMER, E.L., BORDEN, E.C., HARRISON, A.K., OBIJESKI, J.F., MURPHY, F.A. Studies on the poxvirus Cotia. **J. Gen. Virol.** v.47, n.1, p.37-46, 1980.

ESSBAUER, S., MEYER, H., PORSCH-OZCURUMEZ, M., PFEFFER, M. Long-lasting stability of vaccinia virus (orthopoxvirus) in food and environmental samples. **Zoonoses Public Health**. v.54, p.118–124, 2008.

ESTEBAN, D.J., BULLER, R.M.L. Ectromelia virus: the causative agent of mousepox. **Journal of General Virology**. v.86, p.2645-2659, 2005.

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

FENNER, F., WITTEK, R., DUMBELL, K. The orthopoxviruses. In: **Academic Press**, San Diego, CA, 1989.

FERREIRA, J.M.S., ABRAHÃO, J.S., DRUMOND, B.P., OLIVEIRA, F.M., ALVES, P.A., PASCOAL-XAVIER, M.A., LOBATO, Z.I.P., BONJARDIM, C.A., FERREIRA, P.C.P., KROON, E.G. Vaccinia virus: shedding and horizontal transmission in a murine model. **Journal of General Virology**, v.89, p.2986-2991, 2008b.

FERREIRA, J.M.S., DRUMOND, B.P., GUEDES, M.I.M.C., PASCOAL-XAVIER, M.A., ALMEIDA-LEITE, C.M., ARANTES, R.M.E., MOTA, B.E.F., ABRAHÃO, J.S., ALVES, P.A., OLIVEIRA, F.M., FERREIRA, P.C.P., BONJARDIM, C.A., LOBATO, Z.I.P., KROON, E.G. Virulence in Murine Model Shows the Existence of Two Distinct Population of Brazilian *Vaccinia virus* Strain. **PLOS ONE**, v.3, p.1-10, 2008a.

FONSECA, F. G., LANNA, M. C. S., CAMPOS, M. A. S., KITAJIMA, E. W., PERES, J.N., GOLGHER, R. R., FERREIRA, P. C. P., KROON, E. G. Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. **Arch Virol**, v.143, p.1171-1186, 1998.

FONSECA, F.G., SILVA, R.L.A., MARQUES, J.T., FERREIRA, P.C.P., KROON, E.G. The Genome of Cowpox Virus Contains a Gene Related to Those Encoding the Epidermal Growth Factor, Transforming Growth Factor Alpha and Vaccinia Growth Factor. **Virus Genes**. v.18, n.2, p.151-160, 1999.

FONSECA, F.G., TRINDADE, G.S., SILVA, R.L.A., BONJARDIM, C.A., FERREIRA, P.C.P., KROON, E.G. Characterization of a vaccinia-like virus isolated in a Brazilian Forest. **Journal of General Virology**, v.83, p.223-228, 2002.

GARDE, V., HARPER, D., FAIFCHOK, M.P. Tertiary contact vaccinia in a breastfeeding infant. **JAMA**. v.291, n.6, p.725-727, 2004.

GLEDHILL, A.W. Latent ectromelia. **Nature**. v. 20, p.196-298, 1962.

GOFF, A., TWENHAFEL, N., GARRISON, A., MUCKER, E., LAWLER, J., PARAGAS, J. In vivo imaging of cidofovir treatment of cowpox virus infection. **Virus research**. v. 128, p. 88-98, 2007.

GUARDER, J., JOHNSON, B.J., PADDOCK, C.D., SHIEH, W.J., GOLDSMITH, C.S., REYNOLDS, M.G., DAMON, I.K., REGNERY, R.L., ZAKI, S.R. Monkeypox Transmission and Pathogenesis in Prairie Dogs. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, n.3, p.426-431, 2004.

GUBSER, C., HUÉ, S., KELLAN, P., SMITH, G.L. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. **Journal of General Virology**. v.85, p. 105-117, 2004.

HAINAUT, P., FRANCOIS, C., CALBERG-BACQ, C.M., VAIRA, D., OSTERRIETH, P.M. Peroral infection of suckling mice with milk-borne mouse mammary tumor virus: uptake of the main viral antigens by the gut. **J. Gen. Virology**. v.64, p.2535-2548, 1983.

HENDERSON, D.A., INGLESBY, T.V., BARTLETT, J.G., ASCHER, M.S., EITZEN, E., JAHRLING, P.B., HAUER, J., LAYTON, M., MCDADE, J., OSTERHOLM, M.T., O'TOOLE, T., PARKER, G., PERL, T., RUSSELL, P.K., TONAT, K. Smallpox as a Biological Weapon: Medical and Public Health Management. **American Medical Association**. v.281, n.22, p.2127-2137, 1999.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). The big picture Book of Viruses: Poxviridae (<http://www.ncbi.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>).
KAREN, K. L., REYNOLDS, M., BRADEN, Z., LOU, G., BERNARD, N., PATTON, J., DAMON, I.K. Characterization of Acute-Phase Humoral Immunity to Monkeypox: Use of Immunoglobulin M Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Monkeypox Infection during the 2003 North American Outbreak. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v.12, n.7, p. 867-872, 2005.

KOY, H., ZHANG, J., PARRY, S., The Mechanisms of Placental Viral Infection. **Center for Research on Reproduction and Women's Health**. p.148-156, 2001.

KROON, E.K., MOTA, B.E., ABRAHÃO, J.S., FONSECA, F.G., TRINDADE, G.S. Zoonotic Brazilian **Vaccinia virus**: from field to therapy. **Antiviral Research**. v.92, n.2, p.150-163, 2011.

KURTH, A., WIBBELT, G., GERBER H. P., PETSCHAEELIS, A., PAULI, G., NITSCHKE, A. Rat-to-Elephantto-Human Transmission of Cowpox Virus. **Emerging Infectious Diseases**. v. 14, n.4, 2008.

LAWRENCE, R.M., LAWRENCE, R.A. Breast milk and infection. **Clinics in Perinatology**. v.31, p.501-528, 2004.

LEDERMAN, E., MIRAMONTES, R., OPENSHAW, J., OLSON, V.A., KAREN, K.L., MARCINAK, J., PENARES, R., STAGGS, W., ALLEN, D., WEBER, S.G., VORA, S., GERBER, S.I, HUGES, C.M., REGNERY, R., COLLINS, L., DIAZ, P.S., REYNOLDS, M.G., DAMON, I. Eczema vaccinatum resulting from the transmission of vaccinia virus from a smallpox vaccinee: An investigation of potential fomites in the home environment. **Vaccine**. v. 27, p.375-377, 2009.

LEITE, J.A., DRUMOND, B.P., TRINDADE, G.S., LOBATO, Z.I.P., FONSECA, F.G., DOS SANTOS, J.R., MADUREIRA, M.C., GUEDES, M.I.C., FERREIRA, J.M.S., BONJARDIM, C.A., FERREIRA, P.C.P., KROON, E.G. Passatempo Virus a Vaccinia Virus Strain, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n.12, p.1935-1938, 2005.

LEVINE, R. S., PETERSON, A. T., YORITA, K. L., CARROL, D., DAMON, I. K., REYNOLDS, M. G. Ecological Niche and geographic distribution of human monkeypox in Africa. **Plos one**. v. 1, p. 176e, 2007.

LEWIS-JONES, S. Zoonotic Poxvirus Infection in Humans. Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

LIMA, B.H.F., Importância de CCR5 na Resposta Imune Murina em Machos e Fêmeas Após Infecção Intranasal por *Human herpesvirus 1*. Monografia apresentada ao Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas **ICB**, da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, 2012

LOBATO, Z.I.P., TRINDADE, G.S., FROIS, M.C.M., RIBEIRO, E.B.T., DIAS, G.R.C, TEIXEIRA, B.M., LIMA, F.A., ALMEIDA, G.M.F., KROON, E.K. Outbreak of exantemal disease caused by Vaccinia virus in human and cattle in Zona da Mata Region, Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. v.57, p. 423-429, 2005.

LOPES, O.S., LACERDA, J.P.G., FONSECA, I.E.M., CASTRO, D.P., FORATTINI, O.P., RABELO, E.X. Cotia virus: a new agent isolated from sentinel mice in São Paulo, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**. v.14, p.156–157, 1965.

LORICH, M.F., SMITH, S.B., BESSINGER, G.T., OLIVERE, J.W. Conjugal transfer vaccinia. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v.51, n.3, p.460-462, 2004.

LUDOULFO, T.M.O, REHFELD, I.S., FERREIRA, J.M., ABRAHÃO, J.S., CAMPOS, R.K., SANTOS, A.K.R., CERQUEIRA, M.M.O.P., KROON, E.K., LOBATO, Z.I.P. Vaccinia Virus Is Not Inactivated After Thermal Treatment and Cheese Production Using Experimentally Contaminated Milk. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.00, n.00, p.1-6, 2004.

MACFADDEN, G. Poxvirus Tropism. **Nature Reviews Microbiology**. v.3, p.201-213, 2005.

MAIBORODA, A.D. Experimental infection of Norwegian rats (*Rattus norvegicus*) with ratpox virus. **Acta Virologica**. v. 26, n.4, p.288-291, 1982.

MALKIN, A.J., MCPHERSON, A., GERSHON, P.D. Structure of intracellular mature Vaccinia virus visualized by in situ atomic force microscopy. **Jornal of Virology**. v.77, n.11, p.6332-6340, 2003.

MARQUES, J.T., TRINDADE, G.D., da FONSECA, F.G., SANTOS, J.S., BONJARDIM, C.A., FERREIRA, P.C.P., KROON, E.G. Characterization of ATI, TK and IFN- α/β R Genes in the Genome of the BeAn 58058 Virus, a Naturally Attenuated Wild Orthopoxvirus. **Virus Genes**. v. 3, p.291-301, 2001.

MARTINEZ, M. J., M. P. BRAY e J. W. HUGGINS. A mouse model of aerosol-transmitted orthopoxviral disease: morphology of experimental aerosol-transmitted orthopoxviral disease in a cowpox virus-BALB/c mouse system. **Arch Pathol Lab Med**, v.124, n.3, Mar, p.362-77. 2000.

MEYER, H., SCHAY, C., MAHNEL, H., PFEFFER, M. Characterization of orthopoxviruses isolated from man and animals in Germany. **Archives Virology**. v.144, p.491-501, 1999.

MOSS, B. Poxviridae: The Viruses and Their Replication. In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. Lippincott Williams & Wilkins, 5^o edição: 2007.

MOSS, B., WARD, B.M. High-speed mass transit for poxviruses on microtubules. **Nature Cell Biology**. v.3, p. 245-246, 2001.

MOTA, B.E.F., TRINDADE, G.S., DINIZ, T.C., DA SILVA-NNES, M., BRAGA, E.M., URBANO-FERREIRA, M., RODRIGUES, G.O.L., BONJARDIM, C.A., FERREIRA, P.C.P., KROON, E.G. Seroprevalence of orthopoxvirus in an Amazonian rural village, Acre, Brazil. **Arch Virol**, v.155, n.7, p.1139-1144, 2010.

MUZNY, C.A., KING, H., BYERS, P., CURRIER, M., NOLAN, R., MENA, L. Vulvar vaccinia infection after sexual contact with a smallpox vaccinee. **The American Journal of the Medical sciences**. v.337, n.4, p.289-29, 2009.

NAGASSE-SUGAHARA, T.K., KISIELIUS, J.J., UEDA-ITO, M., CURTI, S.P., FIGUEIREDO, C.A., CRUZ, A.S., SILVA, M.M.J., RAMOS, C.H., SILVA, M.C.C., SAKURAI, T., SALLES-GOMES, L.F. Human Vaccinia-Like virus outbreaks in São Paulo and Goiás states, Brazil: Viurs detection, isolation an identification. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**. v. 46, n.6, p.315-322, 2004.

NALCA, A., RIMOIN, A.W., BAVARI, S., WHITEHOUSE, C.A. Reemergence of Monkeypox: Prevalence, Diagnostics, and Countermeasures. **Clinical Infectious Diseases**, v.41, p.1766-1771, 2005.

NINOVE, L., DOMART, Y., VERVEL, C., VOINOT, C., SALEZ, N., RAOULT, D., MEYER, H., CAPEK, I., ZANDOTTI, C., CHARREL, R. N., Cowpox Virus Transmission from Pet Rats to Humans, France. **Emerging Infectious Diseases**. v. 15, n.5, p. 781-784, 2009.

OKEOMA, C.M., HUEGEI, A.L., LINQAPPA, J., FELDMAN, M.D., ROSS, S.R. APOBEC3 proteins expressed in mammary epithelial cells are packaged into retroviruses and can restrict transmission of milk-borne virions. **Cell Host & Microbes**. v.8, n.6, p.534-543, 2010.

PAHLITZSCH, R., HAMMARIN, A., WIDELL, A. A case of facial cellulitis and necrotizing lymphadenitis due to cowpox virus infection. **Clinical Infectious Diseases**. v.43, p. 737-742, 2006.

SARKAR, J.K., MITRA, A.C., MUKHERJEE, DE, S.K. Virus excretion in smallpox. **Bull. Org. mond. Sant.** v. 48, p.523-527, 1973.

SCHATZMAYR, H.G., COSTA, R.V.C., GONÇALVES, M.C.R., D'ANDRÉA, P.S., BARTH, O.M. Human and animal infections by vaccinia-like viruses in the state of Rio de Janeiro: A novel expanding zoonosis. **Vaccine**. 2011

SENKEVICH, T.G., WARD, B.M., MOSS, B. Vaccinia Virus Entry into Cells Is Dependent on a Virion Surface Protein Encoded by the A28L Gene. **Journal of Virology**. v.78, n.5, p. 2357-2366, 2004.

SHCHELKUNOV, S.N., TOTMENIN, A.V., SAFRONOV, P.F., MIKHEEV, M.V., GUTOROV, V.V., RYAZANKINA, O.I., PETROV, N.A., BABKIN, I.V., UVAROVA, E.A., SANDAKHCHIEV, L.S., SISLER, J.R., ESPOSITO, J.J., DAMON, I.K., JAHRLING, P.B., MOSS, B. Analysis of the Monkeypox Virus Genome. **Virology**, v.297, p.172-194, 2002.

SILVA-FERNANDES, A.T., TRAVASSOS, C.E.P.F., FERREIRA, J.M.S., ABRAHÃO, J.S., ROCHA, E.S.O., VIANA-FERREIRA, F., DOS SANTOS, J.R., BONJARDIM, C.A., FERREIRA, P.C.P., KROON, E.G. Natural human infection with *Vaccinia virus* during bovine vaccinia outbreaks. **Journal of Clinical Virology**, v.44, p.308-313, 2008.

SINGH, R.K., HOSAMANI, M., BALAMURUGAN, V., BHANUPRAKASH, V., RASOOL, T.J., YADAV, M.P. Buffalopox: an emerging and re-emerging zoonosis. **Animal Health Research Reviews**. v. 8, n.1, p. 105-114, 2007.

SMITH, G.L., MCFADDEN, G. Smallpox: anything to declare? **Nat Rev Immunol**, v.2, p.521-529, 2002.

SMITH, G.L., MURPHY, B.J., LAW, M. Vaccinia virus Motility. **Annu. Rev. Microbiol.** v.57, p. 323-342, 2003.

TOGNOTTI, E. The eradication of smallpox, a success story for modern medicine and public health: What lessons for the future? **Journal of Infection in developing countries.** v.4,n.5, p. 364-266, 2010.

TOWNSLEY, A.C., SENKEVICH, T.G., MOSS, B. Vaccinia Virus A21 Virion Membrane Protein Is Required for Cell Entry and Fusion. **Journal of Virology.** v.79, n.15, p. 9458-9469, 2005.

TRINDADE, G.S., EMERSON, G.L., CARROLL, D.S., KROON, E.G., DAMON, I.K. Brazilian Vaccinia Viruses and Their Origins. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n.7, p.965-972, 2007.

TRINDADE, G.S., FONSECA, F.G., MARQUES, J.T., DINIZ, S., LEITE, J.A., DE BODT, S., PEER, Y.V.D., BONJARDIM, C.A., FERREIRA, P.C.P., KROON, E.G. Belo Horizonte virus: a vaccinia-like virus lacking the A-type inclusion body gene isolated from infected mice. **Journal of General Virology**, v.85, p.2015-2021, 2004.

TRINDADE, G.S., FONSECA, F.G., MARQUES, J.T., NOGUEIRA, M.L., MENDES, L.C.N., BORGES, A.S., PEIRÓ, J.R., PITUCO, E.M., BONJARDIM, C.A., FERREIRA, P.C.P., KROON, E.G. Araçatuba virus: A Vaccinialike virus Associated with infection in Human and Cattle. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.2, p.155-160, 2003.

TRINDADE, G.S., LOBATO, Z.I.P., DRUMOND, B.P., LEITE, J.A., TRIGUEIRO, R.C., GUEDES, M.I.M.C., DA FONSECA, F.G., DOS SANTOS, J.R., BONJARDIM, C.A., FERREIRA, P.C.P., KROON, E.G. Short Report: Isolation of Two *Vaccinia Virus* Strain From a Single Bovine Vaccinia Outbreak in Rural Area From Brazil: Implications on The Emergence of Zoonotic Orthopoxviruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.75, n.3, p.486-490, 2006.

TSCHARKE, D. C., P. C. READING e G. L. SMITH. Dermal infection with vaccinia virus reveals roles for virus proteins not seen using other inoculation routes. **J Gen Virol**, v.83, n.Pt 8, Aug, p.1977-86. 2002.

WOLFS, T.F.W., WAGENAAR, J.A., NIESTERS, H.G.M., OSTERHAUS, A.D.M.E. Rat-to-Human Transmission of Cowpox Infection. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.12, p.1495-1496, 2002.

YOUNES, A.S., CSIRE, M., KAPUSINSZKY, B., SZOMOR, K., TAKÁCS, M., BERENCSI, G. Heterogeneous pathways of maternal fetal transmission of human viruses (review). **Pathology oncology research.** v.15, n.3, p.451-465, 2009.