

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Microbiologia  
Laboratório de Virologia Comparada

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE GENES IMUNORREGULADORES (B18R, D9R E D10R)  
EM INFECÇÕES CAUSADAS POR AMOSTRAS DE VACCINIA VIRUS: UTILIZAÇÃO  
DE VÍRUS RECOMBINANTES COMO FERRAMENTA DE ANÁLISE.**

**Lorena Falabella Daher de Freitas**

Belo Horizonte  
2015

Lorena Falabella Daher de Freitas

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE GENES IMUNORREGULADORES (B18R, D9R E D10R)  
EM INFECÇÕES CAUSADAS POR AMOSTRAS DE VACCINIA VIRUS: UTILIZAÇÃO  
DE VÍRUS RECOMBINANTES COMO FERRAMENTA DE ANÁLISE.**

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

Coorientadora: Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

Belo Horizonte

2015

043

Freitas, Lorena Falabella Daher de.

Avaliação do papel de genes imunorreguladores (B18R, D9R E D10R) em infecções causadas por amostras de *Vaccinia virus*: utilização de vírus recombinantes como ferramenta de análise. [manuscrito] / Lorena Falabella Daher de Freitas. – 2015.

197 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca. Coorientadora: Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. *Orthopoxvirus*. 3. Vírus Vaccinia. 4. Imunomodulação. I. Fonseca, Flávio Guimarães da. II. Stancioli, Edel Figueiredo Barbosa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579

ole



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE LORENA FALABELLA DAHER DE FREITAS  
Nº REGISTRO: 2011743898

**Suplente interno:** Profa. Giliane de Souza Trindade

**Suplente externo:** Dra. Bárbara Resende Quinan

Às 14:00 horas do dia 29 de outubro de 2015, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Danilo Bretas de Oliveira (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Bruno Eduardo Fernandes Mota (Farmácia - UFMG), Jaqueline Germano de Oliveira (Centro de Pesquisas René Rachou), Betania Paiva Drumond (Universidade Federal de Juiz de Fora/MG) e o Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Orientador, para julgar o trabalho final "**Avaliação do papel de genes imunorreguladores (B18R, D9R e D10R) em infecções causadas por amostra de Vaccinia virus: utilização de vírus recombinantes como ferramenta de análise**", da aluna Lorena Falabella Daher de Freitas, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Paulo César Peregrino Ferreira - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 29 de outubro de 2015.

Dra. Danilo Bretas de Oliveira

Dr. Bruno Eduardo Fernandes Mota

Dra. Jaqueline Germano de Oliveira

Dra. Betania Paiva Drumond

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca (Orientador)

Prof. Paulo César Peregrino Ferreira  
Coordenador

Prof. Paulo Cesar Peregrino Ferreira  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia/ICB/UFMG

*“A ciência sem religião é aleijada; a religião sem ciência é cega”*

*Albert Einstein*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Ao Flávio, pela orientação, pela agradável convivência e por acreditar no meu potencial me presenteando com esse projeto. Obrigada por todos esses anos de parceria. Sentirei saudades.

À minha co-orientadora, Edel, por todos os ensinamentos compartilhados. Obrigada por estar sempre disponível.

Ao meu orientador durante o doutorado sanduíche, Bernard Moss. Não tenho palavras para descrever tudo o que aprendi durante esse período em seu laboratório. Obrigada por me acolher tão bem.

Aos pesquisadores Jaqueline Germano, Jônatas Abrahão, Bruno Mota e Betânia Drumond, membros da banca, pelas sugestões que enriquecerão este trabalho.

Aos meus antigos orientadores que me serviram de exemplo e me iniciaram no caminho da Ciência.

À minha vovó Dirce pelo amor e exemplo de vida.

Aos meus pais por me permitirem chegar até aqui. Obrigada pelo carinho, dedicação total, paciência e incentivo.

Aos meus irmãos por tornarem a minha vida mais bela e menos solitária. Té, obrigada pelo companheirismo todos esses anos.

Ao Rafael, meu amor, por estar sempre ao meu lado me incentivando em todos os momentos. Obrigada por colaborar neste projeto. Sem você tudo seria muito mais difícil.

À minha segunda família por me acolherem como filha.

Aos meus colegas de laboratório pela agradável convivência diária, pelas contribuições e pela amizade. Contem comigo para sempre. Obrigada por tornarem meus dias mais leves.

À Tânia Mara, pelos cuidados de mãe e por me defender sempre!

Aos amigos do lab. Vírus por toda ajuda, alegria e aprendizado.

Aos meus amigos de departamento por tornarem essa caminhada mais agradável. Obrigada pelas fofocas no corredor, pelos longos e divertidos almoços na cantina e pela companhia durante todas as matérias cursadas. Flavinha, você mudou de departamento, mas está incluída neste parágrafo viu? Obrigada pelas risadas diárias.

Aos amigos conquistados durante o doutorado sanduíche. Vocês contribuíram para o melhor ano da minha vida. Obrigada José, sem você eu não teria aguentado até o fim.

Aos meus amigos da biologia. Obrigada a todos que compartilharam comigo os quatro anos mais fantásticos da minha vida. Em especial, muito obrigada, Má, Lice, Rê, pela amizade sincera, pelos consolos nas horas difíceis, pelas viagens deliciosas, pelas noites de buraco e fofoca, enfim, por fazerem parte da minha vida.

Às minhas amigas de escola. Obrigada Lena, Livia, Má e Jú por todos esses anos de convívio. Sem vocês, com certeza a minha vida teria menos graça. Amo muito vocês.

À todos do Departamento de Microbiologia pelos serviços prestados e pela convivência amigável.

Às agências financiadoras de pesquisa que investiram no meu trabalho e formação acadêmica.

E finalmente, à UFMG, que me fez sentir em casa durante esses vários anos de estudo.

## RESUMO

Os *Orthopoxvirus* fazem parte da família *Poxviridae* que compreende vírus grandes e complexos que possuem um genoma de DNA linear de dupla fita e se multiplicam no citoplasma da célula hospedeira. Para escapar da resposta imune do hospedeiro, os OPXV possuem genes que codificam proteínas de evasão imune. Esses vírus possuem como alvo muitos mediadores da imunidade inata incluindo IFNs, TNFs, interleucinas (IL), sistema do complemento e quimiocinas, além disso, interferem em várias vias de sinalização celular. O vírus MVA, um OPXV, foi obtido através de mais de 500 passagens sucessivas do vírus corioalantóide *Vaccinia Ankara* (CVA) em culturas de fibroblasto de embrião de galinha (CEF). Após essas passagens o MVA perdeu cerca de 15% do seu genoma parental e se tornou incapaz de se multiplicar produtivamente na maioria das linhagens celulares de mamíferos e por isso ele é um excelente candidato a vetor vacinal. O delineamento dos genes imunomoduladores que estão ausentes na amostra MVA é essencial para o entendimento, de uma forma global, da interação dos VACV com a resposta antiviral do hospedeiro. Pois, mesmo sabendo que a segurança e eficácia do MVA como vetor vacinal são bem estabelecidas, a base genética que define essas características ainda não é bem entendida. Como o MVA foi gerado a partir de um processo de atenuação em que os genes foram deletados de forma aleatória, ao se estudar esses genes isoladamente podemos entender quais papéis exercem na virulência da amostra viral e utilizar esses conhecimentos para produzir, de uma maneira mais racional, novos vetores virais através da deleção de genes específicos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel dos genes B18R (receptor solúvel dos IFN tipo I), D9R e D10R (enzimas que removem o cap 5' do mRNA) através da caracterização “in vitro” de diferentes construções dos vírus *Western Reserve* (WR) e MVA expressando ou não esses genes, além de comparar a imunogenicidade desses vírus em modelo murino. A inativação dos sítios catalíticos das enzimas D9 e D10 do vírus MVA, além de atrasar a transição entre os estágios precoces e tardios do ciclo viral e a interrupção da síntese proteica celular, causa um acúmulo de dsRNA principalmente nas células BS-C-1 infectadas pelo vírus duplo mutante. Esse acúmulo é capaz de ativar vias de sinalização celular que vão desencadear a resposta antiviral interrompendo principalmente a síntese de proteínas na célula infectada e estimulando a produção de IFN tipo I. Provavelmente o MVAD9muD10mu construído neste trabalho é mais imunogênico que a amostra original, sendo, portanto, um bom candidato para vetor vacinal. Quanto ao gene B18R nenhuma alteração de virulência ou fenótipo de placas foi notada nas amostras MVA contendo ou não o



gene. Além disso, a inserção do gene B18R também não causou alterações significativas na ativação das células dendríticas e dos linfócitos T e B. Com relação ao vírus WR a deleção causou uma redução significativa na virulência da amostra WR $\Delta$ B18 quando comparada a amostra original e dentro dos parâmetros analisados podemos concluir que a ausência da proteína B18 no vírus WR causa uma maior ativação das DC e uma menor ativação de linfócitos B e T.

Palavras-chave: *Orthopoxvirus*. MVA. Genes imunomoduladores. Vetor vacinal.

## ABSTRACT

The *Orthopoxvirus* (OPXV) are part of the Poxviridae family comprising large, complex viruses having double-stranded DNA genomes and with viral multiplication taking place in the cytoplasm of the host cell. In order to escape host immune responses, the OPXV have genes encoding immune evasion proteins. These viruses block or interfere with many innate immunity mediators including IFNs, TNFs, interleukins (IL), the complement system, chemokines, as well as different cell signaling pathways. The MVA virus, an OPXV, was obtained after more than 500 successive passages of the chorioallantoic virus Vaccinia Ankara (CVA) in cultures of chicken embryo fibroblasts (CEF). Following these passages the MVA lost about 15% of its parental genome and became unable to replicate productively in most mammalian cell lines. This makes MVA an excellent vaccine vector candidate. To determine and explore the immunomodulatory genes that are missing in the MVA, it is essential to completely understand the interaction between VACV and the host antiviral response. Even though the safety and efficacy of the MVA as a vaccine vector are well established, the genetic basis that defines these features are not totally known. Since the MVA was generated through an attenuation process by random deletion, studying each gene individually would allow us to better understand its role in virulence. This knowledge would enable the development of new viral vectors in a more rational way, through specific gene deletion. Thus, the aim of this work was to evaluate the role of the genes B18R (soluble type I IFN receptor), D9R and D10R (mRNA decapping enzymes) by in vitro characterization of different constructions of the Western Reserve (WR) and MVA expressing or not those genes. We also aimed to compare the immunogenicity of these viruses in a murine model of infection. We observed that the inactivation of the catalytic sites of the enzymes D9 and D10 of the MVA virus delayed the transition between the early and late stages of the viral cycle. Furthermore, the interruption of cellular protein synthesis caused a buildup of dsRNA in BS-C-1 cells infected by the double mutant virus. This build-up led to the activation of cell signaling pathways, triggering the antiviral response that primarily disrupts protein synthesis in infected cells and stimulates the production of type I IFN. It could be possible that the MVAD9muD10mu engineered here is more immunogenic than the original sample, and therefore a good vaccine vector candidate. We saw no changes in virulence or plaque phenotype between the MVA samples that carried or lacked the B18R gene. In addition, the insertion of the B18R gene did not cause significant changes in the activation of dendritic cells and lymphocytes. With respect to the virus WR, the deletion caused a significant decrease in

virulence of the WR $\Delta$ B18 sample when compared to the original virus. Based on the results obtained from the analyzed parameters we can conclude that the absence of the protein B18 in the WR virus leads to an increase in DC activation and a reduction in the activation of T lymphocytes and B cells.

Keywords: *Orthopoxvirus*. MVA. Immunomodulatory genes. Vaccine vector.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – Morfologia da partícula viral dos <i>Orthopoxvirus</i> .....	25
<b>FIGURA 2</b> – Representação esquemática do genoma dos <i>Orthopoxvirus</i> .....	26
<b>FIGURA 3</b> – Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos <i>Orthopoxvirus</i> .....	28
<b>FIGURA 4</b> – Eletromicrografia de transmissão de IMV, IEV e EEV.....	30
<b>FIGURA 5</b> – Estratégia de vacinação contra varíola.....	31
<b>FIGURA 6</b> – Infecção causada pelo <i>Monkeypox virus</i> .....	33
<b>FIGURA 7</b> – Figura esquemática representando a origem da amostra MVA.....	40
<b>FIGURA 8</b> – Representação esquemática de algumas proteínas imunomoduladoras codificadas pelos poxvírus.....	50
<b>FIGURA 9</b> – Construção do vírus MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10.....	74
<b>FIGURA 10</b> – Construção do vírus MVAD9D10rev.....	75
<b>FIGURA 11</b> – Construção do vírus MVAD9muD10mu.....	77
<b>FIGURA 12</b> - Construção do vírus MVA $\Delta$ B18.....	79
<b>FIGURA 13</b> - Construção do vírus MVAB18rev.....	80
<b>FIGURA 14</b> – Construção do vírus MVAB18.....	82
<b>FIGURA 15</b> – Representação esquemática do plasmídeo pZippy-NEO/GUS.....	83
<b>FIGURA 16</b> – Representação da construção do vírus WR $\Delta$ B18.....	90
<b>FIGURA 17</b> – Infecções intranasal e intradérmica.....	99
<b>FIGURA 18</b> – Estratégia utilizada para análise das subpopulações e do perfil de ativação dos linfócitos T e B e das células NK.....	104

<b>FIGURA 19</b> – Estratégia utilizada para análise das subpopulações e do perfil de ativação das células dendríticas.....	105
<b>FIGURA 20</b> – Amplificação dos fragmentos utilizados nas construções dos vírus MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10, MVAD9D10rev e MVAD9 $\mu$ D10 $\mu$ .....	108
<b>FIGURA 21</b> – Rodadas de seleção dos vírus MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10, MVAD9D10rev e MVAD9 $\mu$ D10 $\mu$ .....	110
<b>FIGURA 22</b> – Verificação da contaminação dos clones com os vírus parentais.....	111
<b>FIGURA 23</b> – Ensaio de placa dos vírus MVA, MVAD9D10rev e MVAD9 $\mu$ D10 $\mu$ .....	112
<b>FIGURA 24</b> – Curvas de ciclo único e de crescimento dos vírus MVAD9D10rev e MVAD9 $\mu$ D10 $\mu$ .....	114
<b>FIGURA 25</b> - Expressão das proteínas virais em diferentes linhagens celulares.....	117
<b>FIGURA 26</b> – Microscopia eletrônica de transmissão de células infectadas com os vírus MVAD9D10rev e MVAD9 $\mu$ D10 $\mu$ .....	118
<b>FIGURA 27</b> – Fosforilação de PKR, eIF2 $\alpha$ e IRF3 nas células BS-C-1 infectadas com os vírus MVAD9D10rev e MVAD9 $\mu$ D10 $\mu$ .....	120
<b>FIGURA 28</b> – Acúmulo de dsRNA nas células infectadas com os vírus MVAD9D10rev e MVAD9 $\mu$ D10 $\mu$ .....	121
<b>FIGURA 29</b> – Produção de dsRNA nas células infectadas com os vírus MVAD9D10rev e MVAD9 $\mu$ D10 $\mu$ .....	122
<b>FIGURA 30</b> – Expressão do dsRNA nas células infectadas com os vírus MVAD9D10rev e MVAD9 $\mu$ D10 $\mu$ .....	123
<b>FIGURA 31</b> – Amplificação dos fragmentos utilizados nas construções dos vírus MVA $\Delta$ B18, MVAB18rev, MVAB18 e WR $\Delta$ B18.....	125
<b>FIGURA 32</b> – Rodadas de seleção dos vírus MVA $\Delta$ B18, MVAB18rev e MVAB18.....	127

<b>FIGURA 33</b> – Verificação da contaminação dos clones com os vírus parentais.....	128
<b>FIGURA 34</b> – Detecção da expressão proteína B18 pelos vírus MVA, MVAB18rev, MVA1B e WR.....	130
<b>FIGURA 35</b> – Ensaio de placa dos vírus MVA, MVA $\Delta$ B18, MVAB18rev, MVAB18, WR e WR $\Delta$ B18.....	131
<b>FIGURA 36</b> – Ensaio funcional do receptor B18.....	133
<b>FIGURA 37</b> – Curvas de ciclo único dos vírus MVA, MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18, MVAB18, WR e WR $\Delta$ B18.....	135
<b>FIGURA 38</b> – Sinais clínicos dos animais infectados com os vírus WR e WR $\Delta$ B18 no oitavo dia p.i.....	137
<b>FIGURA 39</b> – Variação de peso dos animais infectados pela via intranasal com os vírus MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18, MVAB18, WR e WR $\Delta$ B18.....	138
<b>FIGURA 40</b> – Avaliação da produção de anticorpos totais anti-vaccinia.....	139
<b>FIGURA 41</b> – Avaliação da proteção.....	140
<b>FIGURA 42</b> – Frequência de células T CD4 <sup>+</sup> expressando a molécula CD69 no baço dos camundongos.....	142
<b>FIGURA 43</b> – Frequência de linfócitos T naive, efetores e de memória central no baço dos camundongos.....	143
<b>FIGURA 44</b> – Frequência de células T reguladoras no baço dos camundongos.....	144
<b>FIGURA 45</b> – Expressão das moléculas MHC-II e CD86 nas células B dos camundongos.....	145
<b>FIGURA 46</b> – Frequência das células dendríticas plasmocitóides e convencionais dos camundongos.....	146

<b>FIGURA 47</b> – Expressão da molécula CD40 nas células dendríticas plasmocitóides e convencionais dos camundongos.....	147
<b>FIGURA 48</b> – Expressão das moléculas CD80 e CD86 nas células dendríticas plasmocitóides e convencionais dos camundongos.....	148
<b>FIGURA 49</b> – Expressão de MHC-I e MHC-II nas células dendríticas plasmocitóides e convencionais dos camundongos.....	150

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA I</b> - Classificação da família <i>Poxviridae</i> .....	23
<b>TABELA II</b> - Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na construção do vírus MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10.....	73
<b>TABELA III</b> - Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na construção do vírus MVAD9D10rev.....	75
<b>TABELA IV</b> - Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na construção do vírus MVAD9muD10mu.....	76
<b>TABELA V</b> - Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na construção do vírus MVA $\Delta$ B18.....	78
<b>TABELA VI</b> - Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na construção do vírus MVAB18rev.....	80
<b>TABELA VII</b> - Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na construção do vírus MVAB18.....	81
<b>TABELA VIII</b> - Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na construção do vírus WR $\Delta$ B18.....	83
<b>TABELA IX</b> - Anticorpos utilizados nos ensaios de Western Blot.....	93
<b>TABELA X</b> – Relação dos anticorpos usados para a imunofenotipagem dos esplenócitos.....	102
<b>TABELA XI</b> – Resultados obtidos no contador de vírus.....	116
<b>TABELA XII</b> – Frequência das populações celulares no baço dos animais infectados e no grupo controle.....	141



## LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APC	Célula apresentadora de antígeno
AraC	Citosina-arabinosídeo
BSA	Albumina sérica bovina
CEF	Culturas de fibroblasto de embrião de galinha
CEV	Vírus envelopado associado à célula
CMC	Carboximetilcelulose
CPXV	<i>Cowpox virus</i>
CTL	Linfócito T citotóxico
CVA	Corioalantóide <i>Vaccinia</i> Ankara
DC	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DMEM	Meio mínimo Eagle modificado por Dulbecco
dsRNA	RNA de fita dupla
ECP	Efeito citopático
ECTV	<i>Ectromelia virus</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EEV	Vírus envelopado extracelular
EGFP	Proteína verde fluorescente reforçada ( <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> )
EMC	Vírus da encefalomiocardite murina
HHV-1	<i>Human herpesvirus 1</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana ( <i>Human immunodeficiency virus</i> )
HSPV	<i>Horsepox virus</i>
IEV	Vírus envelopado intracelular
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IMV	Vírus maduro intracelular
i.d.	Inoculação intradérmica
i.n.	Inoculação intranasal
i.p.	Inoculação intraperitoneal
ITR	Repetições terminais invertidas
LB	Luria-Bertani
Log	Logarítmo
LST	<i>Lister</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
M.O.I	Multiplicidade de infecção
MPXV	<i>Monkeypox virus</i>
mRNA	RNA mensageiro
MVA	<i>Vaccinia Ankara</i> modificado
NK	Natural Killer

OMS	Organização Mundial de Saúde
OPXV	<i>Orthopoxvirus</i>
ORF	Matriz de leitura aberta
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimeras
PFU	Unidade formadora de placa
p.i.	Pós-infecção
PKR	Proteína cinase ativada por RNA
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Soro fetal bovino
TBE	Tris/Borato/EDTA
TLR	Receptor do tipo Toll ( <i>Toll like receptor</i> )
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptor de TNF
VACV	<i>Vaccinia virus</i>
VACV-COP	<i>Vaccinia Copenhagen</i>
VCP	Proteína controladora do complemento do <i>Vaccinia virus</i>
VARV	<i>Variola virus</i>
WR	<i>Western Reserve</i>

# SUMÁRIO

## INTRODUÇÃO

1. Família <i>Poxviridae</i> .....	22
2. Gênero <i>Orthopoxvirus</i> .....	23
2.1 Morfologia.....	24
2.2 Genoma.....	25
2.3 Ciclo de Multiplicação.....	26
2.4 A importância dos <i>Orthopoxvirus</i> .....	30
2.5 A patogênese das infecções por <i>Orthopoxvirus</i> .....	34
3. A utilização dos <i>Orthopoxvirus</i> como vetores vacinais.....	36
3.1 <i>Vaccinia Ankara</i> modificado.....	40
3.1.1 Genoma do MVA.....	42
4. Imunidade antiviral.....	45
5. Estratégias imunomoduladoras dos <i>Orthopoxvirus</i> .....	48
5.1 B18R.....	53
5.2 D9R e D10R.....	56
JUSTIFICATIVA.....	60
OBJETIVOS.....	64
MATERIAIS E MÉTODOS	
1. Estratégia de trabalho.....	67
2. Amostras virais.....	68
3. Células utilizadas para a expansão das amostras virais.....	68
3.1 Fibroblastos de Embrião de Galinha (CEF).....	68
3.2 Células BS-C-1, BS-C-40, BHK-21, HeLa e Vero.....	69
4. Multiplicação viral em cultura celular.....	69
5. Purificação viral.....	70
6. Titulação das amostras virais em cultura celular / Ensaio de placas.....	71

7. Imunomarcação.....	71
8. Construção dos fragmentos de interesse para a construção dos vírus MVA recombinantes.....	72
8.1 MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10.....	72
8.2 MVAD9D10rev.....	74
8.3 MVAD9muD10mu.....	75
8.4 MVA $\Delta$ B18.....	77
8.5 MVAB18rev.....	79
8.6 MVAB18.....	80
9. Construção dos fragmentos de interesse para a construção dos vírus WR $\Delta$ B18.....	82
10. Transformação de bactérias competentes.....	84
11. Verificação da presença do inserto por PCR.....	85
12. Obtenção de plasmídeo em pequena escala.....	85
13. Sequenciamento.....	85
14. Análise computacional das sequências.....	86
15. Construção dos vírus recombinantes.....	86
15.1 Geração dos vírus recombinantes.....	86
15.2 Seleção dos vírus recombinantes MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10 e MVA $\Delta$ B18.....	87
15.3 Seleção dos vírus recombinantes MVAD9D10rev, MVAD9muD10mu, MVAB18rev e MVAB18.....	88
15.4 Seleção dos vírus recombinantes WR $\Delta$ B18.....	89
15.5 Amplificação, purificação e titulação dos vírus recombinantes.....	90
16. Ensaios de infectividade viral.....	90
17. Ensaio de Western Blot para detecção de proteínas virais totais e da fosforilação de PKR, eIF2 $\alpha$ e IRF3.....	91
18. Microscopia Eletrônica de transmissão.....	93
19. Análise do dsRNA através da Microscopia Confocal.....	94
20. Contagem de partículas virais através do aparelho Virus Counter.....	95
21. Detecção da proteína B18 através do ensaio de Western Blot.....	95
22. Avaliação da atividade antiviral de IFN.....	97
23. Imunização dos animais.....	98

23.1 Camundongos.....	98
23.2 Infecção intranasal.....	98
23.3 Infecção intradérmica.....	99
23.4 Infecção intraperitoneal.....	99
24. Sangrias e obtenção do soro.....	100
25. Ensaio imunoenzimático para medida de anticorpos séricos específicos.....	100
26. Imunofenotipagem dos esplenócitos.....	101
27. Obtenção e análise dos dados no citômetro de fluxo.....	103
28. Análise estatística.....	103

## RESULTADOS

1. Obtenção dos diferentes fragmentos utilizados nas construções dos vírus MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10, MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu.....	107
2. Sequenciamento e análise das sequências (TOPO/ $\Delta$ D9 $\Delta$ D10, TOPO/D9D10rev e TOPO/D9muD10mu).....	109
3. Geração dos vírus recombinantes MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10, MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu.....	109
4. Ensaio de placa dos vírus MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu.....	112
5. Ensaio de infectividade viral.....	113
6. Detecção das proteínas virais por ensaio de Western Blot.....	114
7. Análise do ciclo viral através de microscopia eletrônica.....	116
8. Detecção da fosforilação de PKR, eIF2 $\alpha$ e IRF3 através do ensaio de Western Blot..	119
9. Visualização do acúmulo de dsRNA através da microscopia confocal.....	120
10. Obtenção dos diferentes fragmentos utilizados nas construções dos vírus MVA $\Delta$ B18, MVAB18rev, MVAB18 e WR $\Delta$ B18.....	124
11. Sequenciamento e análise das sequências (TOPO/ $\Delta$ B18, TOPO/B18rev, TOPO/B18 e pZippy-NEO/GUS/Flancos 1 e 2).....	126
12. Geração dos vírus recombinantes MVA $\Delta$ B18, MVAB18rev, MVAB18 e WR $\Delta$ B18.....	126
13. Verificação das construções dos vírus recombinantes através do Ensaio de <i>Western Blot</i> .....	129

14. Ensaio de placa dos vírus MVA, MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18, MVAB18, WR e WR $\Delta$ B18.....	130
15. Verificação da funcionalidade do receptor B18.....	132
16. Curvas de ciclo único dos vírus MVA, MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18, MVAB18, WR e WR $\Delta$ B18.....	134
17. Infecção experimental em camundongos BALB/c e avaliação da resposta imune....	135
17.1 Sinais clínicos apresentados pelos camundongos após infecção intranasal.....	136
17.2 Detecção de anticorpos séricos específicos.....	138
17.3 Avaliação da proteção induzida pelas amostras MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18 e MVAB18.....	139
17.4 Subpopulações celulares.....	140
17.5 Perfil de ativação celular.....	141
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>142</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>171</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>174</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>176</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>192</b>

# Introdução

---

## 1. Família *Poxviridae*

A família *Poxviridae* compreende grandes e complexos vírus de ácido desoxirribonucleico (DNA) que apresentam um sítio citoplasmático de multiplicação, diferentemente de outros vírus de DNA que se replicam no núcleo da célula (*Mclysaght, A., P. F. Baldi, et al., 2003*). Os membros desta família possuem um grande genoma de DNA linear de dupla-fita, variando de 130 Kb (gênero *Parapoxvirus*) a 375 Kb (gênero *Avipoxvirus*), e contêm enzimas que sintetizam o ácido ribonucleico (RNA) mensageiro viral, o que permite a sua replicação no citoplasma celular. Esses vírus expressam, dependendo da espécie, de 140 a 294 genes. Muitos desses genes codificam proteínas de interação com o hospedeiro, conferindo-lhes uma maior patogenicidade e a possibilidade de modular a resposta imune do hospedeiro. (*Hughes, A. L. e R. Friedman, 2005; Moss, B., 2007*).

Os poxvírus são divididos em duas subfamílias denominadas *Chordopoxvirinae* e *Entomopoxvirinae*, cujos membros infectam, respectivamente, vertebrados e insetos (**TABELA I**). A subfamília *Chordopoxvirinae* é ainda subdividida em dez gêneros: *Orthopoxvirus* (OPXV), *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Crocodylidpoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Yatapoxvirus* e *Cervidpoxvirus*. Existe uma única espécie caracterizada (*Squirrelpox virus*) que ainda não foi inserida em nenhum dos dez gêneros citados acima (*ICTV, 2014*). O gênero melhor caracterizado dessa subfamília é o OPXV, o qual inclui o *Variola virus* (VARV), agente etiológico da varíola, e o *Vaccinia virus* (VACV), protótipo do gênero utilizado na campanha de vacinação contra o VARV (*Lefkowitz, E. J., C. Wang, et al., 2006*).

Dentre os poxvírus apenas duas espécies são reconhecidas como patógenos humanos específicos, o VARV e o *Molluscum contagiosum virus* (gênero *Molluscipoxvirus*). Entretanto, outras espécies podem infectar seres humanos durante surtos zoonóticos como o *Tanapox virus* (gênero *Yatapoxvirus*), o *Pseudocowpox virus* e o *Orf virus* (gênero *Parapoxvirus*), além de três outras espécies de OPXV – *Monkeypox virus* (MPXV), *Cowpox virus* (CPXV) e VACV (*Moss, B., 2007*).



**TABELA I**  
**Classificação da família *Poxviridae***

<b>Subfamília</b>	<b>Gênero</b>	<b>Protótipo do gênero</b>
<b><i>Chordopoxvirinae</i></b>	<i>Avipoxvirus</i>	<i>Fowlpox virus</i>
	<i>Capripoxvirus</i>	<i>Sheeppox virus</i>
	<i>Cervidpoxvirus</i>	<i>Mule deerpox virus</i>
	<i>Crocodylidpoxvirus</i>	<i>Nile crocodilepox virus</i>
	<i>Leporipoxvirus</i>	<i>Myxoma virus</i>
	<i>Molluscipoxvirus</i>	<i>Molluscum contagiosum virus</i>
<b><u><i>Orthopoxvirus</i></u></b>	<b><u><i>Vaccinia virus</i></u></b>	
	<i>Parapoxvirus</i>	<i>Orf virus</i>
	<i>Suipoxvirus</i>	<i>Swinepox virus</i>
	<i>Yatapoxvirus</i>	<i>Yaba monkey tumor virus</i>
<b><i>Entomopoxvirinae</i></b>	<i>Alphaentomopoxvirus</i>	<i>Melolontha melolontha entomopoxvirus</i>
	<i>Betaentomopoxvirus</i>	<i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i>
	<i>Gammaentomopoxvirus</i>	<i>Chironomus luridus entomopoxvirus</i>

Fonte: Adaptado de ICTV 2014

## 2. Gênero *Orthopoxvirus*

As espécies do gênero OPXV possuem uma extrema importância na história das epidemias mundiais e seu estudo tem oferecido grandes contribuições para a comunidade científica.

O VARV é o agente etiológico da varíola, doença que matou mais pessoas ao longo da história do que qualquer outra doença infecciosa. Somente no século XX a varíola foi responsável por cerca de 300 a 500 milhões de mortes. Devido à sua gravidade (taxa de letalidade de até 30%) a varíola afligiu a população humana até a sua erradicação em 1977 graças as campanhas mundiais de vacinação organizadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) [Shchelkunov, S. N., 2011; Smithson, C., A. Purdy, et al., 2014; Theves, C., P. Biagini, et al., 2014]. Estas campanhas utilizaram o VACV, um OPXV filogeneticamente relacionado com o VARV, como amostra vacinal (Mcfadden, G, 2005; Lefkowitz, E. J., C. Wang, et al., 2006; Moss, B., 2007). O princípio

da vacinação utilizado já tinha sido introduzido 200 anos antes por Edward Jenner. Naquele tempo, Jenner descobriu que o contato prévio com o agente causador da doença conhecida como “cowpox”, que causava lesões na pele e nas mucosas da vaca e do seu ordenhador, poderia prevenir a infecção causada por VARV (*Damon, I. K., 2007*).

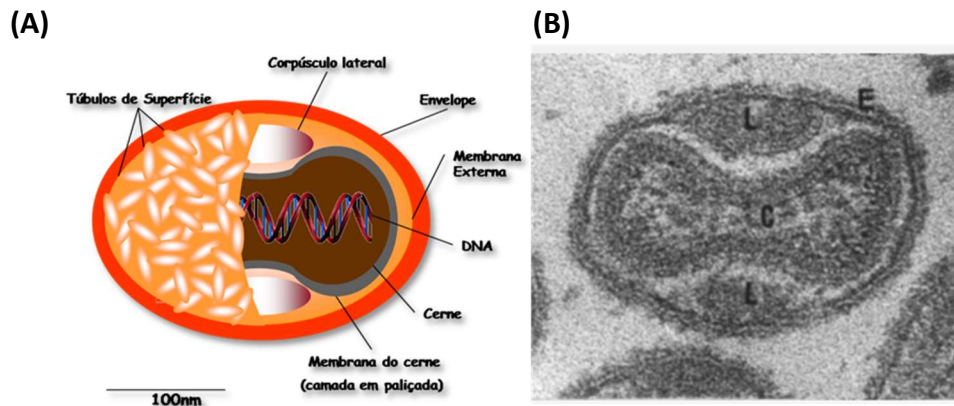
Além da sua relevância para a saúde pública, o VACV foi o primeiro vírus animal visto microscopicamente, multiplicado em cultura de tecido, titulado, purificado e quimicamente analisado (*Moss, B., 2007*).

## 2.1 Morfologia

Sob microscopia eletrônica os OPXV se apresentam como grandes partículas de forma ovoide ou retangular, com dimensões próximas a 200 x 320 nm (*Moss, B., 2007; Goldsmith, C. S., 2014*).

A partícula viral possui mais de cem polipeptídeos organizados em quatro estruturas distintas: cerne, corpúsculo lateral, membrana e envelope (**FIGURA 1**). A membrana é uma bicamada lipoproteica que contém proteínas de superfície, tubulares ou globulares, arrançadas irregularmente e envolve todo o cerne e os dois corpúsculos laterais. O cerne apresenta forma bicôncava, unilateralmente côncava ou cilíndrica e envolve o material genético, enzimas e fatores de transcrição de genes precoces (*Buller, R. M. e G. J. Palumbo, 1991*). Os corpúsculos laterais localizam-se nas concavidades do cerne. Já é sabido que eles são formados por pelo menos três proteínas (VH1, F17 e G4) e acredita-se que eles sejam responsáveis pela entrega de algumas dessas proteínas virais no citoplasma da célula, como é o caso da VH1 que inibe a resposta antiviral desencadeada pelo interferon (IFN) tipo II logo após a penetração do vírus (*Schmidt, F. I., C. K. Bleck, et al., 2013*).

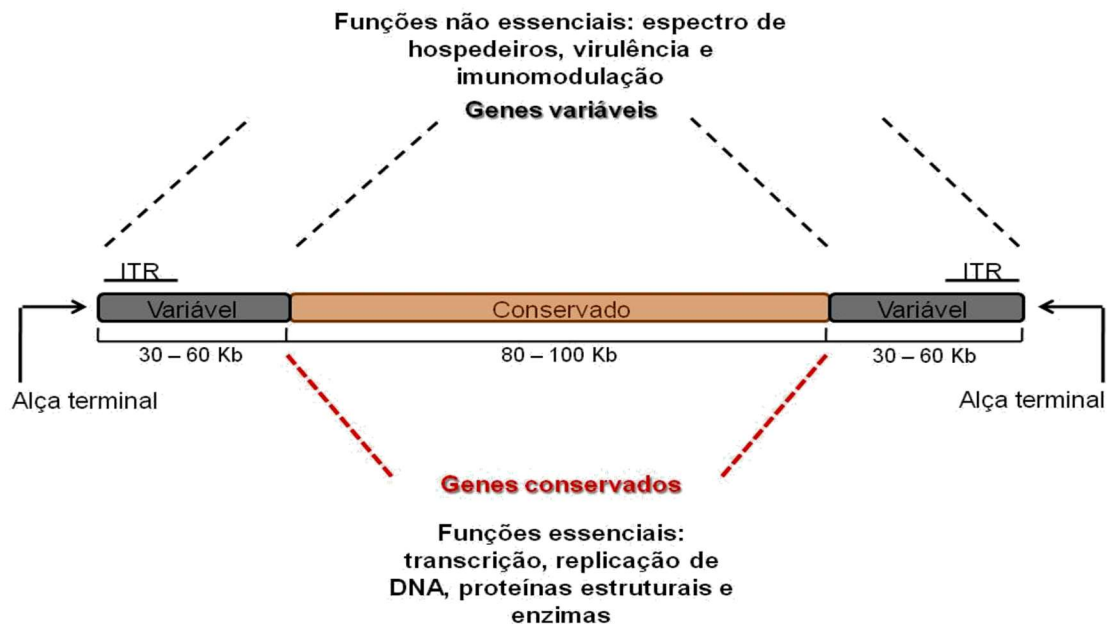
O vírus composto por um cerne nucleoproteico associado aos corpúsculos laterais e envolto por uma membrana já é infeccioso. Porém, alguns vírus adquirem uma bicamada lipídica adicional da célula hospedeira que recebe o nome de envelope. Tanto a membrana externa quanto o envelope desempenham um papel importante na interação do vírus com o hospedeiro (*Buller, R. M. e G. J. Palumbo, 1991*).



**FIGURA 1 - Morfologia da partícula viral dos *Orthopoxvirus*.** (A) Esquema representativo da estrutura de um típico OPXV. (B) Eletromicroscopia da estrutura intracelular de uma partícula madura de VACV, mostrando o cerne (C), os corpúsculos laterais (L) e a membrana externa (E). Fonte: adaptado de Fenner, F.; R. Wittek; et al, 1989; Moss, B., 2007.

## 2.2 Genoma

O genoma dos OPXV é constituído por uma fita dupla de DNA linear, não segmentada, variando de 170 a 240 Kb. Semelhante aos outros poxvírus, o genoma é covalentemente fechado em ambas as extremidades. A região central, altamente conservada, contém os genes estruturais e aqueles que codificam as enzimas responsáveis pela replicação do DNA viral e pela transcrição do RNA mensageiro (mRNA). As regiões terminais são variáveis entre as espécies e possuem genes que codificam principalmente proteínas envolvidas na interação patógeno-hospedeiro que inibem processos antivirais tais como apoptose, apresentação e reconhecimento de antígenos, funções do IFN e processos de sinalização da resposta imune. Por isso esses genes recebem a denominação de “genes de virulência” (ICTV, 2006; Lefkowitz, E. J., C. Wang, et al., 2006; Damon, I. K., 2007) [FIGURA 2]. Uma quantidade significativa desses genes de interação parece ter sido adquirida por meio da transferência horizontal a partir dos hospedeiros (Hughes, A. L. e R. Friedman, 2005).



**FIGURA 2 – Representação esquemática do genoma dos *Orthopoxvirus*.** O genoma dos OPXV possui, em média, 200 Kb. A região central do genoma é conservada e possui genes que codificam principalmente proteínas essenciais para a replicação viral, já as regiões terminais são mais variáveis e são constituídas por genes que codificam proteínas não essenciais para a replicação viral em cultura de células. A figura mostra ainda duas regiões terminais invertidas e repetidas (ITRs) localizadas nas porções variáveis do genoma. Fonte: adaptado de Smith, G. L. e G. Mcfadden, 2002.

Assim como todos os poxvírus, os membros desse gênero possuem regiões terminais invertidas (ITRs) que consistem em sequências repetidas idênticas, no entanto, orientadas de forma oposta. As ITRs são ricas em adenina/timina e possuem bases não pareadas que permitem a formação de alças covalentemente fechadas em ambas às extremidades do genoma (Lefkowitz, E. J., C. Wang, et al., 2006; Moss, B., 2007).

### 2.3 Ciclo de Multiplicação

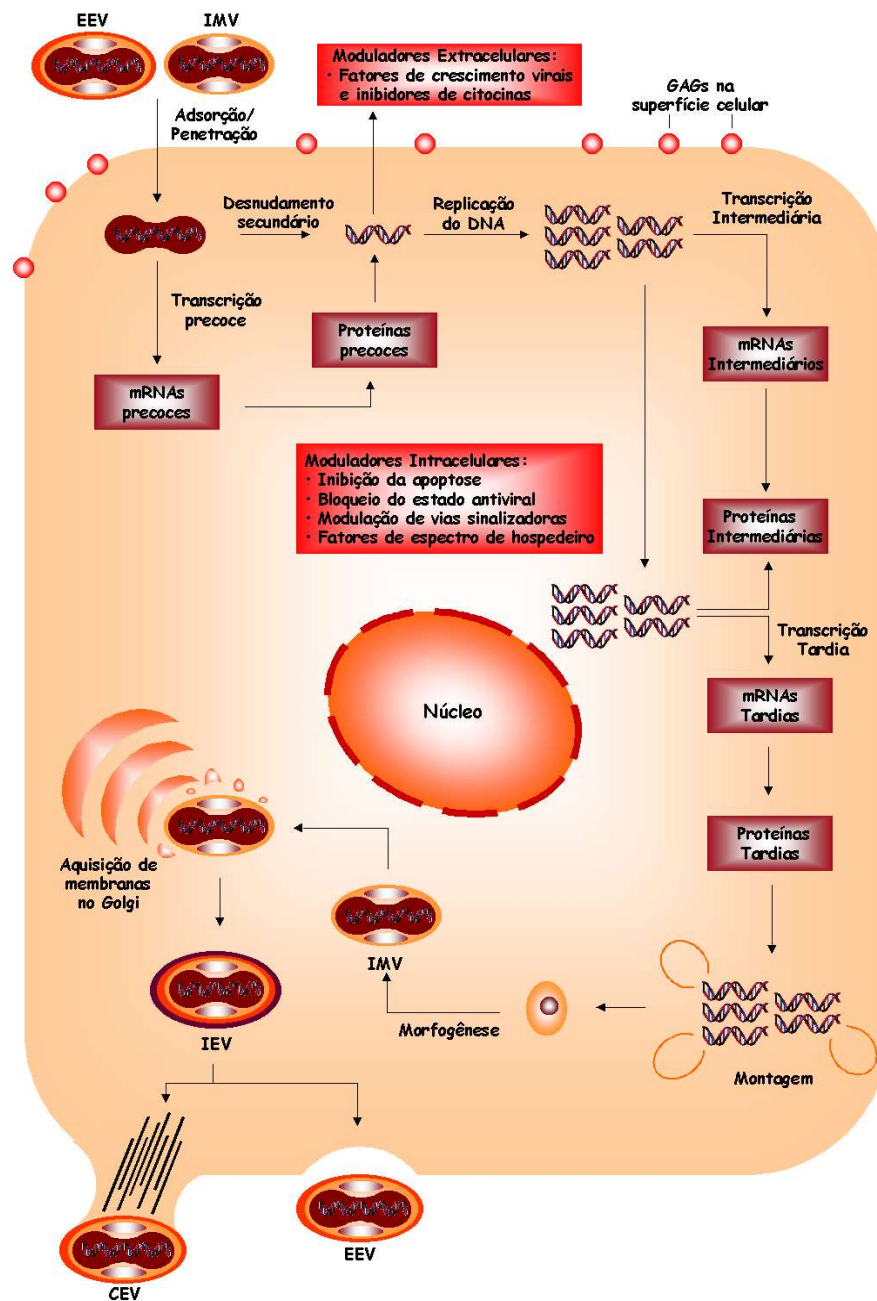
Uma característica que distingue os poxvírus de outros vírus de DNA é que o ciclo de multiplicação acontece inteiramente no citoplasma celular. Isso indica que os poxvírus evoluíram um alto nível de independência da célula hospedeira, especialmente nos processos de replicação do DNA e síntese de mRNA, uma vez que normalmente esses eventos ocorrem no núcleo (Minnigan, H. e R. W. Moyer, 1985; Broyles, S. S., 2003).

O ciclo de multiplicação dos OPXV é uma sequência complexa de eventos citoplasmáticos que se inicia com a adsorção da partícula viral à superfície celular e a subsequente fusão das

membranas do vírus e da célula hospedeira. O ciclo mais bem estudado é o do VACV, mas as características essenciais são bastante conservadas entre os outros vírus da família (*Mcfadden, G., 2005*) [FIGURA 3].

Dois tipos de partículas virais infecciosas - o vírus maduro intracelular (IMV) e o vírus envelopado extracelular (EEV) - podem iniciar o ciclo de multiplicação (*Mcfadden, G., 2005; Moss, B., 2006*). O IMV e o EEV diferem quanto as suas proteínas de superfície e ao número de membranas envoltórias (FIGURA 4). Pelo menos vinte proteínas estão associadas à membrana do IMV e outras seis proteínas estão associadas à membrana externa do EEV (*Moss, B., 2012*). Portanto, acredita-se que o IMV e o EEV se liguem a receptores distintos da célula hospedeira. Entretanto, apesar das diferenças na adsorção, hoje se sabe que somente a membrana da partícula IMV se funde com a membrana celular. As partículas EEV perdem seu envelope mais externo antes da penetração e, após essa perda, penetram na célula infectada através da fusão da membrana externa com a membrana citoplasmática da célula hospedeira (*Moss, B., 2007*).

Recentemente, foi visto que os poxvírus também podem penetrar na célula hospedeira através de macropinocitose mediada por receptor seguida da fusão do envelope viral com a membrana do endossomo formado (*Mercer, J. e A. Helenius, 2008; Schmidt, F. I., C. K. Bleck, et al., 2011*). Para os IMV, a endocitose pode prevenir o reconhecimento precoce pelo sistema imune do hospedeiro das proteínas virais deixadas na membrana celular durante a fusão (*Schmidt, F. I., C. K. Bleck, et al., 2012*). Novas evidências sugerem que as proteínas A25 e A26 do VACV funcionam como supressoras da entrada viral pela fusão e determinam vias de entrada na célula espécie-específica. Partículas IMV contendo ambas as proteínas funcionais não se fundem com a membrana plasmática e entram pela via endocítica, entretanto as partículas que não possuem essas proteínas penetram através da fusão do envelope com a membrana celular. Além, disso a rota de penetração escolhida pela partícula depende do tipo celular que está sendo infectado (revisado por *Moss, B., 2012*). Independentemente da via utilizada, a penetração do vírus libera o cerne viral no citoplasma celular e esse processo recebe o nome de desnudamento primário.



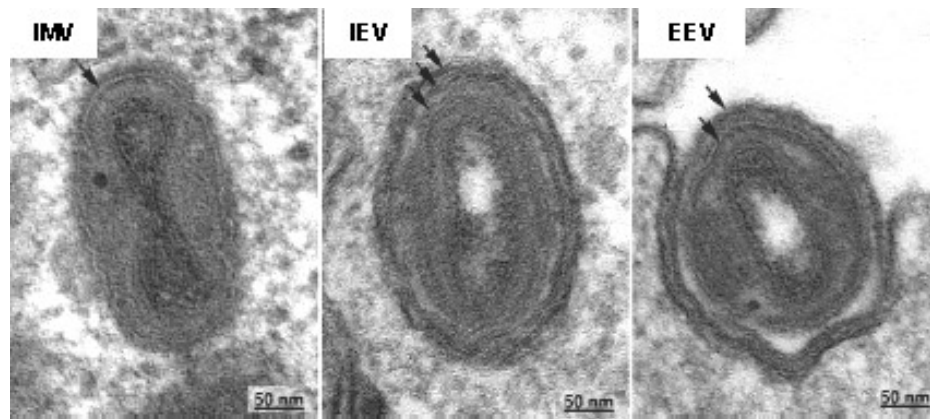
**FIGURA 3 – Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos *Orthopoxvirus*.** O ciclo se inicia com a adsorção viral. Em seguida ocorre a fusão entre as membranas viral e celular liberando o cerne dentro do citoplasma da célula. Após esse desnudamento primário ocorre a transcrição dos genes precoces que codificam enzimas relacionadas com a síntese do DNA viral e fatores necessários para a transcrição dos genes intermediários. Ocorre então o desnudamento secundário e a consequente liberação do DNA no citoplasma. Enzimas sintetizadas na etapa inicial da infecção atuam, então, na replicação do DNA viral. Durante e após a síntese do DNA acontece a transcrição dos genes intermediários e tardios. Por fim, as partículas virais são montadas e permanecem dentro da célula, são liberadas para o meio extracelular ou permanecem associadas à membrana plasmática. Abreviações: IMV: vírus maduro intracelular; IEV: vírus envelopado intracelular; EEV: vírus envelopado extracelular; CEV: vírus envelopado associado à célula. Fonte: adaptado de Mcfadden, G., 2005.

A síntese do DNA dos poxvírus pode ser detectada após duas horas de infecção e ocorre em regiões granulares e eletrodensas, localizadas próximas ao núcleo, chamadas de fábricas virais (revisado por Moss, B., 2013). Os genes dos OPXV são transcritos em três etapas temporais: precoce, intermediária e tardia. Não obstante, há indícios de que a transcrição precoce ocorre antes mesmo da partícula ser desnudada (Da Fonseca, F. e B. Moss, 2003). A análise mais recente do genoma do VACV *Western Reserve* (WR) sugere que existam 118 genes precoces, 53 intermediários e 38 tardios (Yang, Z., S. E. Reynolds, et al., 2011). O controle da expressão gênica acontece na etapa de iniciação da transcrição e atua através de um mecanismo em cascata. Os fatores requeridos para a transcrição dos genes intermediários são codificados por genes precoces e assim sucessivamente (Condit, R. C. e E. G. Niles, 2002).

Um completo sistema de transcrição está presente dentro do cerne da partícula viral, oferecendo um mecanismo para a síntese do mRNA viral precoce. Este mecanismo está sob o controle dos promotores virais precoces. A tradução desses mRNA produz proteínas que estão envolvidas na inibição da resposta antiviral do hospedeiro, na replicação e transcrição do DNA viral e na produção de fatores de transcrição dos genes intermediários. Ocorre então a degradação do cerne (desnudamento secundário) liberando o DNA viral no citoplasma para que ele possa funcionar como molde para a etapa de replicação genômica. A transcrição dos genes intermediários é responsável pela produção de enzimas e fatores de transcrição dos genes tardios, que por sua vez geram proteínas estruturais, fatores de transcrição precoces e enzimas que constituirão a partícula madura (Condit, R. C. e E. G. Niles, 2002; Mcfadden, G., 2005).

Concomitante ao acúmulo de produtos genéticos tardios, ocorre o processo de morfogênese das novas partículas virais infecciosas. Inicialmente são formadas partículas imaturas que, após uma série de processamentos proteolíticos, se transformam em IMV, que possuem somente uma membrana externa e representam a maior parte da progênie infecciosa. A maioria dos IMV é liberada durante a lise celular e são importantes na transmissão viral de um hospedeiro para o outro. Alguns IMV recebem membranas adicionais, durante a complexa via de morfogênese, formando os vírus envelopados intracelulares (IEV) [FIGURA 4]. Através da associação com microtúbulos, os IEV se movem para a periferia celular e fundem sua membrana externa com a membrana plasmática expondo o vírus envelopado associado à célula (CEV). O CEV pode ser transmitido para as células vizinhas pela polimerização da cauda de actina ou pela sua liberação como EEV e, por isso desempenha um papel importante na disseminação viral dentro do hospedeiro (Condit, R.

C. e E. G. Niles, 2002, 2002; Carter, G. C., M. Law, et al., 2005; Mcfadden, G., 2005; Lefkowitz, E. J., C. Wang, et al., 2006; Moss, B., 2007). Acredita-se que as formas CEV e EEV sejam fisicamente indistinguíveis e contêm uma membrana a menos do que os IEV e uma a mais do que os IMV (Smith, G. L. e G. Mcfadden., 2002). A utilização das nomenclaturas “vírus envelopados” (EV), substituindo EEV e CEV, e “vírus maduros” (MV), substituindo IEV e IMV, foi proposta, porém, ainda não há consenso em sua utilização (Moss, B., 2007).



**FIGURA 4 – Eletromicrografia de transmissão de IMV, IEV e EEV.** As setas indicam as membranas presentes em cada partícula. Fonte: adaptado de Moss, B., 2006.

## 2.4 A importância dos *Orthopoxvirus*

Os OPXV são amplamente conhecidos devido ao seu membro mais notório, o VARV, causador da varíola. Entretanto outras espécies desse gênero possuem grande importância nas áreas de pesquisa, saúde pública e desenvolvimento de vacinas.

A varíola é uma das doenças infecciosas mais antigas da humanidade, acredita-se que ela tenha surgido por volta de 10.000 A.C. quando surgiram os primeiros assentamentos agrícolas no nordeste da África se espalhando depois para a Índia e China. Mas os primeiros indícios de lesões cutâneas semelhantes às da varíola datam de 1.500 A.C. (McNeill W.H., 1976; Riedel, S., 2005). A primeira medida de combate contra a varíola surgiu na Índia antes de 1.000 A.C. e recebeu o nome de insuflação. As pessoas inoculavam um material obtido de crostas de pessoas infectadas através da insuflação nasal. Essa prática resultava em uma infecção menos grave do que a causada pela infecção natural. Essa técnica se espalhou pela China, pelo oeste da Ásia, África e no século XVIII finalmente chegou à Europa (Miller, G., 1981). A insuflação deu lugar a variolação, processo pelo



qual o vírus vivo (VARV) também obtido da crosta das feridas de pessoas infectadas, era inoculado em pessoas saudáveis através de pequenas feridas na pele. Como resultado, a mortalidade oriunda da inoculação (ou variolação) caiu para cerca de 1%, comparada a mortalidade de quase 40% de casos de varíola clínica. Além disso as pessoas inoculadas ficavam protegidas contra a doença (Smith, G. L. e G. Mcfadden, 2002; Whitley, R. J., 2003).

A técnica de variolação foi utilizada para combater a varíola até o médico inglês, Edward Jenner, introduzir a vacinação em 1796 (FIGURA 5). Jenner notou que ordenhadores infectados por um agente infeccioso contraído de vacas leiteiras se tornavam protegidos contra varíola. A partir dessas observações, Jenner resolveu inocular o braço de uma criança com o material da lesão de uma ordenhadora contaminada com “cowpox”, pois ele havia observado que a doença desenvolvida pela vaca era semelhante à varíola humana, porém mais amena. A criança apresentou febre e pústula no local da inoculação, mas posteriormente ela se curou. Então, Jenner inoculou secreções de uma pessoa infectada com varíola na mesma criança e esta não desenvolveu a doença. Através desse experimento, Jenner demonstrou que a criança se tornou resistente à infecção por varíola (Moss, B., 1996; Smith, G. L. e G. Mcfadden, 2002 ).



**FIGURA 5 – Estratégia de vacinação contra varíola.** A figura mostra o médico inglês Edward Jenner inoculando o CPXV em um bebê para imunizá-lo contra varíola. Fonte: Smith, G. L. e G. Mcfadden, 2002.

A vacinação contra a varíola foi rapidamente difundida pelo mundo utilizando, inicialmente, o CPXV e, posteriormente, o VACV. Nos meados do século XX a OMS lançou o programa intensificado de erradicação da varíola e em 1980, foi declarada a primeira erradicação de uma doença infecciosa em nível mundial (Whitley, R. J., 2003). Desde então a vacinação se

tornou uma das mais importantes intervenções desenvolvidas para prevenção de doenças infecciosas (Souza, A. P., L. Haut, et al., 2005).

Mesmo após a sua erradicação, existe uma grande preocupação em torno da possibilidade de uma reintrodução acidental do VARV ou o seu uso como arma biológica em ataques terroristas (Mccurdy, L. H., B. D. Larkin, et al., 2004; Mcfadden, G., 2005). Uma das razões para se preocupar com a re-emergência da varíola é que quase quarenta anos após a erradicação da doença grande parte da população mundial não possui imunidade contra o vírus. Além disso, o VARV é altamente disseminado pelo ar e a mortalidade das pessoas infectadas pode atingir 40% (Smith, G. L. e G. Mcfadden, 2002).

Outras espécies de grande importância do gênero OPXV, além do VACV, são o MPXV e o CPXV. O VACV, usado na vacinação contra a varíola, foi o primeiro vírus caracterizado por possuir uma RNA polimerase ativa e estudos sobre o sistema de transcrição deste vírus desempenharam um papel fundamental na elucidação de características estruturais dos mRNAs viral e eucarioto, incluindo o cap 5' e a cauda poli A (Condit, R. C. e E. G. Niles, 2002; Moss, B., 2007). A origem do VACV era desconhecida, embora algumas teorias tentassem explicar o seu surgimento: (1) seria um híbrido do CPXV e VARV; (2) teria derivado de CPXV, (3) ou do VARV, após adaptação em animais; (4) seu hospedeiro natural estaria, atualmente, extinto. Apesar das hipóteses levantadas, não existe concordância nessa questão (Fenner, F.; R. Wittek; et al., 1989; Buller, R. M. e G. J. Palumbo, 1991; Damaso, C. R., J. J. Esposito, et al., 2000).

O assunto da origem do VACV foi melhor esclarecido após o sequenciamento completo do genoma do vírus horsepox (HSPV) que se mostrou fortemente relacionado com as amostras já sequenciadas de VACV. Somente após essa descoberta os pesquisadores prestaram atenção para o fato de que Jenner havia especificado nos seus manuscritos que a origem do seu vírus vacinal era da infecção de cascos de cavalos que foi adaptado para seres humanos após passagens em gado (revisado por Shchelkunov, S. N., 2013).

O VACV foi o primeiro vírus utilizado como vetor de expressão, tornando-se um forte candidato a atuar como vetor vacinal contra doenças não relacionadas e também como vetor oncolítico (Fenner, F., 2000 e Mcfadden, G., 2005). No Brasil, amostras de VACV são responsáveis por causar infecções no gado leiteiro e ordenhadores. A transmissão ocorre através do contato desprotegido das mãos dos ordenhadores com as lesões nas tetas das vacas doentes (Damon, I. K, 2007; Trindade, G. S., Drumond, B. P., et al., 2007; Abrahao, J. S., M. I. Guedes, et

*al.*, 2009). Os surtos de vaccínia bovina acometem centenas de propriedades em várias regiões do país e acarretam grande perda econômica, principalmente devido à queda na produção de leite (*De Souza Trindade, G., F. G. Da Fonseca, et al.*, 2003).

O MPXV causa uma doença humana que é visivelmente semelhante à varíola e que está associada a significantes taxas de morbidade e mortalidade. O vírus aparece esporadicamente principalmente na África central e ocidental, mas há alguns anos foi relatado um surto nos Estados Unidos (*Sejvar, J. J., Y. Chowdary, et al.*, 2004). O MPXV pode ser transmitido para os seres humanos pelos macacos e roedores, entretanto a transmissão entre pessoas é ineficiente e os surtos possuem baixa disseminação. Contudo, a doença tem se tornado preocupante devido ao aumento da prevalência da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) nessas regiões e ao declínio do número de indivíduos imunizados contra varíola, vacinação essa que confere proteção cruzada contra outras infecções causadas por OPXV (*Smith, G. L. e G. Mcfadden, 2002; Mayr, A., 2003*). As manifestações clínicas da doença são similares as da varíola, caracterizadas pelo aparecimento de máculas, pápulas, vesículas, pústulas e crostas por todo corpo do indivíduo infectado (*Damon, I. K., 2007*) [FIGURA 6].



**FIGURA 6 – Infecção causada pelo *Monkeypox virus*.** Criança de 7 anos de idade no oitavo dia da infecção pelo MPXV apresentando lesões por todo o corpo. Fonte: Damon, I. K., 2007.

O CPXV possui o maior genoma de todos os representantes dos OPXV atuais, e todos os genes do seu genoma são encontrados em alguma outra espécie desse gênero. Esse vírus apresenta uma baixa patogenicidade para os seres humanos, entanto ele possui uma ampla gama de hospedeiros. A infecção de seres humanos é esporádica, ocorre através da transmissão do vírus por

animais infectados e é principalmente reportada na Europa. Entretanto, nas últimas duas décadas os relatos de animais infectados com CPXV (gatos, ratos e até mesmo seres humanos) tem aumentado (revisado por *Shchelkunov, S. N., 2013* ).

Recentemente, os surtos de doenças causadas por OPXV, não somente em animais domésticos assim como em seres humanos, têm se tornado mais frequentes. Provavelmente devido à falta de proteção da população contra esses vírus, uma vez que a vacinação contra varíola foi suspensa há 38 anos e que os OPXV conferem proteção cruzada, a imunização com um vírus protege o hospedeiro contra todos os membros deste gênero. A preocupação dos pesquisadores no momento é que um vírus parecido com o VARV possa surgir no curso natural da evolução dos OPXV zoonóticos atuais (revisado por *Shchelkunov, S. N., 2013* ).

## **2.5 A patogênese das infecções por *Orthopoxvirus***

O espectro de hospedeiros dos OPXV varia para cada espécie, podendo ser extremamente restrito em algumas e muito amplo em outras. Comumente esses vírus infectam os hospedeiros pelo trato respiratório ou pela pele. A gravidade da infecção varia dramaticamente de uma espécie para outra causando diversos sinais clínicos, variando desde lesões pustulares localizadas e auto-limitantes a doenças sistêmicas generalizadas. Uma única espécie da família pode estar associada a doenças de maior ou menor gravidade, dependendo da virulência da amostra, da via de infecção viral e do tipo de hospedeiro e seu estado imunológico (*Fenner, F.; R. Wittek; et al., 1989; Diven, D. G., 2001; Damon, I. K., 2007*).

A porta de entrada do patógeno varia de acordo com a espécie do vírus e o hospedeiro envolvido. O trato respiratório é a via de infecção mais comum dos OPXV e constitui o sítio de entrada do *Camelpox virus*, do VARV e do MPXV. As infecções causadas por VACV e CPXV geralmente ocorrem por pequenas abrasões na pele em seres humanos e bovinos, porém em roedores a infecção respiratória é bastante comum. O trato gastrointestinal também representa uma porta de entrada para os OPXV, como *Ectromelia virus* (ECTV) e MPXV. Foi sugerido que o fato de roedores se alimentarem de carcaças de animais mortos da mesma espécie poderia favorecer a disseminação viral do ECTV. Para o CPXV, a via oral é a maior fonte de infecção em gatos domésticos e felinos habitantes de zoológicos, através da predação de roedores contaminados (*Coras, B., S. Essbauer, et al., 2005*).

Modelos de desafio intranasal ou aerossol foram desenvolvidos utilizando muitos OPXV em diferentes espécies de animais para mimetizar a rota respiratória de infecção. Diferentes rotas de exposição resultam em diferentes patogêneses, envolvem distintos grupos de proteínas virais e oferecem informações relevantes para o entendimento da doença. A transmissão por contato é um modelo clássico de infecção por ECTV, através das patas de camundongos, e mais recentemente por VACV, através da orelha, que também oferece um modelo para o entendimento da resposta imune induzida na imunização contra varíola. Modelos de manifestações específicas da doença em hospedeiros imunocomprometidos também são utilizados para avaliar o efeito de vários fatores do hospedeiro na patogênese da doença, na resposta contra o patógeno e eliminação do mesmo (Damon, I. K., 2007).

Fenner e colaboradores (1948), em um experimento clássico, utilizaram ECTV para propor um modelo de patogênese viral *in vivo*. De acordo com o estudo, as partículas virais se multiplicam inicialmente em um sítio primário de infecção e, em seguida, atingem a corrente sanguínea. A primeira viremia resulta na infecção de órgãos muito vascularizados, como fígado e baço, assim como os linfonodos regionais. Após alguns dias, ocorre a viremia secundária, quando as partículas virais migram para a epiderme e para os folículos capilares, causando lesões ulcerativas generalizadas. Em alguns camundongos como é o caso do BALB/c a infecção é muito grave e o animal vem a óbito geralmente por volta dos dias 6 e 7 pós-infecção (p.i.) devido à necrose do tecido hepático. Em outras espécies de camundongo como o C57BL/6, por exemplo, a mortalidade não é muito alta. Nestes casos o vírus não atinge altos títulos e sua disseminação é mais lenta (Fenner, F., 1948; Esteban, D. J. e R. M. Buller, 2005).

O VACV causa infecções localizadas em seres humanos, sendo que a multiplicação ocorre no local de infecção e o vírus se espalha para os linfonodos adjacentes causando a linfadenopatia local, característica da infecção por OPXV. Inicialmente, ocorre uma vasodilatação dos capilares da derme na região acometida e, em seguida, há a formação de vesículas com altos títulos virais, representando a maior fonte de infecção por contato. A migração de células polimorfonucleares para a região das vesículas faz com que estas se tornem pústulas. Estas, geralmente, sofrem ulceração, desenvolvem uma crosta e, em seguida, ocorre a formação de uma cicatriz (Fenner, F.; R. Wittek; et al., 1989; Buller, R. M. e G. J. Palumbo, 1991; Trindade, G. S., M. I. Guedes, et al, 2009). Esta infecção localizada pode ser atribuída, em parte, à resposta imune do hospedeiro, visto

que em pacientes imunocomprometidos, o CPXV pode causar uma infecção sistêmica, eventualmente fatal (*Smith, S. A. e G. J. Kotwal, 2002*).

Embora outros animais tenham sido utilizados para estudos de patogênese dos poxvírus, camundongos são os melhores modelos (*Jacobs, N., R. A. Chen, et al., 2006*). Estes podem ser infectados com VACV por várias vias, incluindo a intracerebral, intraperitoneal e intranasal, todas muito utilizadas para modelos de infecções sistêmicas, além das vias intravenosa e intradérmica (escarificação nas patas, na cauda e orelha) [*Briody, B. A., 1959; Turner, G. S., 1967; Buller, R. M., 1985; Andrew, M. E., B. E. Coupar, et al., 1989; Tschärke, D. C., P. C. Reading, et al., 2002; Meseda, C. A., A. D. Garcia, et al., 2005; Abdalrhman, I., I. Gurt, et al., 2006, Ferrier-Rembert, A., R. Drillien, et al., 2007*]. Inoculações intracerebral e intranasal com doses de  $5 \times 10^4$  PFU do vírus WR podem causar grave perda de peso, arqueamento de dorso e piloereção em camundongos e os resultados das infecções por estas vias são similares (*Turner, G. S., 1967; Reading, P. C. e G. L. Smith, 2003; Abdalrhman, I., I. Gurt, et al., 2006, Hayasaka, D., F. A. Ennis, et al., 2007*). Já a infecção por VACV através de escarificações nas patas ou no dorso de camundongos BALB/c resulta na formação e no desenvolvimento de lesões restritas ao sítio de inoculação. Mesmo quando altas doses virais são utilizadas, a infecção não se torna sistêmica (*Ferreira, J. M., B. P. Drumond, et al., 2009*).

### **3. A utilização dos *Orthopoxvirus* como vetores vacinais**

A implementação de vacinas tem diminuído a morbidade e a mortalidade de doenças que anteriormente representavam uma grande ameaça para a população, tais como sarampo, poliomielite, difteria e rubéola. Para uma vacina ser ideal ela deve conter algumas características, dentre as quais podemos citar: apresentar um alto perfil de segurança em toda a população (incluindo idosos, crianças e imunocomprometidos); proporcionar uma proteção duradoura; ser administrada em uma única dose ou duas temporalmente próximas; estimular a proteção em até duas semanas pós-imunização; ser administrada independente de agulha; poder ser produzida em larga escala sem perder a qualidade; ser administrada em combinação (na mesma fórmula) ou concomitantemente (coadministrada) a outras vacinas; e suportar altas e baixas temperaturas de armazenamento. Muitas das vacinas utilizadas atualmente apresentam uma ou mais características

citadas acima, mas nenhuma vacina conhecida até então contém todas elas (*Levine, M. M. e M. B. Sztejn, 2004*).

O desenvolvimento de vacinas seguras e eficazes requer novas tecnologias e uma proposta promissora é a utilização de vetores virais recombinantes no desenvolvimento de novas vacinas e no melhoramento das já existentes. Essa nova abordagem requer uma caracterização detalhada da organização genética do patógeno, bem como dos seus genes relacionados à virulência e à indução da resposta imune. O aumento desse conhecimento e a habilidade para manipular os genomas dos patógenos tornam possível o desenvolvimento de vetores vacinais vivos seguros e capazes de induzir uma ampla resposta imune humoral e celular (*Souza, A. P., L. Haut, et al., 2005*).

Os vetores virais podem ser utilizados quando a atenuação do patógeno alvo não é possível, a imunidade contra um ou mais patógenos precisa ser aumentada (as proteínas do vetor podem funcionar como adjuvantes) ou quando não é possível produzir em larga escala e com segurança uma quantidade suficiente de patógenos vivos ou subunidades proteicas. Por outro lado, existem alguns problemas com relação à segurança quando nos referimos aos vetores virais. Por se tratarem de vírus vivos, não se pode descartar a possibilidade de reversão para a forma selvagem (no caso de amostras atenuadas), virulência, recombinação com outros vírus, disseminação para o ambiente ou de pessoa para pessoa e imunidade pré-existente contra o vetor vacinal (*Yokoyama, N., K. Maeda, et al., 1997*).

Entretanto, as vacinas derivadas de vetores virais oferecem várias vantagens sobre as tecnologias tradicionais, incluindo a produção de altos níveis da proteína antigênica dentro das células do hospedeiro imunizado, o potencial efeito adjuvante das próprias proteínas do vetor, a entrega eficiente de antígenos diretamente aos componentes do sistema imune, tal como as células apresentadoras de antígenos (APC) e a capacidade de estimular tanto a resposta humoral quanto a celular (*Souza, A. P., L. Haut, et al., 2005*). Além disso, alguns vírus recombinantes podem ser liofilizados e estocados sem a necessidade de um equipamento especial de refrigeração (*Rocha, C. D., B. C. Caetano, et al., 2004*).

Embora a maioria dos genomas virais possa ser manipulada para se tornar recombinante e expressar antígenos exógenos na célula hospedeira, alguns vírus são mais eficientes para serem usados como vetores vacinais. Dentre esses, os membros da família *Poxviridae* são os vetores virais mais comumente utilizados e melhor caracterizados para o propósito vacinal (*Rocha, C. D., B. C. Caetano, et al., 2004; Souza, A. P., L. Haut, et al., 2005*).

O sucesso do programa de erradicação da varíola comandado pela OMS utilizando o VACV somado ao desenvolvimento das técnicas de manipulação genética sugeriram que esse vírus poderia desempenhar um importante papel como vetor vacinal recombinante. Os primeiros OPXV vetores foram desenvolvidos no início da década de 80 através da inserção do gene da timidina cinase do *Human herpesvirus 1* (HHV-1) dentro do genoma de um VACV. Devido à sua alta imunogenicidade e sua facilidade para ser manipulado geneticamente, o potencial dos OPXV recombinantes como vetores vacinais foi rapidamente reconhecido. Desde então, esses vírus são extensivamente utilizados na tentativa de produzir vacinas contra agentes infecciosos e, mais recentemente, contra tumores (*Panicali, D. e E. Paoletti., 1982; Moss, B., 1996; Mastrangelo, M. J., L. C. Eisenlohr, et al., 2000; Souza, A. P., L. Haut, et al., 2005*).

Dentre as características que tornam os OPXV excelentes vetores vacinais podemos citar o baixo custo de produção e a estabilidade dos vetores, o que permite que quando liofilizados possam ser refrigerados e utilizados mesmo após dois meses. Além disso, esses vetores podem ser administrados através de diferentes vias. Inoculações intradérmica, intranasal, intravaginal, intrarretal e oral mostraram-se seguras e eficientes em gerar resposta imune humoral e celular (*Souza, A. P., L. Haut, et al., 2005*).

Outra vantagem dos OPXV em relação aos outros vetores vacinais é o tamanho do seu genoma que possibilita inserir grandes insertos (de até 25 Kb) e múltiplos genes de patógenos distintos sem que ocorra a perda da estabilidade viral. Além disso, a expressão dos genes recombinantes ocorre em altos níveis e pode ser controlada através da escolha de promotores virais precoces, intermediários ou tardios. Outra característica desses vetores é o fato de que o ciclo de multiplicação dos OPXV ocorre inteiramente no citoplasma eliminando a possibilidade de integração ao genoma do hospedeiro, bem como necessidades especiais de processamento nuclear e transporte do RNA (*Moss, B., 1996; Mastrangelo, M. J., L. C. Eisenlohr, et al., 2000; Rocha, C. D., B. C. Caetano, et al., 2004; Souza, A. P., L. Haut, et al., 2005*).

Embora as vacinas baseadas no uso do VACV tenham inúmeras vantagens, elas podem causar efeitos colaterais graves em crianças jovens e em indivíduos imunocomprometidos. Essas complicações são raras, mas representam um risco potencial para imunização no nível mundial (*Lehmann, M. H., W. Kastenmuller, et al., 2009*). Além disso, o VACV se multiplica em células de mamíferos, o que pode acarretar uma transmissão indesejada para indivíduos imunocomprometidos, principalmente em países onde o índice de portadores do vírus da



imunodeficiência humana (HIV) é alto. Uma outra desvantagem é que esse vírus exige laboratórios com nível de biosegurança 2. Portanto, o desenvolvimento de amostras atenuadas se tornou prioridade para aumentar a segurança dos vetores virais recombinantes (Moss, B., 1996; Mastrangelo, M. J., L. C. Eisenlohr, et al., 2000; Rocha, C. D., B. C. Caetano, et al., 2004; Souza, A. P., L. Haut, et al., 2005).

Duas abordagens foram utilizadas para atenuar o VACV e torná-lo mais seguro para a imunização em seres humanos. A primeira consiste na deleção de genes virais envolvidos na replicação, interação com o hospedeiro e/ou na formação de vírus extracelulares. A segunda baseia-se em passagens sucessivas do vírus em cultura de tecido ou em um hospedeiro não natural para isolar linhagens mais atenuadas (Rocha, C. D., B. C. Caetano, et al., 2004).

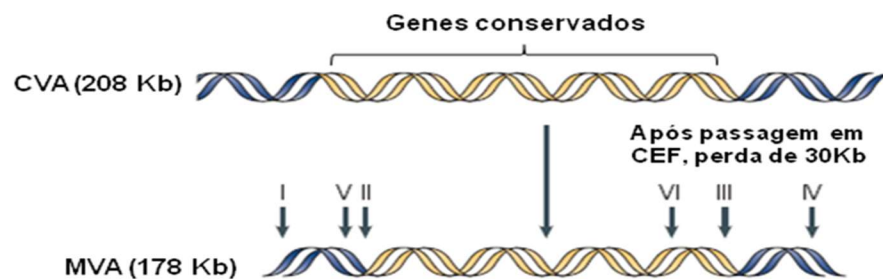
Duas amostras atenuadas de VACV se tornaram candidatas para o uso na vacinação. A primeira, denominada NYVAC, foi gerada através de múltiplas deleções (18 janelas de leitura abertas) do genoma viral do vírus *Vaccinia Copenhagen* (VACV-COP). Essas deleções envolveram genes relacionados ao metabolismo de nucleotídeos, a funções reguladoras do hospedeiro e à virulência da amostra. Entretanto, esse vírus continuou capaz de se multiplicar em células de mamíferos. A segunda amostra recebeu o nome de *Vaccinia Ankara* modificado (MVA) e foi obtida através de mais de 500 passagens sucessivas do vírus corioalantóide *Vaccinia Ankara* (CVA) em culturas de fibroblasto de embrião de galinha (CEF) [Mayr, A., V. Hochstein-Mintzel e H. Stickl, 1975; Tartaglia, J., M. E. Perkus, et al., 1992].

A amostra de VACV, CVA, foi utilizada na Turquia como vacina contra varíola e recebeu esta terminação porque era passada e titulada em membrana corioalantóide de ovos embrionados. A vacina foi obtida de lesões resultantes de inoculações com o CVA em bezerros e burros. As propriedades do CVA foram extensivamente estudadas em vários sistemas biológicos incluindo ovos embrionados, camundongos, coelhos e cultura de células. Devido a sua ampla gama de hospedeiros e suas bem caracterizadas propriedades biológicas, o CVA foi escolhido para iniciar as inúmeras passagens experimentais em CEF. O objetivo de tais passagens era reproduzir a suposta evolução dos poxvírus de um ancestral com amplo espectro de hospedeiro para um vírus com um estreito espectro de hospedeiro, tal como o VARV. O vírus resultante das passagens seriadas em CEF não era mais capaz de se multiplicar produtivamente na maioria das linhagens celulares de mamíferos além de apresentar um perfil altamente atenuado, recebendo o nome de MVA (Meisinger-Henschel, C., M. Schmidt, et al., 2007). Atualmente essa amostra viral é um dos

OPXV mais utilizados na tentativa de se obter vetores vacinais contra agentes infecciosos tais como o HIV e *Plasmodium spp* (Rocha, C. D., B. C. Caetano, et al., 2004).

### 3.1 *Vaccinia Ankara* modificado

Durante o processo de atenuação, o vírus *Vaccinia Ankara* perdeu cerca de 15% (30 Kb) do seu genoma parental e se tornou incapaz de se multiplicar produtivamente na maioria das linhagens celulares de mamíferos (FIGURA 7). Essa perda incluiu os genes relacionados com o espectro de hospedeiros e com a imunorregulação, mas a maioria dos genes que codificam proteínas estruturais foi mantida (Meyer, H., G. Sutter, et al., 1991; Sutter, G. e B. Moss, 1992; Ramirez, J. C., M. M. Gherardi, et al., 2000b; Drexler, I., C. Staib, et al., 2004; Mcfadden, G., 2005; Parrino, J., L. H. Mccurdy, et al., 2007).



**FIGURA 7 – Figura esquemática representando a origem da amostra MVA.** O MVA foi derivado de diversas passagens do vírus corioalantóide *Vaccinia Ankara* (CVA) em CEF. Após o processo de atenuação o CVA perdeu cerca de 30 Kb do genoma. Os genes deletados estão localizados nas seis regiões representadas na figura (I-VI). Fonte: adaptado de Mcfadden, G., 2005.

Ao contrário dos demais OPXV, o MVA não possui genes que codificam receptores solúveis para citocinas e quimiocinas importantes para a resposta anti-viral, além de outros genes relacionados à evasão imune. O IFN- $\gamma$  é essencial para indução da resposta do tipo Th1 e ativação de células T citotóxicas. Os IFNs tipo I possuem uma atividade antiviral direta e aumentam a memória imunológica. O fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF -  $\alpha$ ) também possui atividade antiviral e pró-inflamatória. Como o MVA não é capaz de bloquear o efeito dessas citocinas através de receptores solúveis, pode ser reconhecido com mais facilidade pelo sistema imune e consequentemente se torna menos virulento e mais imunogênico do que as outras amostras de VACV (Blanchard, T. J., A. Alcamí, et al., 1998).

O fato de o MVA não possuir a maioria dos genes relacionados com a modulação do sistema imune do hospedeiro poderia representar um problema para múltiplas vacinações utilizando esse vetor. A imunidade prévia ao vetor pode impossibilitar múltiplas vacinações utilizando o MVA, uma vez que os anticorpos específicos contra o vírus poderiam inativá-lo antes que ele conseguisse expressar o antígeno exógeno. Esse problema se torna maior com a ocorrência de surtos zoonóticos causados por OPXV, que são antigenicamente correlacionados a amostra vacinal, além de uma parte da população ter sido vacinada contra varíola. Entretanto, Ramírez e colaboradores, em 2000, vacinaram camundongos BALB/c com as amostras virais WR ou MVA pela via intraperitoneal e a resposta de anticorpos e de células T CD8<sup>+</sup> específicos para o vírus foi significativamente menor nos animais que receberam MVA. Em seguida, os camundongos receberam um reforço desta vez somente com a amostra MVA expressando uma proteína do vírus HIV. Os camundongos que anteriormente foram imunizados com a amostra MVA produziram quatro vezes mais células T CD8<sup>+</sup> específicas para a proteína exógena do que aqueles que receberam a amostra WR. Esses resultados indicam a capacidade do MVA em induzir uma resposta imune específica contra o antígeno alvo, mesmo após inoculações repetidas (*Ramirez, J. C., M. M. Gherardi, et al., 2000a*).

Ao contrário do que se esperava, apesar da incapacidade apresentada pelo MVA de produzir progênie infecciosa na maioria das células de mamífero, a expressão dos genes virais precoces e tardios nas células humanas não foi afetada. Além disso, vírus recombinantes foram capazes de sintetizar altos níveis de uma proteína exógena dentro das células humanas, mostrando que o MVA é um vetor de expressão altamente eficiente. As proteínas estruturais e outras proteínas abundantes produzidas pelos OPXV são produtos da expressão gênica tardia e só são expressos após a replicação do DNA viral. O alto nível da síntese dessas proteínas encontrado nas células humanas infectadas com MVA recombinante corrobora o fato de que o bloqueio da morfogênese viral acontece após a replicação do DNA (*Sutter, G. e B. Moss, 1992*).

Devido à incapacidade de se multiplicar em células humanas e ao grande número de mutações que devem ser corrigidas para que ocorra a reversão para o estado parental, o MVA é considerado extremamente seguro para utilização como vetor vacinal, pois é avirulento para os seres humanos, pode ser administrado em pacientes imunossuprimidos e não é capaz de se disseminar para indivíduos não vacinados. De 1968 a 1980, o MVA foi inoculado em cerca de 120.000 indivíduos, incluindo muitos que eram considerados pertencentes a grupo de risco para receber a vacina convencional da varíola. Nenhum efeito colateral foi associado ao uso desta

amostra atenuada. Esse resultado e a avirulência apresentada nos testes desenvolvidos em animais conferiram ao MVA um alto perfil de segurança, permitindo que esse vírus possa ser manipulado em laboratórios com nível de biosegurança 1 sem a prévia vacinação dos trabalhadores (Meyer, H., G. Sutter, et al., 1991; Sutter, G. e B. Moss, 1992; Moss, B., 1996; Drexler, I., C. Staib, et al., 2004; Rocha, C. D., B. C. Caetano, et al., 2004; Mcfadden, G., 2005).

Inúmeras vacinas utilizando o MVA como vetor recombinante estão sendo testadas. Dentre elas podemos citar as vacinas contra *Epstein-Barr virus*, *Influenza virus*, citomegalovírus, papilomavírus, HIV e *Plasmodium falciparum* (Drexler, I., C. Staib, et al., 2004). Uma vacina eficiente contra a AIDS é de extrema urgência e o MVA recombinante expressando antígenos do HIV está entre os primeiros vetores virais a ser desenvolvido e testado. Para duas doenças importantes, AIDS e malária, a imunização baseada no vetor MVA tem sido testada com relativo sucesso em ensaios clínicos de fases I e II (Webster, D. P., S. Dunachie, et al. 2005; Guimaraes-Walker, A., N. Mackie, et al., 2008; Sandstrom, E., C. Nilsson, et al., 2008; Norder, M., P. D. Becker, et al., 2010; Garcia, F., J. C. Bernaldo De Quiros, et al., 2011). Dados preliminares indicaram que a vacina foi capaz de induzir uma resposta imune baseada em células T específicas contra os patógenos. Além disso, vacinas baseadas em MVA recombinante expressando diferentes antígenos associados a tumores, contra uma variedade de cânceres, também estão sendo testadas (Meyer, R. G., C. M. Britten, et al., 2005; Amato, R. J., 2010; Dangoor, A., P. Lorigan, et al., 2010).

### 3.1.1 Genoma do MVA

O MVA, durante o processo de atenuação, sofreu seis principais deleções em relação ao genoma do vírus parental CVA (Meyer, H., G. Sutter, et al., 1991). O genoma do MVA compreende um total de 177.923 base ( $\pm 178$  Kb) contendo 33,4% de guanina e citosina. Análises tradicionais revelaram que o genoma possui 195 janelas de leitura abertas (ORF) e 163 genes (Antoine, G., F. Scheiflinger, et al, 1988; Meisinger-Henschel, C., M. Schmidt, et al., 2007; [www.poxvirus.org](http://www.poxvirus.org)).

O fenótipo altamente atenuado do MVA é resultado de numerosas mutações incluindo grandes e pequenas deleções e substituições de bases, resultando na deleção e/ou fragmentação de ORF e alterações nas suas proteínas. Meisinger-Henschel e colaboradores, em 2007, sequenciaram o genoma do vírus CVA e compararam com o do MVA. Eles identificaram 71 ORFs ortólogas que codificam produtos genéticos idênticos entre as duas amostras. As demais 124 ORF do MVA

codificam produtos que contêm pelo menos uma troca de aminoácidos, inserção ou deleção (Meisinger-Henschel, C., M. Schmidt, et al., 2007). Uma característica interessante é que as seis principais deleções sofridas pelo MVA ocorreram em regiões do genoma do CVA que já possuíam uma ou mais ORF fragmentadas ou truncadas (Meisinger-Henschel, C., M. Schmidt, et al., 2007).

Os genes e as ORF dos VACV são comumente identificados com uma letra maiúscula (representando o fragmento do genoma digerido pela endonuclease *HindIII*), um número arábico (representando a posição dentro do fragmento digerido pela *HindIII*) e L ou R (indicando o sentido da transcrição, esquerda ou direita, respectivamente). As proteínas possuem a mesma designação, mas o L ou R é omitido (Moss, B., 2012).

Os genomas dos OPXV podem ser divididos em duas regiões terminais e uma região central conservada. A maioria das ORF localizadas na região terminal esquerda do genoma do MVA foi deletada, fragmentada ou truncada. Um exemplo é o gene C23L presente na espécie VACV-COP. Este gene codifica uma proteína que se liga a quimiocinas do hospedeiro e está interrompido na amostra MVA (Antoine, G., F. Scheifflinger, et al, 1988).

Outras quatro grandes deleções na região terminal esquerda do genoma do MVA, comparado ao VACV-COP, incluem a proteína VCP, a serpina SPI-1 (gene C12L), o fator de virulência 14k (gene N1L) do VACV, que inibe a sinalização intracelular via os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e IRF-3 neutralizando a apoptose, e o gene K1L relacionado com o espectro de hospedeiro, provavelmente necessário para a multiplicação dos VACV em células humanas (Antoine, G., F. Scheifflinger, et al, 1988; Meisinger-Henschel, C., M. Schmidt, et al., 2007).

Somente 8 das 27 ORF localizadas na região terminal esquerda do vírus MVA são estruturalmente intactas e codificam proteínas funcionais. Essas ORF codificam o fator de crescimento do VACV (VGF), as proteínas C10L e C6L cujas funções são desconhecidas, a proteína C7L relacionada com o espectro de hospedeiro, a serpina SPI-3 (K2L), a proteína sensível a  $\alpha$ -amanitina (N2L), a proteína de resistência ao IFN (K3L) e a proteína do gene K4L que é o principal antígeno de envelope presente em vários poxvírus (Antoine, G., F. Scheifflinger, et al, 1988).

Como esperado, a maioria das ORF da região central se encontram intactas, embora mudanças de aminoácidos, comparados aos respectivos homólogos do VACV-COP e do VARV, sejam frequentes. Entretanto, o MVA possui três ORF (F5L, F11L e O1L) fragmentadas na região central indicando que esses genes não são essenciais e são potenciais sítios de inserção para genes

exógenos (Antoine, G., F. Scheifflinger, et al, 1988; Meisinger-Henschel, C., M. Schmidt, et al., 2007).

A região terminal direita é mais conservada estruturalmente do que a esquerda. Entretanto três grandes deleções (comparado ao VACV-COP) denominadas d3501, d809 e d1771 são encontradas nessa região. A deleção d3501 inclui as ORFs A51R-A55R dentre as quais está presente o homólogo do receptor de TNF (TNFR) [A53R]. Já a d809 afetou uma pequena ORF (B20R) de função desconhecida enquanto a d1771, localizada na ITR, inclui as ORF B25R-B28R, que correspondem a uma grande ORF do VARV codificadora da proteína do tipo ankarina. Todos os genes “ank” do MVA foram deletados, com exceção do B18R. Esses genes são relacionados com o espectro de hospedeiro e virulência (Antoine, G., F. Scheifflinger, et al, 1988).

Ankarinas são proteínas intracelulares com uma ou várias repetições de um motivo de 33 resíduos de aminoácidos (chamadas de repetições do tipo ank), formando duas hélices alfa antiparalelas. Essas repetições são motivos de interação proteína-proteína muito comuns e ocorrem em várias proteínas envolvidas com funções diversas, como fatores de transcrição, regulação de ciclo celular, integridade do citoesqueleto, transporte iônico, transdução de sinais e respostas inflamatórias (Rubtsov, A. M. e O. D. Lopina, 2000; Hryniewicz-Jankowska, A., A. Czogalla, et al., 2002; Howard, J. e S. Bechstedt, 2004; Mosavi, L. K., T. J. Cammett, et al., 2004; Voronin, D. A. e E. V. Kiseleva, 2007). Repetições do tipo ank são comuns em proteínas de eucariotos. Apesar de ausente na maioria dos vírus, são comuns nos poxvírus provavelmente devido à transferência horizontal de genes (Bork, P., 1993).

K1 e C7 são exemplos de proteínas com domínio do tipo ank presentes em VACV e possuem papel crítico no espectro de hospedeiro, visto que a deleção de ambos os genes resulta em incapacidade replicativa em várias células de mamíferos e atenuação profunda em camundongos (Drillien, R., F. Koehren, et al., 1981; Gillard, S., D. Spehner, et al., 1986; Perkus, M. E., S. J. Goebel, et al., 1990; Meng, X., J. Chao, et al., 2008). K1 inibe a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, que desempenha um papel chave na resposta imune à infecção (Shisler, J. L. e X. L. Jin, 2004; Chang, S. J., J. C. Hsiao, et al., 2009). K1 e C7 também foram descritas como antagonistas da função antiviral induzida por interferons tipo I. A amostra MVA conserva apenas uma proteína de 68 KDa com repetição do tipo ank que é conservada em todos os ortopoxvírus (Sperling, K. M., A. Schwantes, et al., 2009).

Os genes A27R-A38R, localizados na região terminal direita, codificam muitas proteínas presentes nos EEVs. Uma delas, a proteína de membrana do EEV codificada pela ORF A36R, é também um fator de virulência e determina o fenótipo de placa. Esse gene se encontra preservado no MVA, entretanto duas deleções na sua janela de leitura resultam em uma proteína de tamanho reduzido, afetando potencialmente essas propriedades do vírus (*Antoine, G., F. Scheiflinger, et al, 1988*).

Além disso, o CVA contém genes intactos que codificam receptores solúveis ou de superfície para IFN-I (B19R) e receptores de TNF (CrmC, A53R) que são secretados. No genoma da amostra MVA existem homólogos desses genes que codificam proteínas não funcionais (*Meisinger-Henschel, C., M. Schmidt, et al., 2007*).

#### **4. Imunidade antiviral**

Uma resposta imune eficaz contra infecções virais depende da integração entre as reações iniciais da imunidade inata e a atuação da imunidade adquirida, resultando na eliminação do patógeno e no desenvolvimento de imunidade duradoura.

A resposta imune inata é a linha de defesa inicial contra os vírus, consistindo em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que já existiam antes do estabelecimento de uma infecção. A resposta inflamatória inicial consiste na infiltração de um grande número de leucócitos no sítio da infecção. O recrutamento desses leucócitos é coordenado por inúmeras citocinas e quimiocinas secretadas pelas células infectadas ou pelos macrófagos locais. Os leucócitos recrutados, principalmente neutrófilos e macrófagos, são ativados e participam da fagocitose das células infectadas (*Buller, R. M. e G. J. Palumbo, 1991*).

Citocinas e quimiocinas, produzidas por macrófagos e linfócitos T, desempenham um papel crucial na resposta imune antiviral. Estas proteínas são capazes de alterar a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), de adesão e co-estimuladoras e direcionar a ativação ou desativação de células do sistema imune. As quimiocinas são produzidas como resultado de estímulos exógenos (infecções virais) ou endógenos (Interleucina-1, Fator de necrose tumoral- $\alpha$  e IFNs) e medeiam a quimiotaxia, ativação de leucócitos e regulação do extravasamento de leucócitos do sangue para os sítios de inflamação (*Ramshaw, I. A., A. J. Ramsay, et al., 1997*).

Os IFNs são um grupo de proteínas secretadas que além de participarem da resposta antiviral, controlam o crescimento celular e regulam tanto a imunidade inata quanto adaptativa (Bonjardim, C. A., P. C. Ferreira, et al., 2009). Existem três grupos de IFNs: tipo I, tipo II e tipo III. Os IFNs tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) oferecem resistência à infecção viral, estimulam a expressão de moléculas de MHC de classe I e inibem a proliferação celular (Biron, C. A., 1998). O IFN tipo II (IFN- $\gamma$ ) é secretado por macrófagos, células Natural Killer (NK), linfócitos T, entre outras células, e é importante na ativação das respostas inflamatória e mediada por células (Boehm, U., T. Klamp, et al., 1997). Já o IFN tipo III (IFN- $\lambda$ ) é produzido durante algumas infecções virais e é, particularmente, abundante na pele e nas mucosas. Esse IFN é produzido pelas mesmas vias do IFN tipo I e é capaz de inibir a replicação viral nas células alvo (Whitmire, J. K., 2011).

Diversas vias bioquímicas desencadeiam a produção de IFN. Essas incluem o reconhecimento de RNA e DNA virais por receptores do tipo Toll (TLR) e ativação de cinases citoplasmáticas pelo RNA viral. Os TLRs são receptores transmembrana que reconhecem moléculas conservadas exclusivas de patógenos, denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Além disso, sensores citoplasmáticos de vírus induzem vias TLR-independentes de produção de IFN. Estas vias incluem os RLRs (receptores do tipo RIG-I), e os NLRs (receptores do tipo NOD). Após o reconhecimento de RNA ou DNA viral, esses receptores moleculares sofrem modificações estruturais que geram um estado de sinalização ativa. Todas essas vias convergem para a ativação de proteínas cinases, as quais, por sua vez, ativam fatores de transcrição de genes que codificam os IFNs (Smith, P. L., G. Lombardi, et al., 2005, Wilkins, C. e M. Gale, Jr., 2010). Os IFNs tipo I são secretados e agem de forma autocrina e parácrina, ativando a sinalização via Jak/STAT que leva a produção de centenas de genes envolvidos com a indução do “estado antiviral” tanto nas células infectadas quanto nas não infectadas através da inibição da replicação viral. Essa citocina faz com que as células sintetizem várias enzimas que irão interferir com a transcrição de RNA ou DNA viral. Essas incluem a proteína cinase ativada por RNA (PKR) que afeta a síntese proteica, entre outros processos, impedindo que o vírus se replique (Biron, C. A. e G. C., Sen, 2007).

Além disso, o IFN tipo I aumenta a expressão de moléculas do MHC de classe I nas células infectadas e o consequente reconhecimento de antígenos virais e morte das células mediada por linfócitos T citotóxicos (CTL). Essa citocina também ativa as células NK e as células dendríticas (DC) e induz a ativação do sistema imune adaptativo (Koyama, S., K. J. Ishii, et al.,



2008). As células NK são capazes de reconhecer células infectadas nas quais o vírus bloqueou a expressão do MHC de classe I e as destruir além de produzirem citocinas, como é o caso do IFN- $\gamma$  que ativa os macrófagos (*Kawai, T. e S. Akira Biron, 2006; C. A. e G. C., Sen, 2007*).

As DC são muito importantes para apresentação de antígenos e fazem a ponte entre as respostas inata e adaptativa. Essas células capturam e processam os antígenos exógenos e migram do sítio de infecção para os tecidos linfoides secundários onde apresentam os antígenos processados para as células T via MHC de classe I e II. Essa interação da APC com a célula T virgem leva a ativação e expansão clonal das células T específicas para o antígeno (*Baumgarth, N., 2000*).

A ativação do sistema imune inato é essencial para uma subsequente resposta imune adaptativa. As células T CD4<sup>+</sup> ativadas pelo ambiente pró-inflamatório e pelas APC estimulam a expansão inicial das CTL, sua subsequente diferenciação em células de memória e as guiam para os sítios de infecção e também estimulam a produção de anticorpos antivirais pelas células B (*Koyama, S., K. J. Ishii, et al., 2008; Whitmire, J. K., 2011*).

As células T CD8<sup>+</sup> sofrem proliferação maciça durante uma infecção viral. Após sua ativação, essas células são diferenciadas em CTL que eliminam as células infectadas, além de secretarem citocinas que inibem a multiplicação viral e fatores que recrutam outras células do sistema imune (*Harty, J. T., A. R. Tivnereim, et al., 2000*). A frequência das células T CD8<sup>+</sup> específicas contra o patógeno apresenta um pico entre 6 e 8 dias após a infecção, caindo rapidamente junto com a diminuição da carga viral. Após a eliminação do antígeno, a maioria das células T é eliminada pela morte celular induzida por ativação. Entretanto, durante esse processo, algumas células se desenvolvem em células T de memória que sobrevivem por grandes períodos e medeiam uma robusta e rápida resposta anamnésica no caso de uma reinfecção pelo mesmo patógeno (*Gourley, T. S., E. J. Wherry, et al., 2004; Antia, R., V. V. Ganusov, et al., 2005; Badovinac, V. P. e J. T. Harty, 2006*).

As células B virgens residem e circulam pelos folículos dos órgãos linfoides periféricos em busca do antígeno a ser reconhecido. A ativação dos linfócitos B específicos para o antígeno inicia-se pela ligação do antígeno às moléculas de imunoglobulina (Ig) da membrana. A IgM e a IgD de membrana são os receptores antigênicos das células B virgens. A ligação desses receptores ao antígeno libera sinais bioquímicos para as células B que iniciam o processo de ativação. Essa ativação é acentuada pelas proteínas do complemento que se ligam aos antígenos de

microrganismos ou aos anticorpos neutralizantes e interagem com o receptor CD21 das células B. A interação entre linfócitos T e B ativados estimula a expansão clonal da célula B, a mudança de isotipo e a diferenciação em células B de memória (Baumgarth, N., 2000). Após ativação pelos linfócitos CD4<sup>+</sup>, as células B produzem anticorpos antivirais específicos. Apesar dos vírus serem agentes intracelulares, os anticorpos têm papel importante no combate às infecções virais, uma vez que após multiplicarem-se, os vírus rompem as células infectadas, ficando livres até a penetração em outra célula. Nessa fase extracelular os anticorpos podem ligar-se aos vírus e, por meio do mecanismo de neutralização, impedir que eles penetrem em células não infectadas. Alternativamente, anticorpos podem participar do mecanismo de citotoxicidade celular dependente de anticorpos ao se ligarem às células infectadas, permitindo a ação das células NK e também do sistema do complemento (Santoli, D., G. Trinchieri, et al., 1978). Devido ao fato desses anticorpos permanecerem no soro por meses ou até mesmo anos, eles são os principais atuantes na prevenção inicial contra uma reinfecção (Fang, M. e L. J. Sigal, 2005; Precopio, M. L., M. R. Betts, et al., 2007).

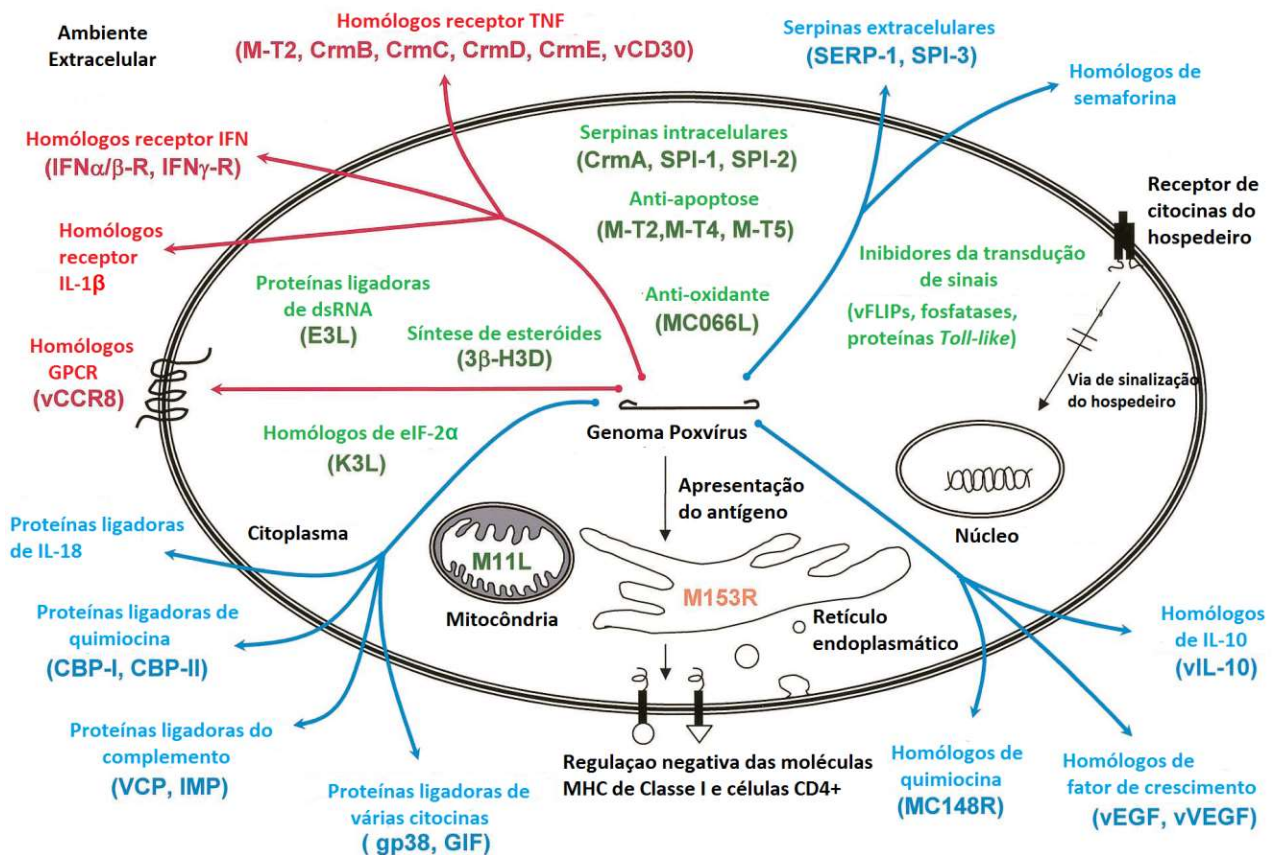
## 5. Estratégias imunomoduladoras dos *Orthopoxvirus*

Para escapar da resposta imune do hospedeiro, os OPXV possuem genes que codificam proteínas de evasão imune (Moss, B. e J. L. Shisler, 2001; Johnston, J. B. e G. Mcfadden, 2003; Liu, L., Z. Xu, et al., 2005). Esses vírus possuem como alvo muitos mediadores da imunidade inata incluindo IFNs, TNFs, interleucinas (IL), sistema do complemento e quimiocinas. Eles também são capazes de interferir em várias vias de sinalização celular. Acredita-se que muitos dos genes de imunomodulação dos OPXV tenham sido adquiridos horizontalmente, a partir dos próprios hospedeiros (Seet, B. T., J. B. Johnston, et al., 2003).

As proteínas imunomoduladoras dos OPXV podem ser divididas em três classes principais: proteínas de viromimetismo (virocinas e viroceptores), proteínas de virocamuflagem e virotransdutores (**FIGURA 8**). Essas moléculas têm como alvo vias celulares específicas pelas quais o hospedeiro coordena e regula a resposta inflamatória precoce. As virocinas são proteínas virais secretadas que mimetizam moléculas de regulação do hospedeiro, como citocinas e reguladores do complemento (Esposito, J. J. e F. Fenner, 2001, Seet, B. T., J. B. Johnston, et al., 2003). Os viroceptores, que podem ser secretados ou estar localizados na superfície das células

infectadas, estão relacionados aos receptores celulares e agem sequestrando os ligantes indutores dos processos antivirais. As proteínas de virocamuflagem subvertem as vias de apresentação de antígenos das células infectadas fazendo com que estas células não sejam reconhecidas pelo sistema imune e os virotransdutores são proteínas intracelulares que interferem nas vias sinalizadoras ou efetoras (*Esposito, J. J. e F. Fenner, 2001; Kotwal, G. J., 2000; Moss, B. e J. L. Shisler, 2001; Johnston, J. B. e G. Mcfadden, 2003*).

O sistema do complemento é formado por uma rede de proteínas integradas capaz de destruir os vírus ou as células infectadas através da via clássica (dependente de anticorpos) ou alternativa (independente de anticorpos), desempenhando um importante papel no controle das infecções por OPXV. Entretanto, o VACV desenvolveu estratégias para escapar de ambas as vias do complemento (*Haga, I. R. e A. G. Bowie, 2005*). A proteína controladora do complemento (VCP) do VACV é secretada pelas células infectadas e inibe ambas as vias através da ligação com as proteínas do complemento C3b e C4b (*Moss, B. e J. L. Shisler, 2001; Johnston, J. B. e G. Mcfadden, 2003*). A VCP também se liga à proteína A56 (conhecida como hemaglutinina) que está presente na superfície das células infectadas e nas partículas EEV. Essa interação protege as células e as partículas EEV contra a ação do complemento (*Dehaven, B. C., N. M. Girgis, et al., 2010*).



**FIGURA 8: Representação esquemática de algumas proteínas imunomoduladoras codificadas pelos poxvírus.** Proteínas virais que participam da virocamuflagem (laranja), virotransdução (verde) e viromimetismo (viroreceptores em vermelho e virocinas em azul) estão indicadas. Fonte: adaptado de Johnston, J. B. e G. Mcfadden, 2003.

Todos os tipos de IFNs são cruciais para restringir a infecção por OPXV. Van Den Broek e colaboradores, em 1995, mostraram que camundongos deficientes em receptores para IFN se tornam mais susceptíveis à infecção por VACV, indicando a importância dessas moléculas no controle da infecção por esses vírus (Van Den Broek, M. F., U. Muller, et al., 1995). Portanto, não é surpreendente que os OPXV expressem proteínas capazes de neutralizar a atividade dos IFN. O VACV consegue reduzir a produção do IFN minimizando a produção de PAMP (por exemplo: dsRNA) ou evitando o seu reconhecimento, expressando proteínas que bloqueiam a via de sinalização induzida pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRR) que ativam fatores de transcrição levando a produção de IFN, além de inibirem a síntese de proteínas do hospedeiro. O VACV também secreta proteínas que se ligam aos IFN impedindo que estes se liguem aos seus receptores, além de proteínas que bloqueiam a transdução de sinal gerada pela ligação do IFN ao seu receptor. Por fim, as proteínas do VACV atuam dentro das células infectadas inibindo a ação

antiviral induzida pelo IFN (*Smith, G. L., C. T. Benfield, et al., 2013*). Esses vírus possuem genes, denominados B18R/B19R (B18R no WR e B19R em outras espécies como o VACV Copenhagen) e B8R, que codificam receptores solúveis para IFNs tipo I e II, respectivamente. Esses receptores, quando secretados, competem com os receptores celulares inativando as propriedades antivirais dessas citocinas. Além disso, esses vírus possuem genes (E3L e K3L) que codificam proteínas capazes de inibir os efeitos intracelulares dos IFN através do bloqueio de alguns pontos-chaves das vias de sinalização dessas citocinas, o que ocasiona o impedimento da degradação do RNA viral e da inibição de síntese proteica nas células infectadas (*Haga, I. R. e A. G. Bowie, 2005*).

Outras citocinas também são alvos de inibição pelos OPXV. O TNF- $\alpha$  é uma potente citocina secretada por macrófagos e células T ativadas e que se liga a receptores TNFR induzindo uma resposta pró-inflamatória ou morte das células infectadas, portanto também é um excelente alvo para a regulação imune pelos OPXV. Esses vírus também produzem receptores solúveis homólogos ao TNFR que se ligam e sequestram o TNF extracelular. A quantidade e o tipo dos genes codificadores para o receptor de TNF variam entre as espécies de OPXV. Como exemplo, pode-se citar o gene A53R dos VACV (*Moss, B. e J. L. Shisler, 2001; Johnston, J. B. e G. Mcfadden, 2003; Seet, B. T., J. B. Johnston, et al., 2003*).

A família da IL-1 compreende potentes citocinas pró-inflamatórias que controlam diversos processos inflamatórios iniciais. Muitas espécies de OPXV secretam receptores homólogos para a citocina IL-1 $\beta$ . Como exemplos, podemos citar os genes B15R do VACV e B14R do CPXV. O vírus WR também pode inibir a IL-1 $\beta$  através da proteína codificada pelo gene B13R que bloqueia a caspase-1, proteína que cliva o precursor da IL-1 $\beta$  (pro-IL-1 $\beta$ ) (*Seet, B. T., J. B. Johnston, et al., 2003; Haga, I. R. e A. G. Bowie, 2005*).

O gene C12L do VACV codifica a proteína IL-18BP que se liga a citocina IL-18, inativando-a. A IL-18 é capaz de estimular a síntese de várias outras citocinas e quimiocinas, regular as respostas Th1 e Th2 e ativar células T e NK (*Moss, B. e J. L. Shisler, 2001; Seet, B. T., J. B. Johnston, et al., 2003*). Outros OPXV, tais como o CPXV e o MPXV, também possuem proteínas que se ligam a IL-18.

Além das citocinas, as quimiocinas também são produzidas na resposta à infecção viral e coordenam a ativação e migração de leucócitos para o sítio de infecção. Os OPXV possuem estratégias para modular esses mediadores através da produção de proteínas que se ligam a

quimiocinas e homólogos de seus receptores, prevenindo a ativação e quimiotaxia de leucócitos (Johnston, J. B. e G. Mcfadden, 2003).

A apoptose é a morte celular programada designada para eliminar células defeituosas, não mais necessárias ou que expressem antígenos de patógenos intracelulares em sua superfície. Ela pode ser um efetivo mecanismo antiviral, particularmente se é desencadeada durante a fase inicial da infecção. Os OPXV regulam essa resposta do hospedeiro através da produção de proteínas que são rapidamente expressas durante os estágios iniciais da replicação. Essas proteínas anti-apoptóticas possuem diferentes modos de ação. Elas podem ser secretadas e neutralizar sinais emitidos para o meio extracelular ou podem atuar manipulando as vias de morte celular no interior da célula hospedeira (Seet, B. T., J. B. Johnston, et al., 2003). Um exemplo é a proteína anti-apoptótica produto do gene E3L (já mencionada anteriormente) que previne a ativação da PKR. Essa proteína, quando ativada, interrompe a tradução celular e induz a apoptose. (Haga, I. R. e A. G. Bowie, 2005). Já a proteína CrmA do vírus cowpox protege a célula infectada contra a apoptose induzida pelas CTLs e células NK através da inibição da perforina granzima B que quando atinge as células alvo inicia o processo apoptótico dependente de perforina (Seet, B. T., J. B. Johnston, et al., 2003).

Um estudo com seres humanos na fase aguda da infecção por VACV, durante surtos em fazendas do interior de Minas Gerais, mostrou que os OPXV causam uma modulação negativa de determinados componentes do sistema imune do hospedeiro. Os indivíduos infectados apresentaram uma diminuição significativa na frequência das células T CD4<sup>+</sup>, linfócitos B e monócitos expressando marcadores de ativação. Esses resultados sugerem que essas células são determinantes para o controle da infecção e eliminação do vírus pelo hospedeiro humano, uma vez que os vírus, em geral, costumam regular os componentes do sistema imune que são mais eficientes em impedir o seu sucesso replicativo (Silva Gomes, J. A., F. F. De Araujo, et al., 2012).

Devido ao fato de que o MVA possui alguns genes de imunomodulação, o grupo do laboratório de virologia básica e aplicada (LVBA) da Universidade Federal de Minas Gerais resolveu avaliar a resposta imune induzida pelo vírus MVA através da infecção intranasal de camundongos BALB/c e comparou-a com as respostas induzidas pelas amostras LST e WR. Em conjunto, os resultados mostraram que o MVA não induziu, em nenhum dos parâmetros estudados (ativação celular e produção de citocinas intracitoplasmáticas), uma modulação negativa das células do sistema imune, diferentemente da amostra WR, que se mostrou bastante eficiente em modular

negativamente o sistema imune do hospedeiro. Já a amostra LST, que é atenuada, porém replicativa, apresentou um perfil intermediário entre WR e MVA em relação ao potencial imunomodulador da resposta do hospedeiro. Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios para a utilização do MVA como vetor vacinal, uma vez que para a produção de uma vacina é interessante que o seu vetor não induza uma modulação negativa do sistema imune do hospedeiro nem uma resposta exacerbada contra suas próprias proteínas (*Daher Freitas, L. F., 2011*).

Entretanto, a busca pelo melhoramento de vetores vacinais é constante. Para isso é necessário entender melhor as funções de genes que participam da interação do vírus com o hospedeiro. Inicialmente o gene escolhido como objeto de estudo deste trabalho foi o gene B18R/B19R, que codifica um receptor solúvel para IFN tipo I. Entretanto, surgiu a oportunidade de estudar também os genes D9R e D10R, responsáveis pela remoção do CAP 5' dos mRNA celulares e virais. Esses três genes serão detalhados nos próximos tópicos (5.1 e 5.2) da introdução.

## 5.1 B18R

O gene que codifica o receptor solúvel para IFN tipo I na amostra Copenhagen é o B19R, entretanto na amostra WR ele é conhecido como B18R ou WR-200. Devido ao maior número de trabalhos na literatura se referindo a esse gene como B18R, escolheu-se adotar essa nomenclatura durante todo o trabalho. Portanto a proteína codificada por esse gene recebe o nome de B18.

Em 1995, Symons e colaboradores demonstraram que a maioria dos OPXV expressa um receptor solúvel para os IFN tipo I. Na amostra WR esse receptor é uma glicoproteína de 60 a 65 KDa pertencente à super família das Ig que pode ser encontrada na superfície da célula infectada ou pode ser secretada dela. Eles também mostraram que o B18R é um gene precoce e que o receptor solúvel para IFN codificado pelo VACV tem maior afinidade para os IFNs humanos do que o próprio receptor humano. Por fim, eles geraram um vírus WR sem o gene B18R e verificaram que esse vírus é menos virulento para camundongos infectados pela via intranasal do que a amostra WR selvagem (*Symons, J. A., A. Alcamí, et al., 1995*). Antes desse trabalho, acreditava-se que esse gene codificava o antígeno S expresso na superfície das células infectadas pela maioria dos OPXV e que a sua expressão precoce teria um papel fundamental na indução da resposta imune do hospedeiro (*Ueda, Y., M. Ito, et al., 1969; Ueda, Y., I. Tagaya, et al., 1972; Ueda, Y., S. Morikawa, et al., 1990; Morikawa, S. e Y. Ueda.; 1993*).

O receptor solúvel para IFN tipo I dos OPXV é capaz de se ligar e neutralizar esses IFN de diferentes espécies – seres humanos, camundongos, ratos, bovinos e coelhos, embora a afinidade pelo IFN tipo I de camundongo seja menor do que para as outras espécies testadas. Além disso, foi demonstrado que este receptor se liga à uma variedade de IFN do tipo I dos seres humanos (IFN- $\alpha$ 1, - $\alpha$ 2, - $\alpha$ 7, - $\alpha$ 8, - $\omega$ , - $\beta$ ) inibindo sua atividade antiviral (*Colamonici, O. R., P. Domanski, et al., 1995; Symons, J. A., A. Alcami, et al., 1995; Liptakova, H., E. Kontsekkova, et al., 1997*). Em 1998, Vancova e colaboradores mostraram que o receptor solúvel codificado pelo gene B18R também é capaz de se ligar ao IFN- $\delta$  de suínos inibindo a sua ligação ao receptor celular (*Vancova, I., C. La Bonnardiere, et al., 1998*).

A maioria dos OPXV expressa o B18R, mas a amostra Lister (LST) não possui esse gene e o MVA possui uma deleção de 20 nucleotídeos que causou uma mudança na janela de leitura resultando no aparecimento de um códon de parada precoce, portanto o gene é truncado na extremidade C-terminal. A proteína codificada pelo gene B18R é expressa na célula infectada apresentando dois pesos moleculares – 52 e 60 a 65 kDa – sendo que a última é encontrada secretada no meio extracelular. A secreção da proteína pelas células infectadas com VACV se deve à presença de um peptídeo sinal na porção N-terminal e à ausência de um domínio transmembrana hidrofóbico na região C-terminal. O receptor possui 3 domínios do tipo Ig e acredita-se que o domínio da porção N-terminal esteja envolvido na ligação do receptor com a membrana plasmática e o domínio da porção C-terminal na interação com o IFN (*Alcami, A., J. A. Symons, et al., 2000*).

A maioria dos receptores de citocinas ou de proteínas que se ligam à outras proteínas, produzida pelos OPXV, é secretada no meio extracelular. A B18 interage com os glicosaminoglicanos presentes na superfície celular e por isso, esse receptor é capaz de se ligar à superfície de grande uma variedade de células (*Montanuy, I., A. Alejo, et al., 2011*). Acredita-se que o receptor solúvel para IFN tipo I seja secretado e em seguida se ligue tanto nas células infectadas quanto nas não infectadas que estão ao redor. Inibindo assim a ligação do IFN ao seu receptor celular e evitando o estado antiviral desencadeado por essa ligação (*Alcami, A., J. A. Symons, et al., 2000*).

Waibler e colaboradores, em 2009, mostraram que o MVA induz a produção de IFN tipo I ao infectar DC de camundongos, diferentemente do VACV. E que em uma condição de co-infecção com esses dois vírus a produção de IFN não era vista, ou seja, proteínas produzidas pelo VACV



inibiam a resposta de IFN tipo I desencadeada pelo MVA. Symons e colaboradores mostraram que a proteína B18 se liga eficientemente ao IFN- $\alpha$  de camundongo, mas se liga com baixa afinidade ao IFN- $\beta$ . Já Waiber e colaboradores mostraram que uma proteína B18 recombinante inibe a resposta de IFN- $\alpha$  induzida pelo MVA, mas não afeta a resposta do IFN- $\beta$ . Portanto, eles propuseram que existe um outro inibidor, ainda não identificado, capaz de neutralizar a resposta do IFN- $\beta$  (Symons, J. A., A. Alcami, et al., 1995; Waibler, Z., M. Anzaghe, et al., 2009).

O receptor solúvel para IFN tipo I é codificado pelos genes B17R e B16R nas espécies VARV e MPXV, respectivamente. Ambas as proteínas são ativas e foram capazes de bloquear a atividade antiviral de oito IFN tipo I humanos, com um perfil inibitório similar ao apresentado pela B18. B17 e B16 também são capazes de se ligar nas superfícies das células infectadas e não infectadas (Fernandez De Marco Mdel, M., A. Alejo, et al., 2010). O vírus ECTV também expressa um receptor solúvel para IFN tipo I que possui 88% de identidade com a sua proteína ortóloga B18. Essa proteína é muito importante para a virulência do vírus, uma vez que quando ela é removida do genoma viral o ECTV se torna bem menos virulento em camundongos BALB/c do que o vírus selvagem. Xu e colaboradores inocularam 300 PFU do vírus ECTV selvagem na pata traseira esquerda dos camundongos e todos os animais vieram a óbito e inocularam até  $5 \times 10^7$  PFU do vírus recombinante e todos os camundongos sobreviveram à infecção. Além disso, estes autores descobriram que esse receptor solúvel é alvo da produção de anticorpos e que animais imunizados com essa proteína recombinante sobrevivem à infecção por ECTV (Xu, R. H., M. Cohen, et al., 2008).

Devido a importância dos genes dos OPXV que atuam bloqueando os efeitos causados pelos IFN, alguns pesquisadores já começaram a estudar a remoção desses genes em vetores vacinais. Gomez e colaboradores, em 2012, removeram os genes B8R (codifica um receptor solúvel para IFN tipo II) e B18R do genoma da amostra atenuada NYVAC contendo proteínas do HIV. Essa deleção causou um aumento na magnitude e na qualidade funcional das células T CD8<sup>+</sup>, citotóxicas e de memória, específicas para o HIV, sem alterar a resposta das células T CD4<sup>+</sup> ou a resposta humoral contra as proteínas do HIV (Gomez, C. E., B. Perdiguero, et al., 2012). Outra utilização aplicada do gene B18R foi a inserção deste gene no genoma de um vírus oncolítico gerado a partir do HHV-1. Esse vírus possui diversos genes que inibem as respostas de IFN, entretanto esses genes atuam somente dentro das células. Por isso Fu e colaboradores tiveram a ideia de inserir o gene B18R no herpesvírus oncolítico, a fim de aumentar a proteção contra a

atuação do IFN. Como resultado eles verificaram que “in vitro” a atividade antitumoral do HHV-1B18R foi mantida mesmo na presença de altas concentrações de IFN, o que não aconteceu com o vírus sem a adição do gene. Além disso, quando o vírus HHV-1B18R foi injetado dentro de um tumor bem estabelecido em camundongos, uma melhora na atividade antitumoral foi obtida em comparação com o vírus HHV-1 (*Fu, X., A. Rivera, et al., 2012*).

## 5.2 D9R e D10R

Os genes D9R (WR-114) e D10R (WR-115) codificam proteínas que são 25% idênticas entre si. O D10R é conservado em todos os poxvírus sequenciados e o gene D9R está presente na maioria dos chordopoxvírus sugerindo, assim, que eles possuem uma função essencial. O D9R é um gene precoce e o D10R é um dos poucos genes tardios que não é empacotado na partícula viral, o fato de eles serem expressos em fases diferentes do ciclo indica que eles desempenham papéis durante toda a replicação viral. Interessantemente as duas proteínas contêm motivos “mutT”, uma sequência características das enzimas nudix hidrolases que clivam nucleosídeos difosfatos ligados a outros radicais. As proteínas que contêm o mutT possuem uma vasta gama de atividades, mas a mais relevante para as proteínas D9 e D10 é a clivagem do cap 5' dos mRNA expondo estes mRNA à ação das exonucleases (*Parrish, S. e B. Moss., 2006*).

D10R é um dos poucos genes conservados em todas as sequências dos poxvírus que não é essencial para a replicação do vírus em cultura de células. A amostra WR sem o gene D9R (WR $\Delta$ D9) forma placas de lise menores do que a amostra selvagem, entretanto as placas formadas pelo vírus sem o gene D10R (WR $\Delta$ D10) são ainda menores além de apresentarem um rendimento menor de partículas virais na curva de ciclo único. Os mRNA celular e viral nas células infectadas com o WR $\Delta$ D10 persistem viáveis por mais tempo do que os das células infectadas com WR e WR $\Delta$ D9. Esses resultados confirmam a descoberta de que quando a proteína D10 é superexpressa acontece uma aceleração do mRNA “turnover” (balanço entre a síntese do mRNA e a sua degradação), ou seja, a quantidade de transcritos diminui. Esse fenômeno também ocorre durante uma superexpressão do D9R, porém com uma menor intensidade. Existem inúmeras razões para explicar porque regular o “turnover” dos mRNA é vantajoso para os vírus. A mais óbvia é que a degradação dos mRNA celulares elimina a competição pela maquinaria de síntese proteica além de diminuir a resposta antiviral do hospedeiro. A segunda é que um rápido “turnover” dos mRNA

virais acelera a transição entre os estágios precoce e tardio da replicação viral (*Shors, T., J. G. Keck, et al., 1999; Parrish, S. e B. Moss., 2006*).

Já se sabia que os OPXV codificam inúmeros fatores que regulam positivamente a expressão gênica viral, inclusive enzimas que adicionam o cap na extremidade 5' do mRNA viral aumentando a sua estabilidade e sua tradução. Mas, em 2007, Parrish e colaboradores demonstraram pela primeira vez que as proteínas D9 e D10 funcionam como reguladores negativos da expressão gênica celular e viral. Eles provaram em estudo “in vitro” que ambas as proteínas foram capazes de remover o cap do mRNA e que proteínas que possuíam mutações no sítio catalítico (motivo mutT) perdiam essa capacidade. Após a remoção do cap o mRNA é degradado pelas exonucleases celulares (*Parrish, S. e B. Moss., 2007; Parrish, S., W. Resch, et al., 2007*).

Um novo estudo foi realizado inativando-se a proteína D10, desta vez ao invés de substituir a ORF D10R pela da proteína verde fluorescente aprimorada (EGFP, do inglês *Enhanced Green Fluorescent Protein*) foram feitas duas mutações pontuais no sítio catalítico da enzima ou foram inseridos dois códons de parada na porção N-terminal. Diferentemente do que foi visto anteriormente os vírus mutantes apresentaram tamanhos de placas similares ao vírus selvagem além de rendimentos parecidos na curva de ciclo único, indicando que a inserção do EGFP pode ter alterado as ORF vizinhas. Entretanto os mRNA viral e celular continuaram persistindo por mais tempo nas células infectadas com o mutante, além disso, a síntese das proteínas virais começavam um pouco mais tarde nessas células. Este estudo foi o primeiro a analisar o efeito da ausência da proteína D10 na virulência do vírus em camundongos. Os animais infectados com os vírus mutantes tiveram uma menor perda de peso e taxa de mortalidade do que os animais que foram infectados com o vírus selvagem. Além disso, o título viral nos órgãos dos animais infectados com os vírus mutantes foi significativamente menor (*Liu, S. W., L. S. Wyatt, et al., 2014*).

Em um recente estudo, Liu e colaboradores geraram pela primeira vez um vírus WR cujas proteínas D9 e D10 foram inativadas. A dupla mutação reduziu drasticamente a replicação viral em células humanas e em células de macaco e causou uma grande atenuação “in vivo”. Surpreendentemente eles descobriram que nas linhagens celulares HeLa e BS-C-1 infectadas com o vírus duplo mutante acontecia um bloqueio da síntese das proteínas virais tardias. Além disso, também notaram nessas células uma maior degradação dos mRNA, clivagem do RNA ribossomal, acúmulo de RNA de fita dupla (dsRNA) e aumento da fosforilação dos componentes das vias de reconhecimento do dsRNA – PKR, p-eIF2 $\alpha$  e IFR3. Com este trabalho eles conseguiram mostrar

evidências de que as proteínas D9 e D10 previnem o acúmulo de dsRNA e a subsequente ativação da resposta antiviral (*Liu, S. W., G. C. Katsafanas, et al., 2015*).

**Justificativa**

---

Infecções humanas causadas por OPXV estão intimamente ligadas à história do desenvolvimento médico-científico. Mas após a erradicação da varíola, o interesse médico por esses vírus diminuiu drasticamente. Entretanto, as recentes mudanças político-sociais no mundo trouxeram de volta o temor de que esses vírus possam estar novamente associados a importantes surtos infecciosos em seres humanos. Esse temor se concentra, principalmente, no uso ou liberação indevida do VARV como ato bioterrorista. Além disso, infecções causadas por outros membros do gênero têm surgido ou aumentado de forma alarmante, causando um grande impacto na saúde animal e humana.

Devido à suspensão da vacinação em massa contra a varíola, o número de pessoas que não são imunes ao VARV vem aumentando. Conseqüentemente tem-se criado um nicho na população humana para outros OPXV, resultando na transmissão dos vírus animais para os humanos, tais como o MPXV na África e o CPXV na Europa. Outros exemplos referem-se a surtos de vaccínia bovina no Brasil. Esses surtos afetam, principalmente, zonas rurais das regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste acometendo pequenos produtores de leite, comprometendo centenas de propriedades e acarretando grande perda econômica.

Após a disseminação de esporos de *Bacillus anthracis* por bioterroristas nos Estados Unidos, recursos foram alocados para o desenvolvimento de vacinas contra os patógenos que apresentam potencial para serem utilizados como arma biológica. Um exemplo é o VARV, pois a varíola é capaz de matar milhões de pessoas por ser uma doença associada a altas taxas de mortalidade/morbidade e que se dissemina rapidamente dentro da população. Devido ao medo da reintrodução do VARV, pesquisas utilizando os poxvírus ressurgiram, principalmente aquelas que visam o desenvolvimento de drogas antivirais e vacinas mais seguras.

Uma vacina segura contra a varíola também protegeria os seres humanos contra outras infecções causadas pelos OPXV. A amostra MVA é considerada como uma das principais vacinas candidatas para garantir uma proteção segura contra as infecções causadas pelos vírus desse gênero. Essa amostra viral combina elementos desejáveis tais como o alto nível de segurança, a habilidade para ativar a imunidade inata e adaptativa após a imunização e a capacidade para expressar grandes quantidades de antígenos exógenos.

Um estudo recente mostrou que o MVA, apesar de ainda possuir alguns genes de imunomodulação do hospedeiro, diferentemente das amostras de OPXV replicativas (WR e LST), não modula negativamente a maioria dos componentes do sistema imune analisados (*Daher*

*Freitas, L. F., 2011*). Adicionalmente, outros dados também detectaram a presença de imunomodulação em indivíduos infectados por amostras zoonóticas do VACV (*Silva Gomes, J. A., F. F. De Araujo, et al., 2012*). Esses resultados confirmam o potencial do vírus MVA como bom vetor vacinal.

Portanto, o delineamento dos genes imunomoduladores que estão ausentes na amostra MVA é essencial para o entendimento, de uma forma global, da interação dos VACV com a resposta antiviral do hospedeiro. Pois, mesmo sabendo que a segurança e eficácia do MVA como vetor vacinal são bem estabelecidas, a base genética que define essas características ainda não é bem entendida.

Análises de sequências de genomas dos OPXV aumentam o conhecimento da estrutura e função dos genes e o nosso entendimento sobre as interações entre vírus e hospedeiros. A deleção ou inserção de certas sequências de DNA, bem como a inativação de um único gene, podem ser utilizadas para entender a influência dessas sequências na virulência da amostra viral.

Como o MVA foi gerado a partir de um processo de atenuação em que os genes foram deletados de forma aleatória, ao se estudar esses genes isoladamente podemos entender quais papéis exercem na virulência da amostra viral e utilizar esses conhecimentos para produzir, de uma maneira mais racional, novos vetores virais através da deleção de genes específicos.

A remoção de genes imunomoduladores, como é o caso do gene B18R, pode tornar o vírus mais imunogênico, o que seria bom para um vetor vacinal. Um vetor mais imunogênico funciona como um adjuvante para a vacina, porém a resposta imune não deve ser suficiente para bloquear o vetor antes que ele expresse a proteína exógena – no caso de vacinas que possuam reforço ou mesmo vacinas diferentes utilizando o mesmo vetor. Além disso, a remoção desses genes pode tornar vírus replicativos mais atenuados criando maiores opções de vírus que possam ser utilizados como vacinas vivas.

Em algumas circunstâncias, mesmo genes codificadores de proteínas não diretamente relacionadas à imunomodulação das respostas do hospedeiro podem, quando removidos, afetar o *fitness* global da amostra viral, tornando-a ainda mais atenuada e apropriada para o uso vacinal. Neste contexto, tive a oportunidade de cumprir parte do meu doutorado no laboratório de Doenças Virais do NIH, sob a orientação do Dr. Bernard Moss, realizando estudos funcionais dos genes D9R e D10R da amostra MVA, uma vez que já havia sido demonstrado que a subtração destes

genes atenua sobremaneira a amostra virulenta WR do Vaccinia vírus. Portanto, o estudo de cada um desses genes se torna importante para a pesquisa de novas vacinas.



# Objetivos

---

## OBJETIVO

Avaliar o papel dos genes B18R, D9R e D10R através da caracterização “in vitro” de diferentes construções dos vírus *Western Reserve* (WR) e *Vaccinia Ankara* Modificado (MVA) expressando ou não esses genes, além de comparar a imunogenicidade desses vírus em modelo murino.

### Objetivos específicos:

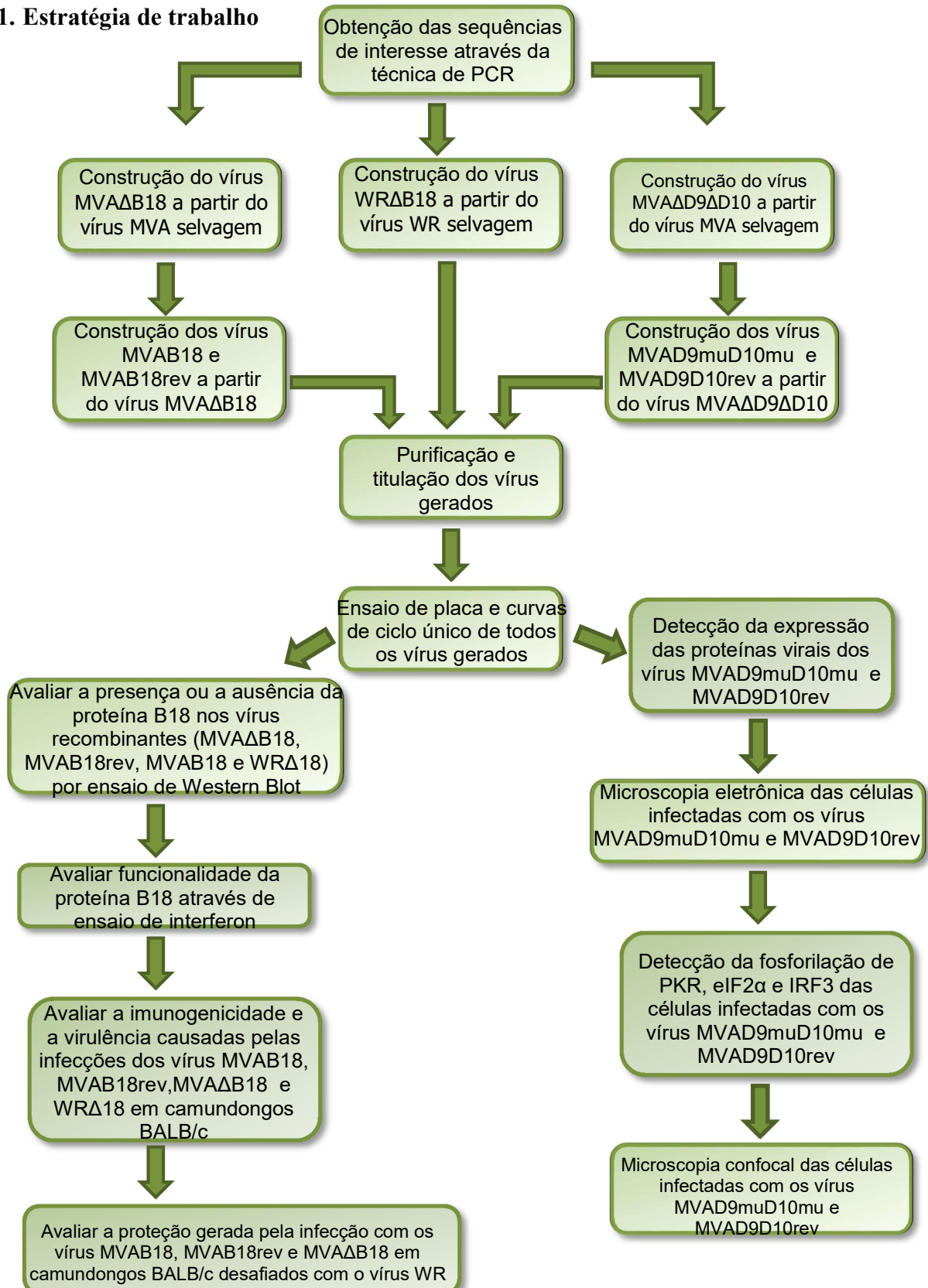
- ✓ Obter as sequências dos genes imunorreguladores de interesse (B18R, D9R e D10R), com ou sem modificações, através de sobreposições de fragmentos de PCR;
- ✓ Gerar, por meio de recombinação homóloga, e selecionar vírus recombinantes contendo as modificações genéticas de interesse (WR $\Delta$ B18, MVA $\Delta$ B18, MVAB18, MVAB18rev, MVAD9muD10mu e MVAD9D10rev);
- ✓ Verificar se as inserções ou deleções prejudicaram a replicação dos vírus através de ensaios de placas e de curvas de ciclo único;
- ✓ Detectar a expressão das proteínas totais dos vírus MVAD9muD10mu e MVAD9D10rev através de ensaios de Western Blot;
- ✓ Verificar a existência de possíveis defeitos no ciclo de replicação do vírus MVAD9muD10mu através da técnica de microscopia eletrônica;
- ✓ Detectar a fosforilação de componentes da via de reconhecimento do RNA de dupla fita (PKR, eIF2 $\alpha$  e IRF3) nas células infectadas pelos vírus MVAD9muD10mu e MVAD9D10rev através de ensaios de *Western Blot*;

- ✓ Verificação da produção de RNA de dupla fita através de microscopia confocal gerada pela infecção dos vírus MVAD9muD10mu e MVAD9revD10rev;
- ✓ Avaliar a presença ou a ausência da proteína B18 nos vírus recombinantes (MVA $\Delta$ B18, MVAB18rev, MVAB18 e WR $\Delta$ 18) por ensaio de *Western Blot*;
- ✓ Testar a funcionalidade dos receptores B18 produzidos pelos vírus recombinantes através de ensaio de interferon;
- ✓ Avaliar a imunogenicidade e a virulência causadas pelas infecções dos vírus MVAB18, MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18 e WR $\Delta$ B18 em camundongos BALB/c.
- ✓ Infecção experimental de camundongos BALB/c para avaliar:
  - a virulência dos vírus recombinantes (MVA $\Delta$ B18, MVAB18rev, MVAB18 e WR $\Delta$ 18) comparados aos vírus selvagens;
  - a ativação (níveis de CD69, CD44, CD62L, Foxp3, MHC-I e MHC-II) em esplenócitos após 14 dias de infecção;
  - a ativação (níveis de CD40, CD80, CD86, MHC-I, MHC-II) em células dendríticas após um dia de infecção;
- ✓ Avaliar a proteção gerada pela infecção com os vírus (MVA $\Delta$ B18, MVAB18rev e MVAB18) em camundongos BALB/c desafiados com o vírus WR.

## **Materiais e Métodos**

---

## 1. Estratégia de trabalho



### Metodologias comuns para todos os vírus recombinantes gerados

## 2. Amostras virais

A amostra viral *Vaccinia Ankara* modificado (MVA) e a amostra *Western Reserve* (WR) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Bernard Moss (Laboratory of Viral Diseases, NIAID, National Institutes of Health - NIH, EUA).

## 3. Células utilizadas para a expansão das amostras virais

### 3.1 Fibroblastos de Embrião de Galinha (CEF)

Os vírus MVA recombinantes, bem como os MVA selvagens, foram amplificados, titulados e selecionados em cultivo primário de células de fibroblasto de embrião de galinha (CEF).

Para a produção de cultivos primários CEF, ovos embrionados com 10 dias de postura foram higienizados com etanol a 70%. Após a retirada da parte superior da casca e da sua membrana, os embriões foram removidos e colocados em uma placa de Petri contendo meio mínimo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) sem soro (Sigma - Aldrich Biotechnology - St. Louis, EUA) suplementado com  $\text{NaHCO}_3$  a 0,25%, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) antifúngico (Anfotericina B 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (meio incompleto). Na da placa de Petri, a cabeça, os membros superiores e inferiores e os órgãos internos dos embriões foram removidos com o auxílio de tesoura e pinça. Em seguida, os embriões foram transferidos e mantidos em outra placa de Petri com meio DMEM sem soro para liberação do sangue. Após esse procedimento, os embriões foram passados através de uma seringa de 10 mL, sem agulha, para dentro de um erlenmeyer contendo cerca de 5 mL de solução de tripsina contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (136mM NaCl; 5mM KCl; 55mM glicose; 69mM  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,5g p/v de tripsina 1:250 [Difco - Sparks, EUA]; 0,5mM EDTA; vermelho de fenol a 1%); por embrião. A suspensão celular foi incubada a 37°C por 15 minutos sob agitação. Após a incubação, a ação da tripsina foi interrompida adicionando-se igual volume de meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB) [Cultilab - Campinas, Brasil],  $\text{NaHCO}_3$  e antibióticos (meio completo). Essa suspensão foi filtrada em um béquer com o auxílio de gaze autoclavada e centrifugada a 1.100 x g por 10 minutos. O sedimento foi suspenso em meio DMEM com 10% de SFB e alíquotas dessa suspensão foram adicionadas a garrafas de cultura celular de 150 cm<sup>2</sup> (TPP – Trasadingen, Suíça).

As garrafas foram incubadas a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem a confluência e os subcultivos foram realizados por no máximo 3 vezes e em intervalos de 3 dias.

### **3.2 Células BS-C-1, BS-C-40, BHK-21, HeLa e Vero**

As células BS-C-1, BS-C-40 e Vero (células epiteliais de rim de macaco verde africano), BHK-21 (células de rim de Hamster bebe) e HeLa (células epiteliais de carcinoma do colo do útero humano) foram obtidas da “American Type Culture Collection”, e foram utilizadas para multiplicação e titulação dos vírus WR, além dos ensaios de placas, curvas de ciclo único e ensaio de interferon dos vírus recombinantes gerados. Essas células foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 5% de SFB, antibióticos (Gentamicina 40µg/ml e Penicilina 200 U/ml) e antifúngico (Anfotericina B 1,5µg/ml), mantidas a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

### **4. Multiplicação viral em cultura celular**

O estoque do vírus WR foi obtido por multiplicação em células BS-C-40 em meio DMEM (Sigma - Aldrich Biotechnology - St. Louis, EUA) suplementado com 5% de SFB (Cultilab - Campinas, Brasil), antibióticos (gentamicina 40µg/ml e penicilina 200 U/ml) e antifúngico (Anfotericina B 1,5µg/ml), em garrafas de cultivo celular de 150 cm<sup>2</sup> (TPP – Trasadingen, Suíça), a 37°C, atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Monocamadas contendo aproximadamente 80 milhões de células foram infectadas com multiplicidade de infecção (M.O.I) de 0,01 a 1 em 5ml de meio incompleto. Após 1 hora de incubação a 37°C, período de adsorção do vírus, a monocamada de células foi lavada com uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) (1,5 mM NaCl; 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2) e foram acrescentados 25mL de meio DMEM suplementado com 2% SFB (Cultilab - Campinas, Brasil). Novamente, as células foram incubadas a 37°C e monitoradas diariamente ao microscópio ótico até a observação de 90% de efeito citopático (ECP), aproximadamente, 48 horas após a infecção. Em seguida, as células foram coletadas das garrafas com o auxílio de um raspador de silicone. A suspensão obtida foi centrifugada durante 10 minutos a 400 x g e o sedimento obtido foi mantido a - 80°C para posterior purificação das partículas virais (*Campos, M. A. S. e E.G., Kroon, 1993*).

O vírus MVA foi rotineiramente multiplicado em CEF em garrafas de cultivo celular de 150 cm<sup>2</sup> (TPP – Trasadingen, Suíça). Tais células foram infectadas com uma M.O.I de 1, sendo a

adsorção em um volume final de 5 mL de meio DMEM incompleto, a 37°C e com homogeneização constante durante 1 hora. Em seguida, a monocamada de células foi lavada com PBS e acrescentados 25 mL de MEM suplementado com 2% de SFB, antibióticos (gentamicina 40µg/ml e penicilina 200 U/ml) e antifúngico (anfotericina B 1,5µg/ml). A garrafa foi novamente incubada a 37°C em uma atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5% por cerca de 72 horas. Após esse período, a monocamada de células foi raspada, com o auxílio de raspadores de silicone, e a suspensão celular foi centrifugada por 10 minutos a 400 x g. O sedimento foi suspenso em 1 mL de meio DMEM incompleto e a suspensão foi congelada em refrigerador -80°C até o momento da purificação viral.

## 5. Purificação viral

O estoque viral obtido no processo de multiplicação foi homogeneizado em 8mL de Tris-HCl (10mM, pH 8,0) e centrifugado a 440 x g durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em gelo. O sedimento celular, por sua vez, foi suspenso em 10 mL de solução de lise (1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM KCl), colocado em gelo e nele mantido por 10 minutos. Em seguida, as células foram lisadas mecanicamente em homogeneizador do tipo “Douncer” (Wheaton - Millville, EUA) por 80 vezes e, então, centrifugadas a 400 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e adicionado ao anterior. O sedimento foi novamente lisado mecanicamente e centrifugado como descrito anteriormente, no entanto apenas 8 mL da solução de lise foram utilizados. Assim, ao juntar todos os sobrenadantes, um total de 26 mL de suspensão viral foi obtido. Essa suspensão foi, então, centrifugada a 14.000 rpm (rotor SW27 – ultra-centrífuga Beckman L3-50) por 2 horas a 4°C sobre um colchão de sacarose a 36% em Tris-HCl (10mM, pH 8,0) para separação dos fragmentos celulares. Após centrifugação, o sobrenadante e a sacarose foram desprezados, e o sedimento, contendo as partículas virais, foi suspenso em 1 mL de Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e estocado a -80°C (*Joklik, W. K., 1962*).

## 6. Titulação das amostras virais em cultura celular / Ensaio de placas

A suspensão viral foi, inicialmente, submetida à sonicação (Branson Sonifier 450) a uma potência de 100% constante em 3 ciclos de 30 segundos, com intervalos de 30 segundos entre cada ciclo. Em seguida, foram feitas diluições seriadas da suspensão viral em meio DMEM incompleto, sendo utilizados 500 µL de cada diluição para infectar as respectivas monocamadas de CEF ou BS-



C-40 (MVA ou WR, respectivamente) em uma placa de 6 poços. Um dos poços não foi infectado sendo reservado para o controle da viabilidade celular, neste poço foram acrescentados apenas 500 µL de meio incompleto. Após 1 hora de adsorção a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a suspensão viral foi coletada e 2 mL de meio carboximetilcelulose (CMC) [Sigma - Aldrich Biotechnology - St. Louis, EUA] contendo 2% de SFB foram adicionados em cada poço e as placas foram incubadas a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 48 ou 72 horas (WR ou MVA, respectivamente).

Para os vírus WR (selvagem ou recombinantes) as células foram fixadas por 30 minutos com solução de formol a 4% e, posteriormente, coradas com solução 1% (p/v) de cristal violeta por 15 minutos. Para os vírus MVA (selvagem ou recombinantes) as células foram coradas pelo método de imunomarcção detalhado no **item 7**.

O título, número de unidades formadoras de placas (PFU) por mL, foi expresso pelo número médio de placas de lise observadas nas cavidades cujas diluições apresentarem entre 30 e 300 placas, multiplicado pelo inverso da diluição e convertido para o volume final de 1mL.

## **7. Imunomarcção**

Os títulos das amostras MVA (selvagem e recombinantes) foram calculados através do ensaio de imunomarcção, uma vez que o MVA não produz placas de lise visíveis em CEF pela marcação com cristal violeta.

O CMC foi removido de cada poço e a monocamada foi fixada com uma solução de 1:1 de metanol e acetona. A solução de fixação foi removida e os poços foram lavados 3 vezes com água corrente. Em seguida as células foram incubadas com o anticorpo primário (obtido em coelhos imunizados com o vírus WR e doado gentilmente pelo Dr. Bernard Moss) diluído 1:5000 em PBS contendo 3% de SFB por 1 hora, sob agitação a temperatura ambiente. Após incubação as células foram lavadas 3 vezes em água corrente e incubadas com Proteína A conjugada com peroxidase (Thermo Fisher Scientific - Waltham, EUA) diluída 1:5000 em PBS contendo 3% de SFB por 1 hora, sob agitação a temperatura ambiente. Após incubação as células foram lavadas 3 vezes em água corrente e reveladas com o substrato o-dianisidina (Sigma - Aldrich Biotechnology - St. Louis, EUA) diluído em PBS com 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

As placas de lise que adquiriram uma coloração marrom foram contadas e o título viral foi calculado da mesma maneira descrita no **item 6**.

## **8. Construção dos fragmentos de interesse para a construção dos vírus MVA recombinantes**

Todas as sequências nucleotídicas utilizadas nas construções dos vírus recombinantes foram obtidas no PBR (Poxvirus Bioinformatics Resource Center – [www.poxvirus.org](http://www.poxvirus.org)). A amplificação e a construção de todos os fragmentos foram feitas através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Em todas as reações utilizamos a Platinum® PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen- Waltham, EUA), 10 pmol do iniciador senso, 10 pmol do iniciador anti-senso e 100 ng do DNA molde. O ciclo utilizado na reação foi feito de acordo com as recomendações do fabricante variando apenas a temperatura de pareamento, de acordo com cada par de iniciadores, e o tempo de extensão.

### **8.1 MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10**

O vírus MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10 foi gerado a partir da amostra MVA. Um produto recombinante foi construído através da técnica de PCR. Este produto foi formado por três fragmentos: o primeiro fragmento continha um flanco composto pela parte da sequência do gene D8L imediatamente à jusante do gene D9R; o outro fragmento continha a sequência do gene EGFP sob o controle de um promotor tardio dos VACV denominado p11; e, por fim, o terceiro fragmento continha um flanco composto pela parte da sequência D11L imediatamente à montante do gene D10R. Os iniciadores para cada reação estão descritos na **TABELA II**.

Três PCRs foram feitas com cada um dos fragmentos citados acima. Os produtos de cada reação, juntamente com um marcador de tamanho molecular, foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1% em Tris/Borato/EDTA (TBE) 1X (89mM Tris base, 89mM ácido bórico, 2 mM EDTA pH 8), acrescido de 0,5  $\mu$ g/mL de brometo de etídio a um potencial elétrico constante de 100 V. Os géis foram visualizados em transluminador ultravioleta e fotografados. A banda referente ao DNA amplificado de interesse foi cortada do gel com bisturi cirúrgico, sendo o DNA purificado utilizando o Kit MinElute® Gel Extraction (Qiagen - Venlo, HOL), conforme instruções do fabricante.

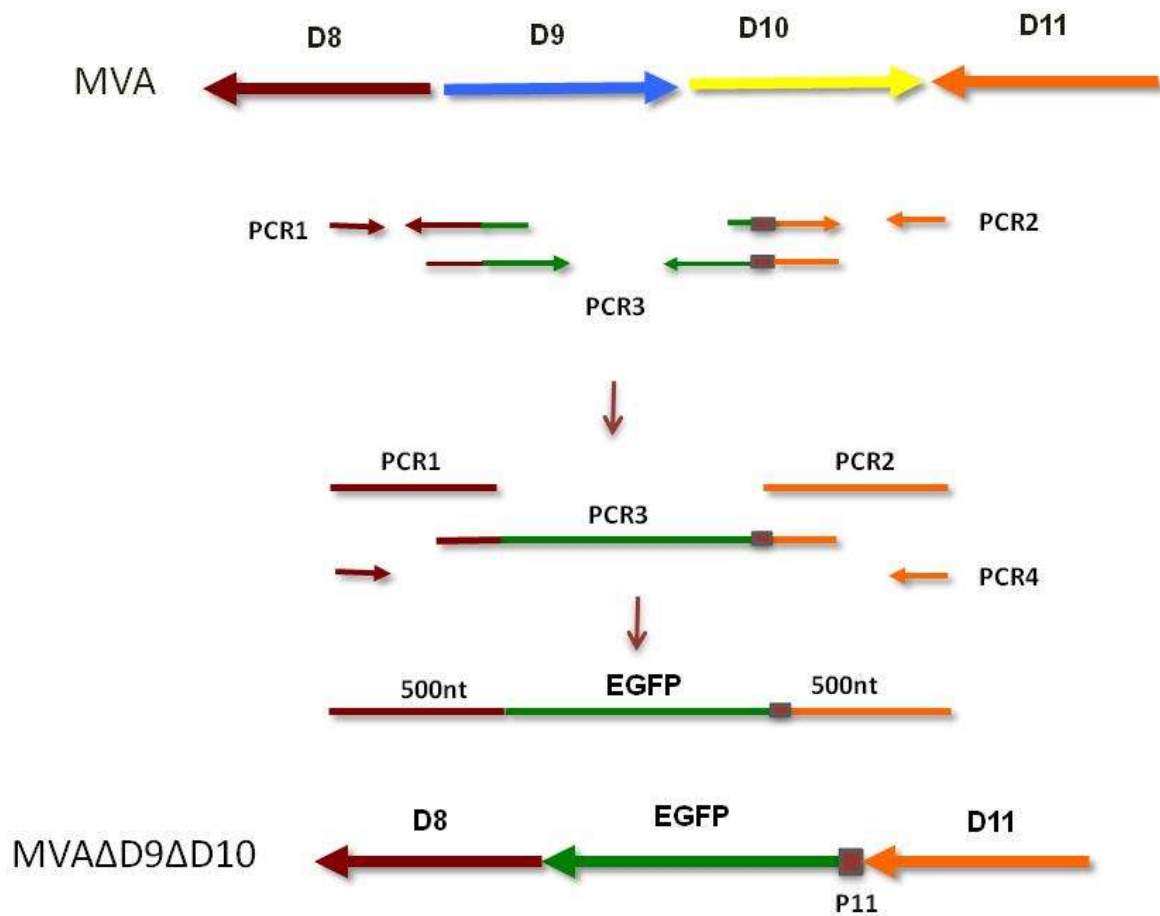
Esses fragmentos apresentavam sobreposições nas extremidades, portanto foi possível juntá-los com uma quarta PCR – formando um fragmento único (**FIGURA 9**). Nesta quarta PCR os 3 fragmentos foram adicionados ao supermix da Taq e foram submetidos a seis ciclos de reação. A temperatura de pareamento foi calculada de acordo com as sequências de sobreposições. Após os seis ciclos o iniciador 5’ da PCR1 e o iniciador 3’ da PCR 2 são adicionados e uma nova reação foi feita para amplificar o fragmento total. Este último fragmento também foi visualizado em gel de agarose 1% e purificado como descrito anteriormente.

TABELA II

**Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na construção do vírus MVAΔD9ΔD10**

<b>Iniciadores</b>	<b>Sequência</b>	<b>Tamanho do amplicon</b>
PCR1: 5’D8	5’ AACTTACTAGGCAGCAAATTGTCTAG 3’	536 pb
3’GFP-D8	5’CCGCGTAATTCCCATACTAAGAGCTATTTTTAAACAG 3’	
PCR2: 5’GFP-D11	5’CCGGTACCAAATAACTGAGGATGATTGATTAGAAAATAT 3’	501 pb
3’D11	5’ TAGTAGGAAGAGCCATTCGTCTC 3’	
PCR3: 5’D8-GFP	5’GCTCTTAGTATGGGAATTACGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCG 3’	773 pb
3’GFP-D11	5’ CAATCATCCTCAGTTAATTTGGTACCGGTCGCCACCGAATTC 3’	

\*em **negrito** as regiões de sobreposições dos fragmentos.



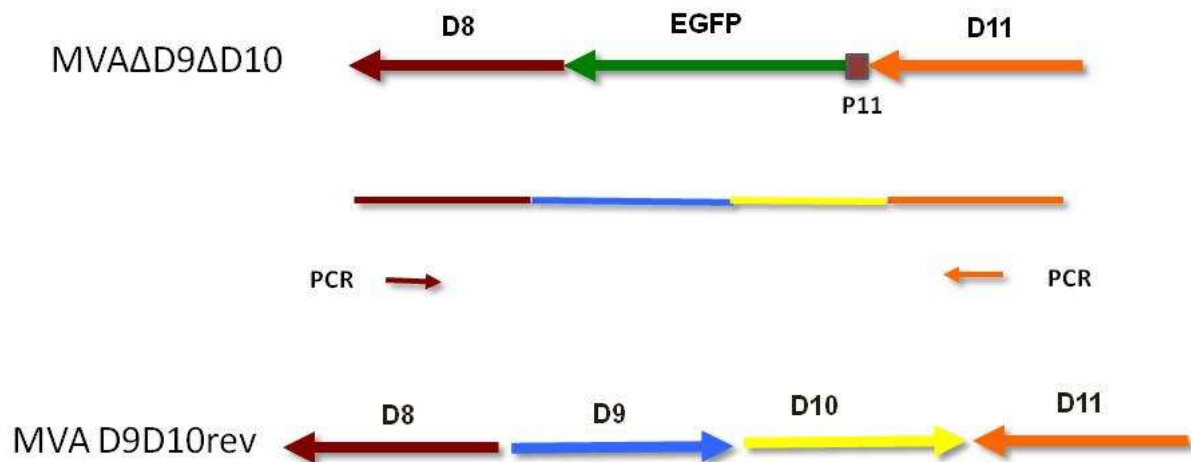
**FIGURA 9: Construção do vírus MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10.** Diagrama mostrando as ORF dos genes: D8L, D9R, D10R, D11L e EGFP. As setas indicam o sentido da transcrição de cada gene. Este esquema mostra como foi gerado o fragmento utilizado na construção do vírus MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10. P11 indica o promotor dos VACV que normalmente regula a expressão tardia do gene que codifica a proteína F18.

## 8.2 MVAD9D10rev

O vírus MVAD9D10rev foi gerado a partir da amostra MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10. Para este vírus um único produto simples de PCR foi necessário (**FIGURA 10**), correspondendo ao fragmento contíguo englobando o flanco D8L, os genes íntegros D9R e D10R e o flanco D11L. O fragmento gerado foi fracionado por eletroforese em gel de agarose 1%, visualizado em transluminador ultravioleta e purificado como descrito no **item 8.1**. Os iniciadores utilizados nesta reação estão descritos na **TABELA III**.

**TABELA III**  
**Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na construção do vírus MVAD9D10rev**

Iniciadores	Sequência	Tamanho do amplicon
PCR1: 5'D8	5' AACTTACTAGGCAGCAAATTGTCTAG 3'	2.365 pb
3'D11	5' TAGTAGGAAGAGCCATTCGTCTC 3'	



**FIGURA 10: Construção do vírus MVAD9D10rev.** Diagrama mostrando as ORF dos genes: D8L, D9R, D10R, D11L e EGFP. As setas indicam o sentido da transcrição de cada gene. Este esquema mostra como foi gerado o fragmento utilizado na construção do vírus MVAD9D10rev. P11 indica o promotor dos VACV que normalmente regula a expressão tardia do gene que codifica a proteína F18.

### 8.3 MVAD9muD10mu

O vírus MVAD9muD10mu foi gerado a partir da amostra MVAΔD9ΔD10, substituindo a ORF do gene EGFP pelas ORF dos genes D9R e D10R contendo duas mutações nos sítios catalíticos de cada uma das enzimas (descrito por *Parrish, S. e B. Moss., 2006*). As mutações da proteína D9 foram feitas nos aminoácidos 129 e 130, já a proteína D10 teve os aminoácidos 144 e 145 alterados. Em todos os casos a substituição foi feita trocando um ácido glutâmico por uma

glutamina. Parrish demonstrou “in vitro” que essas mutações inativavam ambas as enzimas. Os iniciadores para cada reação estão descritos na **TABELA IV**.

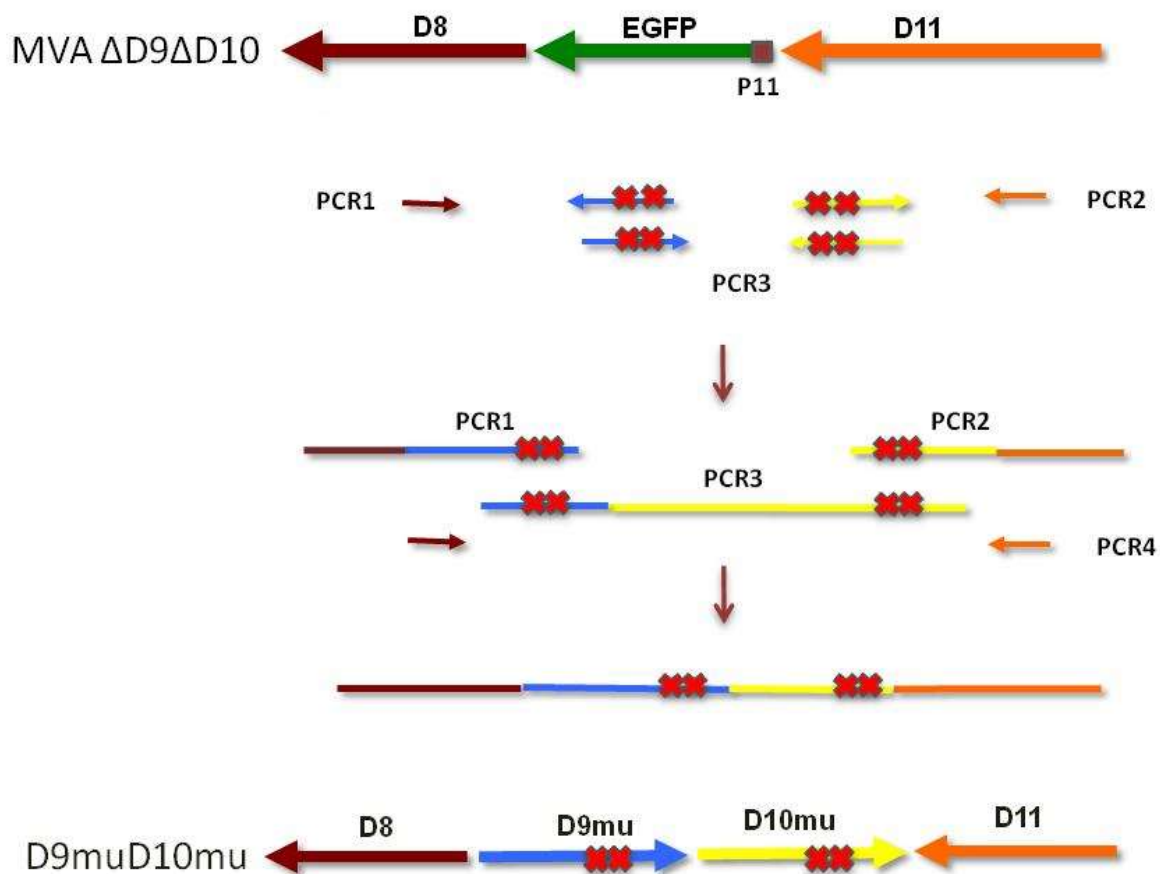
Três PCR foram feitas com cada um dos fragmentos citados acima. Os produtos de cada reação, juntamente com um marcador de tamanho molecular, foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1% em Tris/Borato/EDTA (TBE) 1X (89mM Tris base, 89mM ácido bórico, 2 mM EDTA pH 8), acrescido de 0,5 µg/mL de brometo de etídio a um potencial elétrico constante de 100 V. Os géis foram visualizados em transluminador ultravioleta e fotografados. A banda referente ao DNA amplificado de interesse foi cortada do gel com bisturi cirúrgico, sendo o DNA purificado utilizando o Kit MinElute® Gel Extraction (Qiagen - Venlo, HOL), conforme instruções do fabricante.

Esses fragmentos apresentavam sobreposições nas extremidades, portanto foi possível juntá-los com uma quarta PCR – formando um fragmento único (**FIGURA 11**). A quarta PCR foi feita da mesma maneira descrita no **item 8.1**.

**TABELA IV**  
**Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na construção do vírus**  
**MVAD9muD10mu**

<b>Iniciadores</b>	<b>Sequência</b>	<b>Tamanho do amplicon</b>
PCR1: 5'D8 3'D9 E129-130Q	5' AACTTACTAGGCAGCAAATTGTCTAG 3' 5'CTTTACTGTTATACGTTTCATCACTCTGCTGTTTTAATTCTTCTTAAACAATC 3'	947 pb
PCR2:5'D10 E114-145Q 3'D11	5' GTTTATCCAGGGAAATTAACAGCAGGTTAATATAGACAATTC 3' 5' TAGTAGGAAGAGCCATTCGTCTC 3'	817 pb
PCR3: 5'D9 E129-130Q 3'D10 E144-145Q	5'GATTGTTAAGAAGAGAATTAACAGCAGAGTGATCAACGTATAACAGTAAAAG3' 5'GAATTGTCTATATTAACCTGCTGTTAATTTCCCTGGATAAAC 3'	730 pb

\*em **negrito** as regiões de sobreposições dos fragmentos.



**FIGURA 11: Construção do vírus MVAD9muD10mu.** Diagrama mostrando as ORF dos genes: D8L, D9R, D10R, D11L e EGFP. As setas indicam o sentido da transcrição de cada gene. Este esquema mostra como foi gerado o fragmento utilizado na construção do vírus MVAD9muD10mu. P11 indica o promotor dos VACV que normalmente regula a expressão tardia do gene que codifica a proteína F18. Os X em vermelho indicam as mutações inseridas em cada ORF.

#### 8.4 MVAΔB18

O MVA possui seu gene homólogo a B18R truncado, portanto, para inserir a sequência do B18R do vírus WR no MVA primeiro é preciso remover a sequência truncada existente. Para isso um produto recombinante foi construído através da técnica de PCR. Este produto foi formado por três fragmentos: um contendo um flanco com uma parte final da sequência do gene homólogo a B17R, à jusante de B18R, outro a sequência do gene EGFP com o promotor tardio dos VACV p11 e, por fim, um flanco com uma parte da sequência do gene VACV-Acam3000-190 à montante do

gene truncado de MVA que é homólogo a B18R. Os iniciadores para cada reação estão descritos na **TABELA V**.

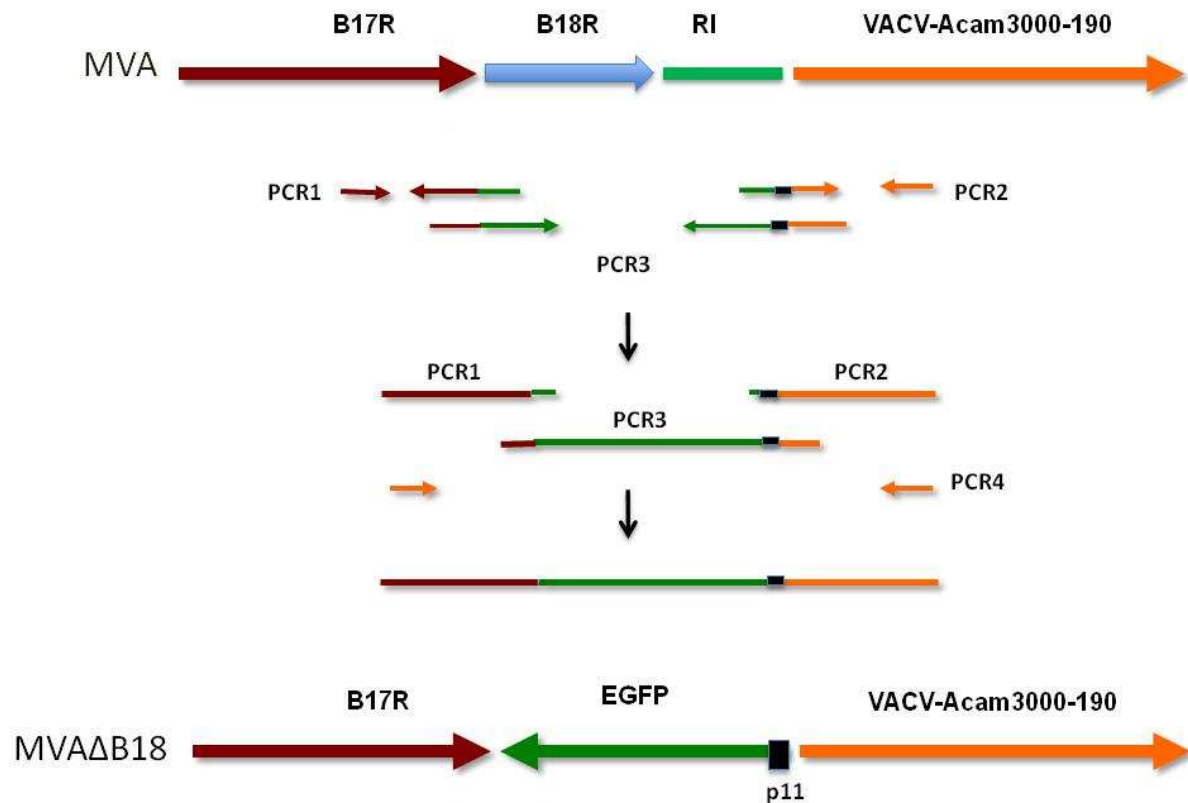
Os três produtos da PCR foram utilizadas em uma quarta reação para formar um único fragmento (**FIGURA 12**). A quarta PCR foi feita da mesma maneira descrita no **item 8.1**.

**TABELA V**  
**Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na construção do vírus MVAΔB18**

<b>Iniciadores</b>	<b>Sequência</b>	<b>Tamanho do amplicon</b>
PCR1: 5'B17R	5' CGTTGGTGGATCAACTTCCATCTCTACC 3'	612 pb
3'B17R-GFP	5'GTAAAGCGGCCTATACGGCACTAAAATATTTATATAATATCAG 3'	
PCR2: 5'RI-GFP	5' GACCGGTACAATACTTACGGTTATACCGTCGCAAGACC 3'	534 pb
3'RI	5' CTCATTCTAAAGCCGTACATCCACATC 3'	
PCR3: 5'GFP-B17R	5' GTGCCGTATAGGCCGCTTTACTTGTACAGCTCGTC 3'	794 pb
3'GFP-RI	5' CCGTAAGTATTGTACCGGTCGCCACCGAATTC 3'	

\*em **negrito** as regiões de sobreposições dos fragmentos.





**FIGURA 12: Construção do vírus MVAΔB18.** Diagrama mostrando as ORF dos genes: B17R, B18R, VACV-Acam3000-190 e EGFP. As setas indicam o sentido da transcrição de cada gene. Este esquema mostra como foi gerado o fragmento utilizado na construção do vírus MVAΔB18. P11 indica o promotor dos VACV que normalmente regula a expressão tardia do gene que codifica a proteína F18. RI significa região intergênica.

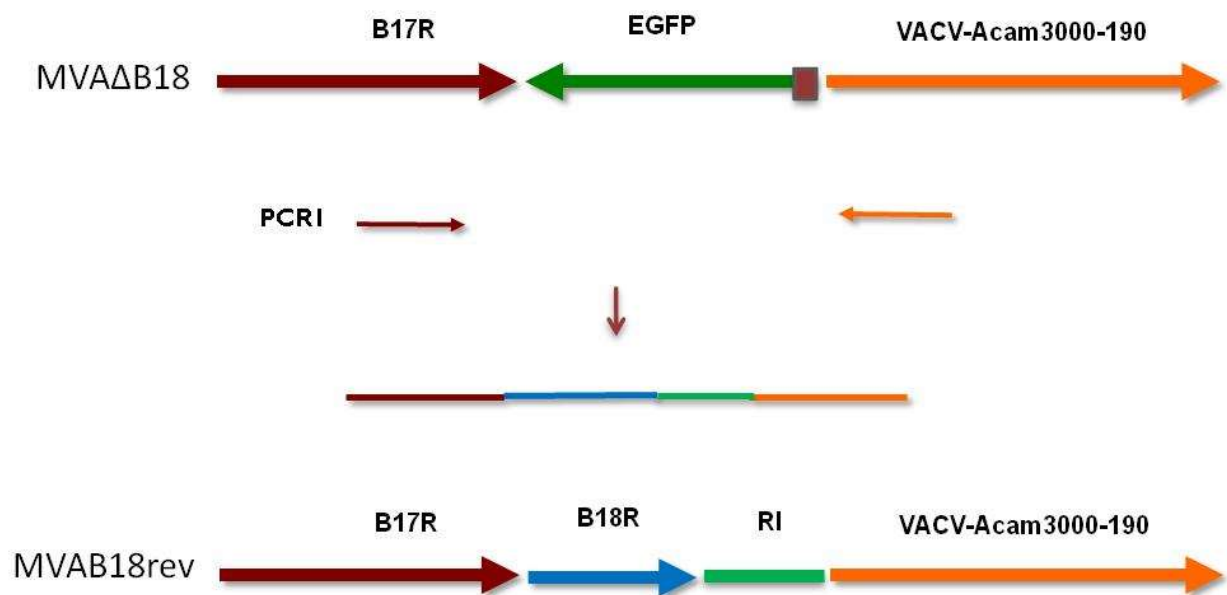
### 8.5 MVAB18rev

O vírus MVAB18rev foi gerado a partir da amostra MVAΔB18. Para este vírus um único produto simples de PCR foi necessário (**FIGURA 13**). O fragmento gerado foi fracionado por eletroforese em gel de agarose 1%, visualizado em transluminador ultravioleta e purificado como descrito no **item 8.1**. Os iniciadores utilizados nesta reação estão descritos na **TABELA VI**.

TABELA VI

Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na construção do vírus MVAB18rev

Iniciadores	Sequência	Tamanho do amplicon
PCR1: 5'B17R	5' CGTTGGTGGATCAACTTCCATCTCTACC 3'	1.831 pb
3'RI	5' CTCATTTCTAAAGCCGTACATCCACATC 3'	



**FIGURA 13: Construção do vírus MVAB18rev.** Diagrama mostrando as ORF dos genes: B17R, B18R, VACV-Acam3000-190 e EGFP. As setas indicam o sentido da transcrição de cada gene. Este esquema mostra como foi gerado o fragmento utilizado na construção do vírus MVAB18rev. P11 indica o promotor dos VACV que normalmente regula a expressão tardia do gene que codifica a proteína F18. RI significa região intergênica.

## 8.6 MVAB18

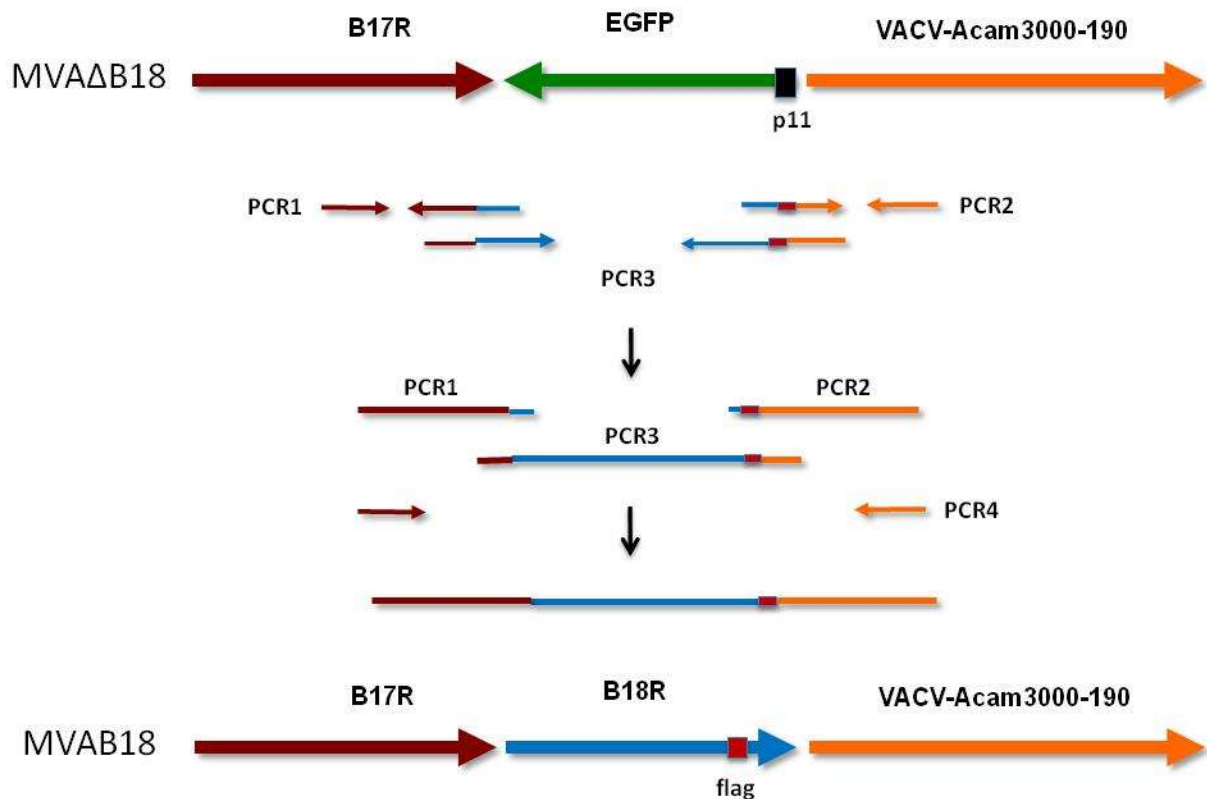
O vírus MVAB18 foi gerado a partir da amostra MVA $\Delta$ B18, substituindo a ORF do gene EGFP pela ORF do gene B18 da amostra WR. Devido à dificuldade de se obter o anticorpo anti-B18R no início do projeto, optamos por colocar uma sequência contendo uma etiqueta de detecção. A etiqueta utilizada foi a FLAG (N-DYKDDDDK-C, Sigma - Aldrich Biotechnology - St. Louis, EUA).

Para isso um produto recombinante foi construído através da técnica de PCR. Este produto foi formado por três fragmentos: um contendo um flanco com uma parte final da sequência do gene de MVA homólogo a B17R, outro a sequência do gene B18R do vírus WR contendo a etiqueta FLAG e, por fim, um flanco com uma parte da sequência do gene VACV-Acam3000-190, à montante de B18R (**FIGURA 14**). Os iniciadores para cada reação estão descritos na **TABELA VII**.

**TABELA VII**  
**Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na construção do vírus MVAB18**

<b>Iniciadores</b>	<b>Sequência</b>	<b>Tamanho do amplicon</b>
PCR1: 5'B17R	5' CGTTGGTGGATCAACTTCCATCTCTACC 3'	547 pb
3'B18R-B17R	5' <b>GAAAAATACA</b> ACTATACTTTGGTAGGTGGATACG 3'	
PCR2: 5'FLAG-Acam3000	5' <b>TGACAAATAA</b> ATACACAATGCATTTTTATATACATTACTG 3'	566 pb
3'B22R	5' <b>GAGAAGAC</b> GGACAGACTTTAACG 3'	
PCR3: 5'B18R-B19R	5' <b>CCAAAGTATAG</b> TTGTATTTTTCTCATGCGATGTGTG 3'	1.167 pb
3'Acam3000-FLAG	5' <b>GCATTGTGTAT</b> TTATTTGTCATCGTCATCC 3'	

\*em **negrito** as regiões de sobreposições dos fragmentos.



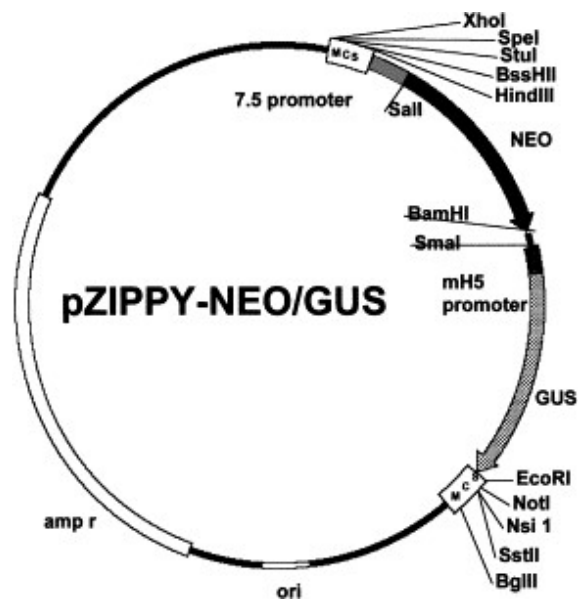
**FIGURA 14: Construção do vírus MVAB18.** Diagrama mostrando as ORF dos genes: B17R, B18R, VACV-Acam3000-190 e EGFP. As setas indicam o sentido da transcrição de cada gene. Este esquema mostra como foi gerado o fragmento utilizado na construção do vírus MVAB18. P11 indica o promotor dos VACV que normalmente regula a expressão tardia do gene que codifica a proteína F18.

Todas as seis construções dos vírus descritos acima foram clonadas no vetor Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit de acordo com as indicações do fabricante. Esses vetores foram transformados em bactérias competentes de acordo com a metodologia descrita no **item 10**.

### 9. Construção dos fragmentos de interesse para a construção dos vírus WRΔB18

Para a remoção do gene B18R do vírus WR a metodologia adotada foi diferente. Para isso uma porção posterior ao gene B18R (WR-201) foi gerada por PCR utilizando o genoma do vírus WR como molde. Foi desenhado um par de iniciadores para criar o flanco com base nas sequências existentes no GenBank. Esses iniciadores contêm sítios de restrição (*Sal* e *HindIII*) permitindo a clonagem do produto amplificado no plasmídeo pZippy-NEO/GUS (**FIGURA 15**) que contém uma cópia do gene de resistência a neomicina (neo) e uma cópia do gene  $\beta$ -glucuronidase (gus) da

*E. coli*. Depois uma porção anterior ao gene B18R (WR-199) foi gerada por PCR utilizando o genoma do vírus WR como molde. Para isso foi desenhado um par de iniciadores contendo sítios de restrição (*NotI* e *BglII*). O produto da PCR e o plasmídeo pZippy-NEO/GUS (já contendo o primeiro inserto – gene posterior) foram digeridos com as mesmas enzimas utilizadas na amplificação e a porção anterior ao gene escolhido também foi inserida no plasmídeo. Os iniciadores para cada reação estão descritos na TABELA VIII.



**FIGURA 15 – Representação esquemática do plasmídeo pZippy-NEO/GUS.** A figura representa a estrutura do plasmídeo pZippy-NEO/GUS contendo, genes que conferem resistência à ampicilina (*amp r*) e à neomicina (*neo*), uma origem de replicação (*ori*), uma cópia do gene  $\beta$ -glucuronidase (*gus*) e sítios de restrição para diversas enzimas.

**TABELA VIII**

**Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na construção do vírus WR $\Delta$ B18**

Iniciadores	Sequência	Tamanho do amplicon
Flanco 1: 5'WR-199	5' <b>CGTATAAGCTTCGATACGCATTTTCAA</b> AATACATG 3'	443 pb
3'WR-199	5' CAT <b>GTGCGACCGCATGAGAAAA</b> TACAAC TATAC 3'	
Flanco 2: 5'WR-201	5' GCAAATATAG <b>CGGCCG</b> CCAATGCATTTTATATACATTACTG 3'	433 pb
3'WR-201	5'CGTAAAGAT <b>CTCCTACTAGTTGTG</b> TACTTTGATC 3'	

\*em **negrito** os sítios de restrição enzimática.

Nas duas etapas de amplificação foram utilizadas as mesmas condições salinas e enzimáticas, descritas a seguir: 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1mM dos nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2U de *Taq* DNA polimerase (Promega), 2,0μL de Tampão 10X de *Taq* polimerase, 0,5pmol dos iniciadores específicos e 100ng de amostra, em um total de 20μL de reação.

Os seguintes ciclos foram utilizados para a amplificação dos flancos 1 e 2: desnaturação inicial de 94°C por 9 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 45°C por 1 minuto (pareamento), 72°C por 2 minutos (polimerização), e uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

Os fragmentos de DNA correspondentes aos flancos 1 e 2 foram inseridos separadamente no vetor pZippy-NEO/GUS (**FIGURA 15**) e, em seguida, transformados em bactérias competentes de acordo com a metodologia descrita no **item 10**.

## 10. Transformação de bactérias competentes

O produto da ligação (flancos 1 e 2 inseridos no pZippy-NEO/GUS) foi utilizado para a transformação de bactérias *Escherichia coli* XL10 Gold quimicamente competentes, preparadas de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e colaboradores (1989).

As construções dos fragmentos que foram utilizados nos vírus MVA recombinantes foram clonadas no vetor Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit de acordo com as indicações do fabricante.

Assim, 5 μL do produto da clonagem foram misturados a 100 μL de bactérias XL10 Gold (construção no pZippy-NEO/GUS) ou TOP10 (construções no vetor TOPO) quimiocompetentes e imediatamente colocados em banho de gelo e nele mantidos por 30 minutos. Posteriormente, foi realizado o choque térmico a 42°C por 40 segundos e novamente incubados em banho de gelo por mais 2 minutos. Em seguida, 500 μL de meio Luria-Bertani (LB) sem antibiótico (Bacto tripton a 1% p/v; extrato de levedura a 0,5% p/v; 171 mM NaCl) foram adicionados e as bactérias incubadas a 37°C, sob agitação de 250 rpm por 1 hora (*Hanahan, D., J. Jessee, et al., 1991*). A cultura bacteriana resultante foi centrifugada a 14.000 rpm (microcentrifuga Eppendorf 5415C) por 1 minuto e o sedimento homogeneizado em 100 μL de meio LB. A suspensão foi inoculada em placas de Petri contendo meio LB-ágar suplementado com ampicilina (100 μg/mL), as placas foram incubadas a 37°C e o crescimento bacteriano observado após 16 horas (*Sambrook, J., E.F., Fritsch,*

*et al.*, 1989). Paralelamente, foram feitos controles de crescimento de bactérias quimiocompetentes não transformadas em placas de LB-ágar contendo ou não ampicilina.

### **11. Verificação da presença do inserto por PCR**

Os clones transformantes foram inoculados em 10 mL de meio LB 1X contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubados a 37°C com agitação de 250 rpm por aproximadamente 18 horas. A verificação da presença do inserto foi feita por PCR, na qual 2 µL da cultura bacteriana foram utilizados como molde em reações com perfis idênticos à descrita no **item 9**. Os produtos obtidos foram separados em gel de agarose 1% em TBE 1X, acrescido de 0,5 µg/mL de brometo de etídio a um potencial elétrico constante de 100 V. Os géis foram visualizados em transluminador ultravioleta e fotografados. Alíquotas das culturas identificadas como positivas para a presença do inserto foram congeladas em glicerol a 20% v/v a -70°C.

### **12. Obtenção de plasmídeo em pequena escala**

Cinco mililitros das culturas identificadas como positivas foram utilizados na obtenção de DNA plasmidial em pequena escala, empregando-se o Kit Wizard Plus SV Miniprep (Promega - Fitchburg, EUA), conforme instruções do fabricante. O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria (espectrofotômetro ND-1000, NanoDrop, EUA) e a sua integridade verificada por eletroforese em gel de agarose 1%. O DNA plasmidial foi estocado a -20°C.

### **13. Sequenciamento**

O sequenciamento dos genes clonados no plasmídeo pZippy-NEO/GUS e no vetor TOPO foram realizados em sequenciador automático capilar ABI 3130 (Applied Biosystems - Waltham, EUA), através do método de dideoxi (*Sanger, F., S. Nicklen, et al., 1977*). O polímero POP7 e BigDye v3.1 (Thermo Fisher - Waltham, EUA) foram utilizados, obedecendo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante.

Cerca de 100 ng de cada plasmídeo e 10 pmol de iniciadores específicos senso e anti-senso foram utilizados em cada reação de sequenciamento. Essa reação foi feita em microplaca para PCR

de 96 poços (Applied Biosystems - Waltham, EUA), em Termociclador Eppendorf 96-well Mastercycler® e nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, seguida de 25 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C. As reações foram submetidas à precipitação com acetato de amônio e lavadas com etanol de acordo com as instruções do produto BigDye v3.1, para eliminação dos dideoxinucleotídios marcados não incorporados, e, finalmente, o DNA foi homogeneizado em formamida.

#### **14. Análise computacional das sequências**

Os cromatogramas obtidos no sequenciamento dos clones recombinantes foram analisados com o auxílio da plataforma “Electropherogram quality analysis” - <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/> da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. Em tal plataforma, o programa Phred analisa o pico de cada base atribuindo valores de qualidade. O programa Crossmatch elimina as sequências referentes aos vetores. Em seguida, o programa CAP3 “Sequence Assembly Program” - <http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php> agrupa as sequências semelhantes, estabelecendo uma sequência consenso, derivada da junção de duas ou mais sequências relacionadas (Huang, X. e A. Madan, 1999).

De posse da sequência consenso, análises manuais foram realizadas utilizando o programa Multalin - <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> - com o objetivo de verificar se as construções geradas estão iguais as que foram planejadas.

#### **15. Construção dos vírus recombinantes**

##### **15.1 Geração dos vírus recombinantes**

A construção dos vírus recombinantes (MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10, MVAD9D10rev, MVAD9muD10mu, MVA $\Delta$ B18, MVAB18rev, MVAB18 e WR $\Delta$ B18) foi baseada na recombinação homóloga dos vírus MVA ou WR em células infectadas na presença dos plasmídeos de transferência.

Assim, para os vírus MVA recombinantes, monocamadas de CEF em placas de 6 poços (TPP – Trasadingen, Suíça) foram infectadas com 500  $\mu$ L do vírus MVA em uma M.O.I de 1. Para



o vírus WRΔB18 monocamadas de BS-C-40 em placas de 6 poços (TPP – Trasadingen, Suíça) foram infectadas com 500 μL do vírus WR em uma M.O.I de 1. Um poço de cada placa foi reservado para controle de células, sendo acrescentados 500 μL de meio DMEM (Gibco - Carlsbad, EUA) incompleto. A adsorção foi realizada a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e com homogeneização constante durante 1 hora. Após a adsorção, as monocamadas de células foram lavadas, duas vezes, com meio Opti-MEM<sup>®</sup> I (Gibco - Carlsbad, EUA) e, em seguida, foi realizada a transfecção com os plasmídeos contendo os insertos.

Para isso, 1 mL de uma solução contendo os “complexos de lipofectamina” foi adicionado a cada cavidade da placa. Os “complexos de lipofectamina” foram preparados, misturando uma solução contendo 2 μg de cada plasmídeo/inserto e 50 μL de Opti-MEM com uma segunda solução contendo 5 μL de lipofectamina e 50 μL de Opti-MEM, sendo o volume completado para 1 mL com o mesmo meio utilizado acima. As células cobertas pela solução com os “complexos de lipofetamina” foram, então, incubadas a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 5 horas. Após esse período, o meio das células foi trocado, colocando 2 mL de meio DMEM com 2% de SFB (Cultilab - Campinas, Brasil) em cada poço. A placa foi incubada a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas, permitindo a ocorrência da recombinação homóloga entre o genoma viral e o plasmídeo de transferência. Em seguida, as monocamadas de células foram raspadas, com o auxílio de raspadores de silicone, e as soluções resultantes foram centrifugadas por 5 minutos a 1.100 x g. Os sedimentos foram suspensos em 1 mL de meio DMEM incompleto e essa suspensão foi congelada e descongelada em refrigerador -80°C por três vezes, para lise das células infectadas. Finalmente, a suspensão foi armazenada a -80°C para posterior seleção dos vírus recombinantes.

## **15.2 Seleção dos vírus recombinantes MVAΔD9ΔD10 e MVAΔB18**

Os vírus MVAΔD9ΔD10 e MVAΔB18 foram selecionados por meio de sucessivos ensaios de purificação de placa. Para cada ensaio, foram realizadas diluições seriadas, em meio DMEM (Gibco - Carlsbad, EUA) incompleto, da suspensão viral que foi obtida no **item 15.1**. Em seguida, 500 μL de cada diluição foram utilizados para infectar as respectivas monocamadas de CEF em placas de 6 poços (TPP – Trasadingen, Suíça), sendo um poço reservado para controle de célula. A adsorção foi realizada a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e com homogeneização

constante durante 1 hora. Após a adsorção, as monocamadas de células foram lavadas com PBS 1X e cobertas com 0,5% de CMC suplementado com 2% de SFB, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e anfotericina B (1,5µg/ml). As placas foram, então, novamente incubadas a 37°C em uma atmosfera de CO<sub>2</sub> por 72 horas. Após esse período, as células foram observadas ao microscópio de fluorescência e as placas com fluorescência verde, devido à expressão do gene para a proteína EGFP, foram coletadas com o auxílio de ponteiras e transferidas para microtubos contendo 500 µL de DMEM incompleto. Essa suspensão foi congelada e descongelada em refrigerador -80°C por três vezes, para lise das células infectadas e, em seguida, armazenada a -80°C para posterior uso.

### **15.3 Seleção dos vírus recombinantes MVAD9D10rev, MVAD9muD10mu, MVAB18rev e MVAB18**

Os vírus MVAD9D10rev, MVAD9muD10mu, MVAB18rev e MVAB18 foram selecionados por meio de sucessivos ensaios de purificação de placa da mesma maneira descrita no **item 15.2**.

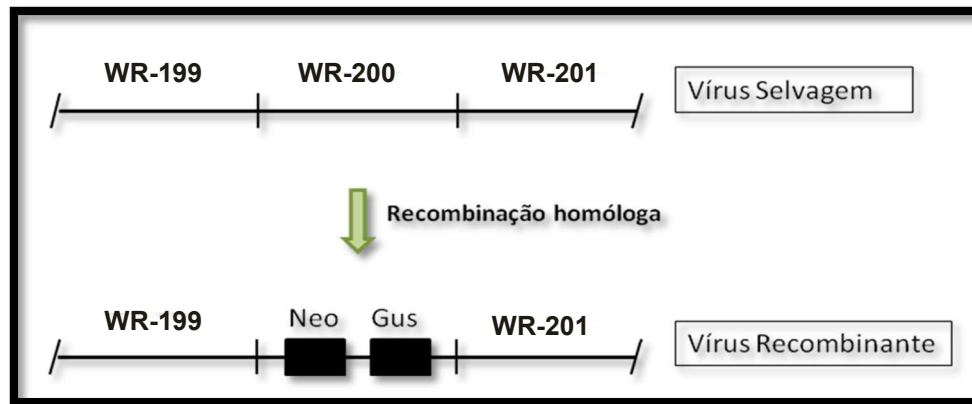
Entretanto, após o período de incubação por 72 horas as células foram marcadas com anticorpos de acordo com a metodologia utilizada no **item 7** – imunomarcação. Isso porque os clones que foram coletados agora não expressam mais o EGFP, tornando a coleta mais difícil. Para a técnica de imunomarcação, neste caso, as células não foram fixadas. Assim, para que as monocamadas celulares não se soltassem durante as etapas da imunomarcação, foram utilizadas placas especiais – CellBinding (Corning – New York, EUA). Além disso, as lavagens foram feitas com PBS 1X estéril e todo o procedimento de marcação foi realizado dentro de uma capela de fluxo laminar. Após a marcação as células foram observadas ao microscópio de fluorescência e as placas que não exibiam a fluorescência verde, mas apresentavam a coloração marrom oriunda da imunomarcação foram coletadas com o auxílio de ponteiras e transferidas para microtubos contendo 500µL de DMEM incompleto. Eventualmente, em etapas de seleção mais adiantadas não foi feita a imunomarcação para detecção dos clones que não mais expressavam EGFP, sendo observado apenas o ECP. As suspensões contendo os vírus selecionados foram congeladas e descongeladas em refrigerador -80°C por três vezes, para lise das células infectadas e, em seguida, armazenadas a -80°C para posterior uso.

#### 15.4 Seleção dos vírus recombinantes WRΔB18

O vírus WRΔB18 também foi selecionado por meio de sucessivos ensaios de placa, porém a metodologia foi um pouco diferente da adotada para os outros vírus recombinantes.

A seleção deste vírus foi feita em células BS-C-40 e ocorreu na presença do antibiótico geneticina (2 mg/mL), uma vez que somente os vírus contendo o plasmídeo pZippy-NEO/GUS se multiplicam, e do substrato X-Gluc (0,2 mg/mL) que produz um precipitado azul na presença da enzima  $\beta$ -glucuronidase. Os vírus que foram selecionados possuem o gene de interesse removido, uma vez que eles foram transfectados com um plasmídeo que contém os cassetes de expressão neo e gus no lugar do gene de interesse, além de conter uma porção dos genes anterior e posterior ao gene alvo para direcionar a inserção (**FIGURA 16**) [Da Fonseca, F. G., E. J. Wolffe, et al., 2000].

Para cada ensaio, foram realizadas diluições seriadas, em meio DMEM (Gibco - Carlsbad, EUA) incompleto, da suspensão viral que foi obtida no **item 15.1**. Em seguida, 500  $\mu$ L de cada diluição foram utilizados para infectar as respectivas monocamadas de BS-C-40 em uma placa de 6 poços (TPP – Trasadingen, Suíça), sendo um poço reservado para controle de célula. A adsorção foi realizada a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e com homogeneização constante durante 1 hora. Após a adsorção, as monocamadas de células foram lavadas com PBS 1X e cobertas com uma mistura contendo solução de agarose *low melting* a 2% e meio DMEM 2X suplementado com 2% de SFB, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100  $\mu$ g/mL), anfotericina B (1,5  $\mu$ g/ml) e geneticina (2 mg/mL). As placas foram, então, novamente incubadas a 37°C em uma atmosfera de CO<sub>2</sub> e após 24 horas mais uma camada de agarose *low melting* a 2% foi adicionada nos poços, porém dessa vez com o substrato X-Gluc (0,2 mg/mL). Após esse período, as células foram observadas ao microscópio de fluorescência e as placas com coloração azul, devido à expressão do gene GUS, foram coletadas com o auxílio de ponteiros e transferidas para microtubos contendo 500  $\mu$ L de DMEM incompleto. Essa suspensão foi congelada e descongelada em refrigerador -80°C por três vezes, para lise das células infectadas e, em seguida, armazenada a -80°C para posterior uso.



**FIGURA 16 – Representação da construção do vírus WRΔB18.** O esquema está representando o genoma original do vírus WR e o genoma do vírus que terá o gene WR-190 removido após recombinação homóloga. O vírus recombinante terá o gene de interesse substituído pelos genes NEO e GUS, que são regulados pelos promotores do VACV e que proporcionam a seleção por antibiótico e coloração de placas.

### 15.5 Amplificação, purificação e titulação dos vírus recombinantes

Os clones virais selecionados nos itens anteriores foram submetidos à técnica de PCR para detecção de contaminação com o vírus parental. Caso a contaminação fosse confirmada, mais rodadas de seleção eram feitas, do contrário os clones seguiam para a fase de amplificação.

Os clones foram amplificados por meio de passagens subsequentes em placas de 12 e 6 poços e em garrafas de 25, 75 e 150 cm<sup>2</sup> (TPP – Trasadingen, Suíça), de modo a se obter um título viral adequado. Essas amplificações serão realizadas da mesma forma descrita no **item 4**. Em seguida, os vírus recombinantes amplificados foram purificados e titulados conforme descrito anteriormente nos **itens 5, 6 e 7**.

Os vírus produzidos tiveram as sequências dos genes de interesse obtidas e analisadas durante as etapas de amplificação, conforme as metodologias descritas nos itens **13 e 14**.

## 16. Ensaio de infectividade viral

A determinação das curvas de ciclo único dos vírus MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu foi feita em quatro linhagens celulares: BS-C-1, BHK-21, CEF e HeLa. Já as curvas de ciclo único dos vírus MVA, MVAB18rev, MVAΔB18 e MVAB18 foram feitas em três linhagens celulares: BS-C-40, BHK-21 e CEF. Brevemente, 2,5 x 10<sup>5</sup> células foram implantadas em placas de 12 poços

e foram cultivadas por 24 horas à 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após o crescimento celular, o meio foi descartado e a solução viral inoculada no volume de 500 µL, na M.O.I. de 5. Após 1 hora de adsorção, a monocamada foi lavada duas vezes com PBS 1X, e então foram adicionados 2 mL de DMEM 2% SFB. As placas foram novamente incubadas à 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 3, 12, 24 ou 36 horas de infecção as monocamadas infectadas foram raspadas, coletadas, congeladas e descongeladas 3 vezes em refrigerador -80°C e armazenadas a -80°C para os ensaios de titulação, conforme descrito no **item 7**. Estes ensaios foram feitos em triplicata.

Somente para os vírus MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu foram feitas curvas de crescimento utilizando a M.O.I de 0,5. Para isso a mesma metodologia das curvas de ciclo único foi adotada.

### **Metodologias utilizadas somente para os vírus MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu**

O vírus MVAΔD9ΔD10 foi utilizado apenas como uma ferramenta para a construção dos vírus mutante e revertente, portanto não foi utilizado nos ensaios que serão descritos daqui em diante.

### **17. Ensaio de *Western Blot* para detecção de proteínas virais totais e da fosforilação de PKR, eIF2α e IRF3**

Para detecção da expressão das proteínas de interesse, monocamadas de quatro linhagens celulares - BS-C-1, BHK-21, CEF e HeLa - em uma placa de 12 poços (TPP – Trasadingen, Suíça) foram infectadas com 500 µL do vírus MVA, MVAD9D10rev ou MVAD9muD10mu em uma M.O.I de 5. Alguns poços da placa foram reservados para controle de células, sendo acrescentados 500 µL de meio DMEM (Gibco - Carlsbad, EUA). Para determinar quais seriam as proteínas precoces, distinguindo-as das intermediárias e tardias, foi utilizada a adição de citosina-arabinosídeo (AraC), um inibidor da replicação do DNA. Portanto, somente os genes precoces seriam expressos. Os poços que receberam AraC (Sigma - Aldrich Biotechnology - St. Louis, EUA) foram tratados por uma hora na presença deste reagente diluído em DMEM (44µg/mL) e depois desse período um novo meio contendo AraC na mesma concentração foi adicionado para a realização da infecção.

A adsorção foi realizada a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e com homogeneização constante durante 1 hora. Após a adsorção, as monocamadas de células foram lavadas, duas vezes, com meio DMEM, em seguida, foram adicionados 2 mL de meio DMEM com 2% de SFB. Para os poços que foram tratados com AraC o reagente foi mantido durante todo o experimento. A placa foi incubada a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

Com 3, 8 ou 24 horas, as monocamadas de células foram raspadas, com o auxílio de raspadores de silicone, e as suspensões celulares foram centrifugadas por 2 minutos a 14.000 rpm (microcentrifuga Eppendorf 5415R). Os sedimentos foram suspensos com 80 µL de tampão de lise nuclear (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5% NP-40, inibidores de proteases livre de EDTA [Roche – Penzberg, Alemanha]) e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação foram adicionados 25 µl do tampão de lise (4x NuPAGE LDS Sample buffer [Life Technologies – Carlsbad, EUA ]) e 12 µl do tampão de amostra (10x NuPAGE sample reducing buffer [Life Technologies – Carlsbad, EUA]). Por fim, as amostras foram aquecidas a 95°C por 3 minutos. Os extratos proteicos foram, então, submetidos ao *Western Blot* para detecção da expressão das proteínas de interesse.

Para a realização do *Western Blot*, os extratos proteicos foram fracionadas no gel 4%-12% NuPAGE Bis Tris gels (Life Technologies – Carlsbad, EUA ) juntamente com um marcador de massa molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Markers – Promega - Fitchburg, EUA) a um potencial elétrico de 60 V até a passagem pelo gel de empilhamento e depois a 120 V.

Após o fracionamento, as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose através do sistema iBlot (Life Technologies – Carlsbad, EUA ). Em seguida, foi realizado o bloqueio, deixando a membrana por 1 hora a temperatura ambiente em PBST (PBS com 0,05% de tween-20) contendo 5% (p/v) de leite desnatado em pó. As membranas foram lavadas com tampão de bloqueio por três vezes, 10 minutos cada lavagem e, em seguida, incubadas com anticorpo primário diluído em tampão de bloqueio durante 18 horas a 4°C. Posteriormente, as membranas foram lavadas com tampão de bloqueio por três vezes, 10 minutos cada e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo secundário também diluído em tampão de bloqueio. Após a última incubação as membranas foram lavadas 3 vezes com PBST, 10 minutos cada lavagem. Por último, as membranas foram reveladas utilizando o Kit ECL<sup>TM</sup> Plus *Western Blotting Detection System* (GE Healthcare - Little Chalfont) e o filme Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare -

Little Chalfont), conforme instruções do fabricante. Os anticorpos utilizados e suas respectivas diluições estão descritos na **TABELA IX**.

**TABELA IX**  
**Anticorpos utilizados nos ensaios de *Western Blot***

<b>Anticorpos</b>	<b>Diluições</b>
Rabbit anti-VACV policlonal	1 : 5.000
Rabbit anti-phospho PKR MAb (Abcam)	1 : 1.000
Rabbit anti-eIF2 $\alpha$ MAb (Cell Signaling)	1 : 1.000
Rabbit anti-phospho-eIF2 $\alpha$ MAb (Cell Signaling)	1 : 1.000
Rabbit anti-IRF3 MAb (Cell Signaling)	1 : 1.000
Rabbit anti-phospho IRF3 MAb (Cell Signaling)	1 : 1000
Rabbit anti-actin polyclonal (Sigma-Aldrich)	1 : 3.000
Goat anti-rabbit (Thermo Scientific)	1 : 3.000
Mouse anti-GAPDH MAb (Covance)	1 : 2.000
Rabbit anti-mouse polyclonal (Sigma-Aldrich)	1 : 3.000

## 18. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a realização da técnica de microscopia eletrônica, placas de 60 mm de diâmetro foram cultivadas com as células BS-C-1 ou CEF e infectadas com os vírus MVAD9D10rev ou MVAD9muD10mu em uma M.O.I de 5. Após uma incubação de 20 horas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, as placas foram fixadas em um tampão de cacodilato de sódio (0.1 M) contendo 2% de glutaraldeído, lavadas com o tampão de cacodilato de sódio (0.1 M), fixadas novamente com tetróxido de ósmio reduzido e lavadas com o mesmo tampão utilizado anteriormente. Após a fixação as células foram desidratadas com 50%, 70% e 100% de álcool etílico e óxido de propileno, nesta ordem. As células desidratadas foram embebidas na resina EMBED 812 e as seções foram cortadas no ultramicrotomo EM UC7 (Leica Microsystems -

Wetzlar, Germany). Os cortes finos foram corados com 7% de acetato de uranila em etanol a 50% e, em seguida, com 0,01% de citrato de chumbo. Esses cortes foram observados e fotografados no microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2 Spirit equipado com uma câmera Gatan charge-coupled (CCD) (FEI - Hillsboro, EUA). Todos os reagentes utilizados nesta técnica foram adquiridos da empresa *Eletron Microscopy Sciences* (Hatfield, EUA) e as imagens foram feitas na *Electron Microscopy Core Facility* (NIH – EUA).

## 19. Análise do dsRNA através da Microscopia Confocal

Monocamadas celulares de CEF ou BS-C-1 crescidas em lamínulas colocadas em placas de 24 poços foram infectadas com os vírus MVAD9D10rev ou MVAD9muD10mu em uma M.O.I de 5. Após 12 horas as células foram lavadas 3 vezes com PBS e fixadas por 20 minutos, a temperatura ambiente, com 4% de paraformaldeído diluído em DPBS (PBS de Dulbecco). Após fixação as células foram lavadas 3 vezes com DPBS e permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 diluído em DPBS por 15 minutos a temperatura ambiente. As células foram lavadas mais 3 vezes com DPBS e incubadas por 1 hora com a solução de bloqueio (DPBS + 1% de albumina sérica bovina [BSA]). Após a etapa de bloqueio as células foram incubadas com o anticorpo primário anti-dsRNA (J2 mAb – 1:100 [SCICONS – Szirak, Hungria]) diluído em solução de bloqueio durante 18 horas a 4°C. Após quatro lavagens as células foram incubadas com o anticorpo secundário (anti-mouse Alexa flour 488 – 1:100 [Life Technologies – Carlsbad, EUA]) diluído em solução de bloqueio por 1 hora a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após mais 4 lavagens os núcleos celulares e as fábricas virais foram corados com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) diluído em água, em uma concentração de 5 µg/mL, por 15 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. As lamínulas foram lavadas e montadas em uma lâmina de vidro (75 x 25 mm) utilizando o reagente Prolong Gold (Life Technologies – Carlsbad, EUA).

As imagens foram coletadas no microscópio confocal Leica DMI6000 (Leica Microsystems - Wetzlar, Alemanha) utilizando a objetiva de imersão 63x com abertura numérica de 1.4 na Light Microscopy Core Facility (NIH – EUA). Os fluorocromos foram excitados com o laser de 450 nm para DAPI e 488 nm para o Alexa Fluor 488. Os detectores foram ajustados para evitar interferência entre os canais.



As imagens foram coletadas e processadas no programa Imaris 7.1 (Bitplane AG - B adenerstrasse, Suíça). Para as análises de quantificação as imagens foram coletadas utilizando o método automático “tilling” que fotografa de maneira arbitrária de 50 a 100 campos da lamínula. As imagens adquiridas também foram analisadas no programa Imaris 7.1 para calcular a intensidade de fluorescência total absoluta de cada célula. As intensidades cumulativas foram representadas graficamente como a média de intensidade normalizada com base nas células não infectadas.

## **20. Contagem de partículas virais através do aparelho *Virus Counter***

As suspensões virais foram, inicialmente, submetidas à sonicação (Branson Sonifier 450) a uma potência de 100% constante em 3 ciclos de 30 segundos, com intervalos de 30 segundos entre cada ciclo. Em seguida, os reagentes utilizados na contagem foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. Para isso 5  $\mu$ L de acetonitrila foram adicionados ao frasco de corante e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente, protegidos da luz (todos os reagentes foram adquiridos na empresa ViroCyt [Denver - EUA]). Após a incubação, 1 mL do tampão do corante foi adicionado à mistura. Os vírus purificados foram diluídos no tampão de amostra na proporção de 1:100 e foram transferidos juntos com o corante (na proporção de 2:1) para o frasco utilizado na realização da leitura pelo aparelho. Essas amostras foram incubadas por pelo menos 30 minutos antes de serem submetidas à leitura. As amostras foram lidas no aparelho de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante e os resultados obtidos são fornecidos em números de partículas virais por mL.

## **Metodologias utilizadas somente para os vírus MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18, MVAB18 e WRAB18**

## **21. Detecção da proteína B18 através do ensaio de *Western Blot***

Monocamadas de CEF ou de BS-C-40 em placas de 6 cavidades foram infectadas com 500  $\mu$ L dos vírus MVA, MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18 e MVAB18 ou WR e WR $\Delta$ B18, respectivamente, utilizando M.O.I de 1 para cada vírus. Uma cavidade de cada placa foi reservada para controle de

células, sendo acrescentados 500  $\mu$ L de meio DMEM. A adsorção foi realizada a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e com homogeneização constante durante 1 hora. Após a adsorção, as monocamadas de células foram lavadas, duas vezes, com PBS 1X e, em seguida, foram adicionados, em cada cavidade, 2 mL de meio MEM com 2,5% de SFB. A placa foi incubada a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

Após as 24 horas, as monocamadas de células foram raspadas, com o auxílio de raspadores de silicone, e as soluções resultantes foram centrifugadas por 5 minutos a 800 rpm (Jouan BR4i Rotor AB 50.10). Os sedimentos foram suspensos em 30  $\mu$ L/poço de tampão de lise acrescido de inibidores de proteases (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 50 mM NaF; 10 mM  $\beta$ -glicerolfosfato; 100 mM EDTA; glicerol a 10%; Triton X-100 a 1%; 1 mM PMSF; 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 2  $\mu$ g/mL pepstatina; 2  $\mu$ g/mL aprotinina; 2  $\mu$ g/mL leupeptina), resultando nos extratos proteicos. Estes foram, então, submetidos ao *Western Blot* para detecção da expressão da proteína recombinante.

Para a realização do *Western Blot*, 15  $\mu$ g dos extratos proteicos totais foram ressuspensos em tampão de amostra 5X (240 mM Tris-HCl pH 6,8; glicerol a 40%; SDS a 0,8%; azul de bromofenol a 0,02%; 200 mM  $\beta$ -mercaptoetanol) e desnaturados por aquecimento a 99°C por 5 minutos. Juntamente com um marcador de massa molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Markers – Promega, EUA), foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE). A corrida eletroforética foi realizada a um potencial elétrico de 60 V até que amostra saísse completamente do gel de empilhamento e depois a 120 V.

Após o fracionamento, as amostras foram transferidas para membrana de transferência de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (GE Healthcare, Hybond<sup>TM</sup>-P) por 2 horas a uma corrente elétrica constante de 350 mA e utilizando a aparelhagem *Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad). Em seguida, foi realizado o bloqueio, deixando a membrana por 1 hora à temperatura ambiente em tampão de bloqueio 5% [5% (p/v) de BSA em TBS 1X (50 mM Tris-HCl pH 7,5 e 150 mM NaCl)]. As membranas foram lavadas com TTBS 1X (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl e Tween-20 a 0,1%) por três vezes, 5 minutos cada. A reação com os anticorpos primários (anticorpos policlonais de ovelhas contra B18, AF8185, R&D Systems; anticorpos policlonais de coelhos, NR-629, Beiresources; ou anticorpos monoclonais de camundongos anti- $\beta$ -actina, A1978, SIGMA) foi realizada *overnight*, a 4°C e em uma concentração de 1:2000 (anti-B18), 1:5000 (anti-B5) e 1:5000 (anti- $\beta$ -actina). Posteriormente, as membranas foram novamente

lavadas com TTBS 1X por três vezes, 5 minutos cada. A reação com os anticorpos secundários (anticorpos policlonais de coelho IgG HRP contra camundongos, A9044, SIGMA, anticorpos policlonais de cabra IgG HRP contra coelhos, A6154, SIGMA ou anticorpos policlonais de asnos IgG HRP contra ovelhas) ocorreu durante 1 hora à temperatura ambiente e em uma diluição de 1:10000; e foi seguida de 3 lavagens com TTBS 1X. Por último, as membranas foram reveladas utilizando-se o Kit ECL<sup>TM</sup> Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) e o filme Armesham Hyperfilm ECL (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante.

## **22. Avaliação da atividade antiviral de IFN**

Células Vero cultivadas em placas de 6 poços foram infectadas com 500 µL dos vírus MVA, MVAB18rev, MVAΔB18, MVAB18, WR e WRΔB18 em uma M.O.I de 10. Após o período de adsorção (1 hora) as monocamadas foram lavadas com PBS 1X e 1 mL de DMEM 5% de SFB foi acrescentado. As células foram incubadas por 16 horas a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período os sobrenadantes foram coletados e expostos a 15 minutos de luz ultravioleta.

Cinquenta microlitros dos sobrenadantes de todos os vírus foram incubados com 50 µL do IFN-α (Roferon<sup>®</sup>-A – Roche – Penzberg, Alemanha) diluído em DMEM 5% de SFB em diferentes concentrações - 10, 20, 40, 80 e 100 U. A solução de sobrenadante mais IFN foi incubada a 37°C por 90 minutos. Após esse período essas soluções foram utilizadas para tratar células Vero cultivadas em placas de 96 poços com 90% de confluência. Dezoito horas após o tratamento o meio foi descartado as células foram infectadas com 100 TCID<sub>50</sub> do vírus da encefalomiocardite murina (EMC). O EMC foi cedido pelo Dr. Ian Kerr, Londres, Reino Unido. A infecção foi monitorada por 48 horas e as placas foram fixadas com formol 3,7% e coradas com cristal violeta 1% para a análise do resultado. Antes de serem fixadas as monocamadas foram fotografadas no microscópio de fluorescência EVOS FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific - Waltham, EUA).

## 23. Imunização dos animais

### 23.1 Camundongos

Os camundongos machos da linhagem BALB/c utilizados foram obtidos do Biotério Central da UFMG. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia do ICB-UFMG em ambiente climatizado (temperatura  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e fotoperíodo (ciclo de 12h de claro e 12h de escuro), alimentados com ração padrão para camundongos e água *ad libitum*. O condicionamento foi realizado em mini-isoladores, em grupos de 5 animais, mantidos em estantes especiais com ventilação própria (racks ventiladas). Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG – CEUA da UFMG (ANEXO) e todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do comitê.

### 23.2 Infecção intranasal

Camundongos BALB/c machos com idade entre 6 a 8 semanas foram anestesiados por injeção intraperitoneal com uma solução de cloridrato de ketamina (100 mg/Kg) e xilazina (20mg/Kg) e posteriormente infectados pela via intranasal (Ferreira, J. M., J. S. Abrahao, et al., 2008). Para inoculação intranasal (i.n.), os camundongos foram divididos em 8 grupos de 5 animais e foram infectados com  $10^8$  PFU dos vírus MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18 e MVAB18 e  $5 \times 10^3$  ou  $5 \times 10^4$  PFU dos vírus WR e WR $\Delta$ B18 diluídos em 10  $\mu\text{L}$  de PBS 1X, com o auxílio de uma micropipeta, sendo a gota inspirada pelos mesmos (FIGURA 17). O grupo controle recebeu apenas PBS.

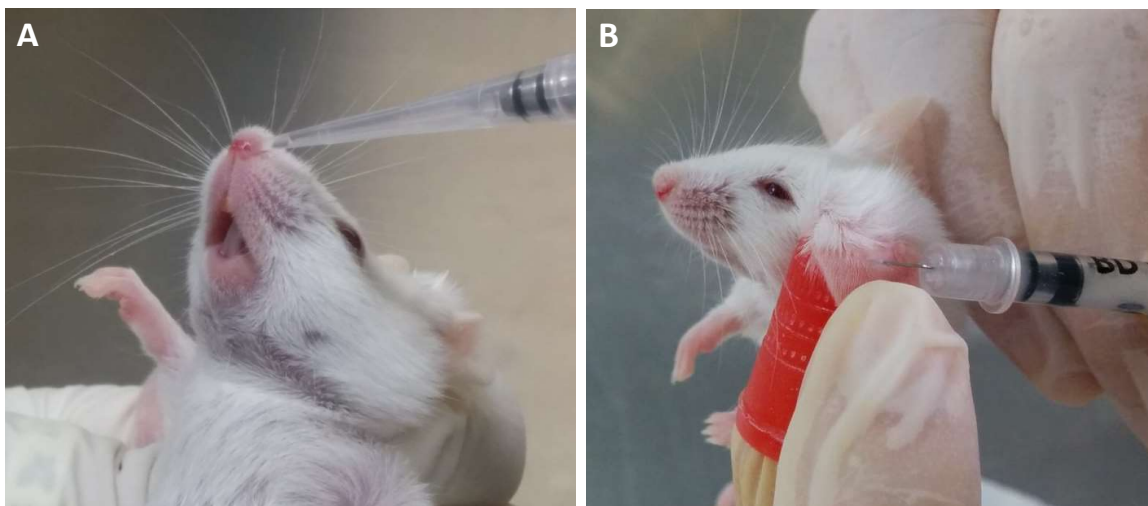
Essa diferença no inóculo viral se deve ao fato de que as amostras WR e WR $\Delta$ B18 são capazes de se replicar nas células do hospedeiro e as amostras MVA não, sendo necessária uma quantidade maior dos vírus para conseguir estimular o sistema imune dos camundongos (Belyakov, I. M., P. Earl, et al., 2003). A quantidade do vírus WR utilizada para a infecção foi escolhida com base na sua dose letal de 50% (LD50) que é  $1 \times 10^4$  PFU (Ferreira, J. M., B. P. Drumond, et al., 2008). Foi utilizada uma dose meio logaritmo (log) abaixo da LD50 e como os animais não vieram a óbito utilizou-se também meio log acima.

Os camundongos foram pesados diariamente e também tiveram os sinais clínicos observados. Quatorze dias após a infecção os animais foram eutanaziados para coleta do sangue e do baço. Os soros dos animais foram utilizados para detecção dos anticorpos séricos específicos e os baços foram utilizados nos experimentos de imunofenotipagem dos esplenócitos totais.

### 23.3 Infecção intradérmica

Camundongos BALB/c machos com idade entre 6 a 8 semanas foram anestesiados como descrito no **item 23.2** e divididos em 4 grupos de 5 animais. Posteriormente foram infectados pela via intradérmica (i.d.) na face externa da orelha com  $10^8$  PFU das amostras MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18 e MVAB18 diluídas em 10  $\mu$ L de PBS 1X (**FIGURA 17**). O grupo controle recebeu apenas PBS.

Após 21 dias os animais foram anestesiados e desafiados com  $10^6$  PFU do vírus WR pela via i.n.. Durante 10 dias os camundongos foram pesados diariamente e também tiveram os sinais clínicos observados.



**FIGURA 17 – Infecções intranasal e intradérmica.** A fotografia ilustra um animal anestesiado sendo inoculado com 10  $\mu$ L da solução viral pela via intranasal (A) ou pela via intradérmica (B).

### 23.4 Infecção intraperitoneal

Camundongos BALB/c com idade entre 6 a 8 semanas foram divididos em 6 grupos de 5 animais e foram infectados, via intraperitoneal (i.p), com  $10^8$  PFU dos vírus MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18 e MVAB18 e  $10^6$  PFU dos vírus WR e WR $\Delta$ B18 diluídos em 200  $\mu$ L de PBS 1X estéril. O grupo controle recebeu apenas PBS. Após 24 horas os animais foram eutanaziados para a coleta do baço. Esse órgão foi utilizado para a obtenção das células dendríticas.

### 24. Sangrias e obtenção do soro

Para a obtenção do soro, os camundongos, anestesiados como descrito no **item 23.2**, foram sangrados pelo plexo axilar. Após a coagulação do sangue, o soro foi separado com a centrifugação das amostras, durante dez minutos, a 600 x g. O soro coletado foi então armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para ser utilizado posteriormente no ensaio imunoenzimático (ELISA).

### 25. Ensaio imunoenzimático para medida de anticorpos séricos específicos

A quantificação dos anticorpos específicos totais presentes no soro dos camundongos foi realizada através da técnica de ELISA. Microplacas de poliestireno de 96 poços fundo reto tipo Nunc maxisorp (Apogent, EUA) foram incubadas durante 18 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  com solução de proteínas antigênicas de superfície da amostra viral WR (1ng/poço) em tampão carbonato (0,01 M, pH 9,6). Após lavagem com PBS-Tween 0,5% (PBS 1X adicionado de 0,5% de Tween20), o bloqueio foi feito com 300  $\mu$ L de leite em pó desnatado diluído a 5% no tampão de lavagem e as placas foram incubadas por duas horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após nova lavagem, foram adicionadas, em duplicatas, alíquotas do soro de camundongos diluídas na proporção de 1:100 em solução de PBS-Tween 0,5% adicionado de 1% leite em pó desnatado, sendo aplicados 100  $\mu$ L de cada diluição por poço, durante 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  com uma solução da proteína A conjugada à peroxidase (Thermo Fisher Scientific - Waltham, EUA) diluída 1:10.000 em PBS-Tween 0,5%, em um volume final de 100  $\mu$ L/poço. Após uma hora de incubação, a placa foi lavada cinco vezes com tampão de lavagem (PBS-Tween 0,05%) e, finalmente, foram adicionados 100  $\mu$ L/poço do substrato TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, Sigma-Aldrich,

EUA). Após 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 40 µL/poço de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1M. A absorbância foi medida em comprimento de onda 450 nm em leitor ELISA automático (ASYS Expert Plus, Biochrom - Cambridge, UK). O resultado foi obtido através da média entre as duplicatas de cada soro (*Karem, K. L., M. Reynolds, et al., 2005*).

## 26. Imunofenotipagem dos esplenócitos

Após o sacrifício por deslocamento cervical, o baço de cada animal foi retirado, em ambiente estéril, e mantido em meio de cultura RPMI (Gibco - Carlsbad, USA), suplementado com 10% de SFB, em tubos cônicos de 15 mL em gelo. Os órgãos foram macerados com o auxílio de lâminas com borda fosca (Global Trade, Brasil). Para análise da ativação de células dendríticas, antes de serem macerados os baços foram incubados por 30 minutos a 37°C com meio RPMI (Gibco) contendo 1 mg/ml de colagenase tipo II (Sigma - Aldrich Biotechnology - St. Louis, EUA) e 30 mg/ml de DNase I (Sigma - Aldrich Biotechnology - St. Louis, EUA). As suspensões obtidas foram centrifugadas a 300 x g durante 10 minutos a 4°C. As células foram incubadas por 5 minutos no gelo com tampão de lise ACK (0,15M NH<sub>4</sub>Cl, KHCO<sub>3</sub> 1M, Na<sub>2</sub>EDTA 0,1M) para remoção das hemácias. Após o processo de lise o material foi novamente centrifugado a 300 x g durante 10 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado com meio RPMI e, após centrifugação, suspenso em 1 mL de meio com 10% de SFB. O número de células viáveis nessa suspensão foi estimado contando-se alíquotas misturadas com o corante azul de tripan (0,4%) em câmara de Neubauer. As concentrações das suspensões foram então ajustadas para 3x10<sup>7</sup> células/mL.

Em placas de 96 poços de fundo em U foram colocados 50 µl de suspensão celular (1,5x10<sup>6</sup> células) e incubadas por 10 minutos, a 4°C, com 10 µl de soro de rato 2% diluído em PBS-wash (PBS 1X adicionado de 0,1% de azida sódica e 0,5% de albumina bovina, pH 7.2). Em seguida foram adicionados 20 µl dos anticorpos conjugados a fluorocromos (em diluições previamente padronizadas) que se ligam às moléculas de interesse expressas nas células dos camundongos (**TABELA X**). As placas foram incubadas a 4°C durante 30 minutos e então lavadas por duas vezes com PBS-wash, através de centrifugação a 300 x g a 4°C durante 7 minutos. As amostras foram fixadas com 200µl de paraformaldeído 4% (em PBS 1X, pH 7.2), transferidas para tubos de leitura e armazenadas a 4°C, protegidas de luz.

A marcação do fator de transcrição (Foxp3), foram feitas após fixação e permeabilização utilizando-se o kit *Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set* (eBioscience). Após incubação com os anticorpos de marcação intracelular por 30 minutos, as células foram lavadas e armazenadas a 4°C protegidas de luz até a aquisição em citômetro de fluxo.

**TABELA X**

**Relação dos anticorpos usados para a imunofenotipagem dos esplenócitos**

Anticorpo	Clone	Principais Funções da molécula
Anti-CD19	1D3	Molécula envolvida no desenvolvimento, maturação e ativação de célula B.
Anti-CD8a	53-6.7	Co-receptor de células T citotóxicas e/ou supressoras. Liga-se ao MHC-I.
Anti-CD4	GK1.5	Co-receptor de células T auxiliares. Liga-se ao MHC-II.
Anti-CD40	3/23	Molécula co-estimuladora presente nas células apresentadoras de antígenos.
Anti-CD44	IM7	Glicoproteína de superfície celular envolvida na interação de célula a célula, adesão celular e migração.
Anti-CD45R/B220	RA3-6B2	Isoforma de 220kDa da molécula de superfície CD45 (enzima da família das proteínas tirosina fosfatases). Expressa em linfócitos B e células dendríticas plasmocitóides.
Anti-CD11b	M1/70	Integrina alphaM, expressa em diversas células da imunidade inata e envolvida em processos como fagocitose, adesão e migração celular.
Anti-CD11c	HL3	Integrina alphaX. Proteína transmembrana do tipo 1 altamente expressa em células dendríticas.
Anti-CD62L	MEL-14	L-selectina de adesão expressa em células T virgens.
Anti-CD69	H1.2F3	Selectina expressa em células T, B, NK e NK-T recentemente ativadas.
Anti-CD80	16-10A1	Molécula co-estimuladora presente nas células apresentadoras de antígenos.
Anti-CD86	GL1	Molécula co-estimuladora presente nas células apresentadoras de antígenos.
Anti-IA <sup>d</sup>	2G9	MHC de classe II de camundongos da linhagem BALB/c
Anti-H2D[d]	34-5-8S	MHC de classe I de camundongos da linhagem BALB/c
Anti-Foxp3	FJK-16a	Fator de transcrição expresso em células T reguladoras.

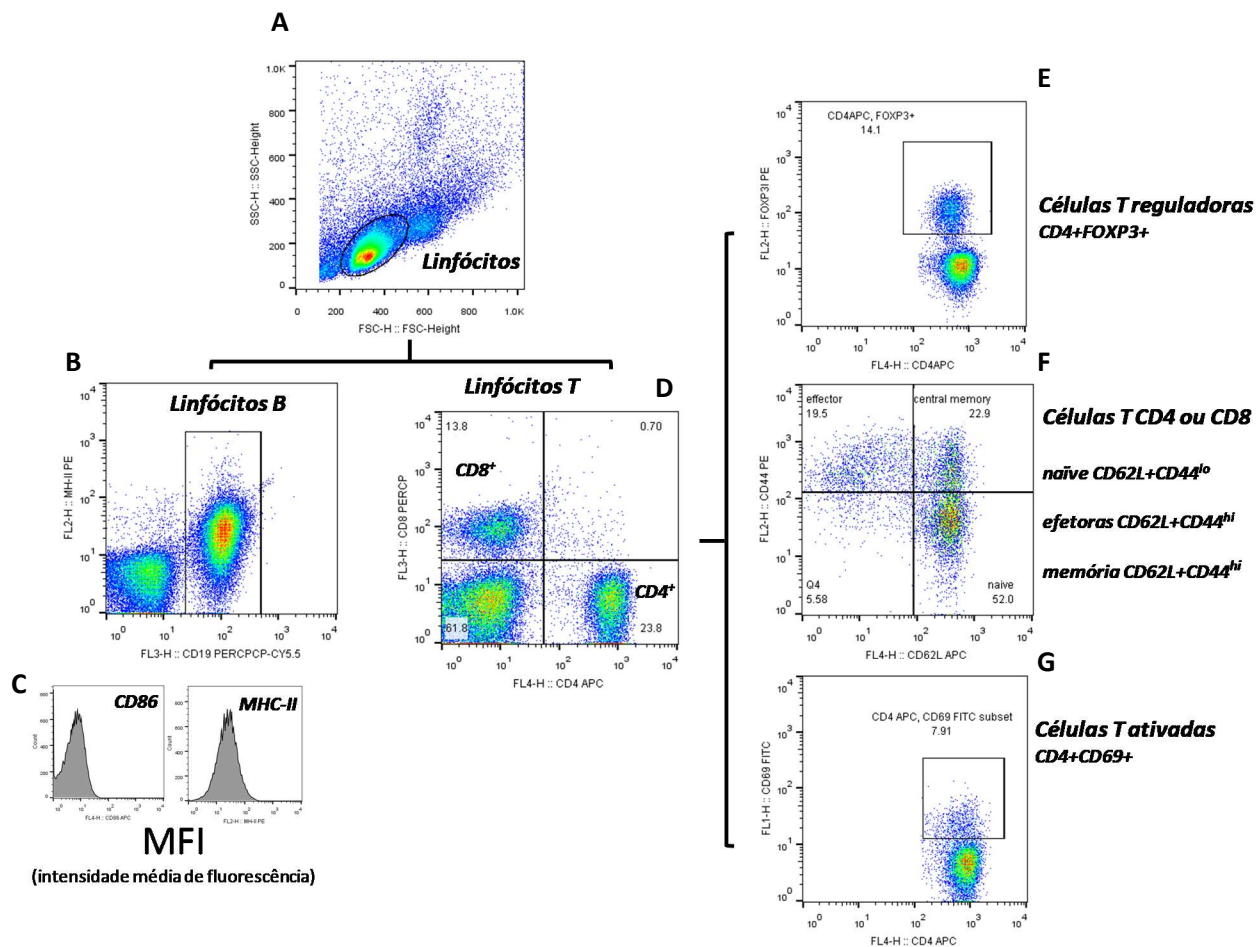


## **27. Obtenção e análise dos dados no citômetro de fluxo**

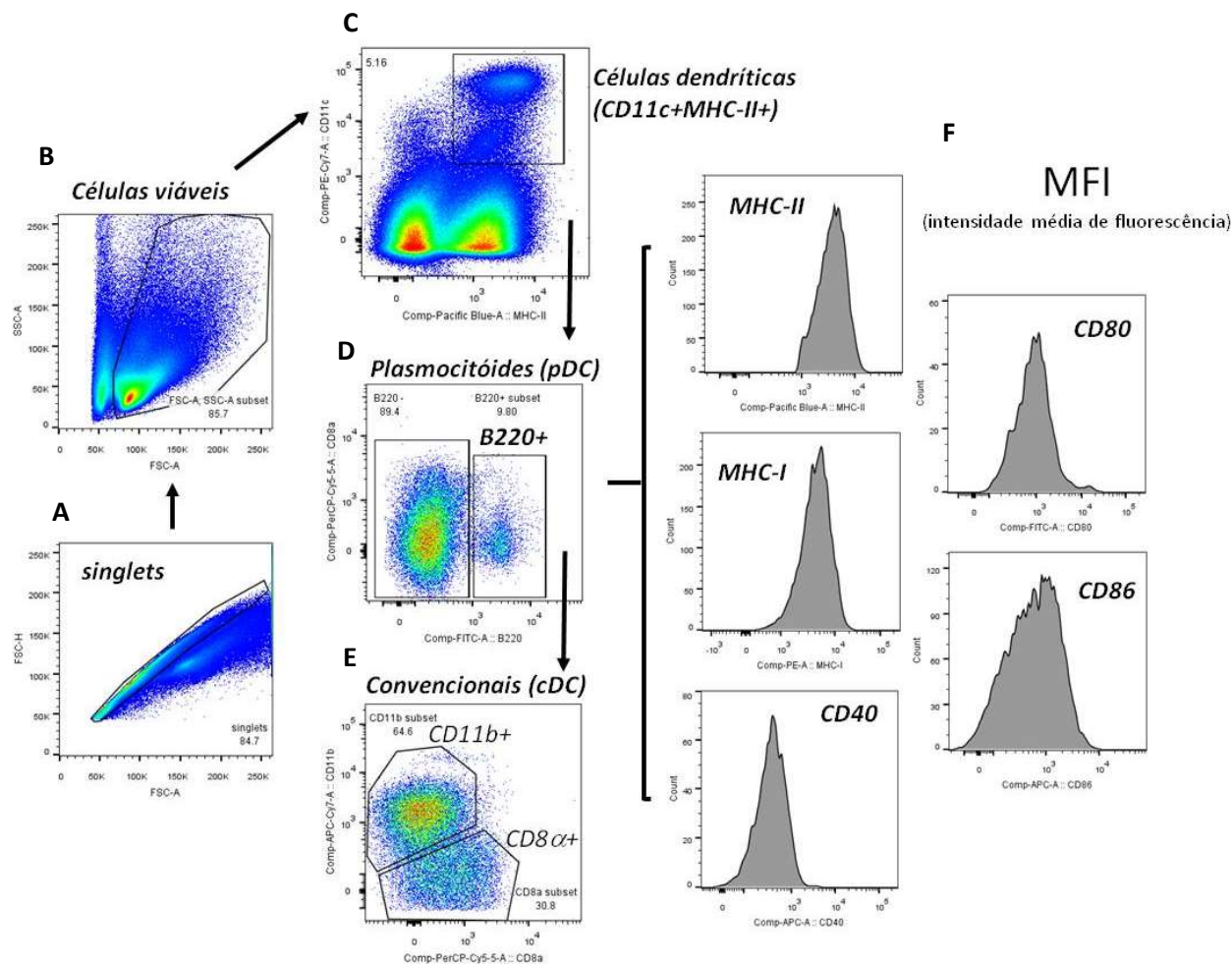
A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de leitura de seis parâmetros FACScalibur (Becton Dickinson - Franklin Lakes, USA) acoplado a um computador com o software Cell Quest (Becton Dickinson - Franklin Lakes, USA). Para análise da ativação de células dendríticas foi utilizado o citômetro de leitura de 10 parâmetros FACScanto II (Becton Dickinson), acoplado a um computador com o software Diva (Becton Dickinson). A partir de um gráfico que permite identificar o tamanho e a granulosidade das células através do padrão de dispersão de luz após a passagem das mesmas (Forward Scatter x Side Scatter), foram delimitadas as populações de interesse e a partir dessas foram adquiridos eventos para determinação dos padrões de fluorescência de cada amostra (50 mil eventos para linfócitos, 70 mil para análise de citocinas em linfócitos e 20 mil eventos de células com fenótipo CD11c<sup>+</sup>/MHC-II<sup>+</sup> para análise de células dendríticas). Análises posteriores foram feitas utilizando o software FlowJo (Tree Star) a fim de determinar as populações positivas e negativas para cada marcação. A expressão média de moléculas constitutivas foi calculada através da intensidade média de fluorescência (MFI) do canal correspondente (**FIGURAS 18 e 19**).

## **28. Análise estatística**

Para comparação entre os grupos, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e posterior teste de Tukey. Para analisar os resultados obtidos dentro de um mesmo grupo, estimulado ou não, nos experimentos de dosagem de citocinas intracelulares, foi utilizado teste T-student paramétrico. Em ambos os testes os valores de P menores que 0,05 foram considerados significativamente diferentes. As análises estatísticas foram feitas com o uso do software Prism 5 (GraphPad Software).



**FIGURA 18 – Estratégia utilizada para análise das subpopulações e do perfil de ativação dos linfócitos T e B e das células NK.** Os dados gerados pela aquisição no citômetro de fluxo FACScalibur foram analisados no *software* FlowJo. A figura (A) representa um gráfico de tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) que demonstra o perfil celular dos esplenócitos, a partir do qual foi delimitada a população de linfócitos. Dentro desta população foram analisadas as frequências de linfócitos B e T, representadas nas figuras B e D respectivamente. O nível de expressão das moléculas MHC-II e CD86 (C) foi calculado pela intensidade média de fluorescência na população de linfócitos B. As subpopulações de células T reguladoras (E), *naive*, efetoras, de memória central (F) e ativadas (G) foram analisadas a partir das populações CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>.



**FIGURA 19 – Estratégia utilizada para análise das subpopulações e do perfil de ativação das células dendríticas.**

Os dados gerados pela aquisição no citômetro de fluxo FACScanto II foram analisados no *software* FlowJo. A partir da exclusão de *doublets* (A), as células simples (*singlets*) foram analisadas quanto ao perfil de tamanho (FSC) e granulicidade (SSC) onde foi delimitada a região (*gate*) mais provável de células viáveis (B). A partir desse *gate* foi selecionada a população de células expressando CD11c e MHC-II (C), que correspondem às células dendríticas. Dentro desta população foram distinguidas as frequências das populações de células dendríticas plasmocitóides (B220+) [D] e convencionais (mieloide CD11b+ e linfóide CD8 $\alpha$ +) [E]. O nível de expressão das moléculas de MHC-I, MHC-II, CD80, CD86 e CD40 foi calculado pela intensidade média de fluorescência (MFI) [F].

# Resultados

---

## **Resultados referentes ao estudo funcional dos genes D9R e D10R do MVA**

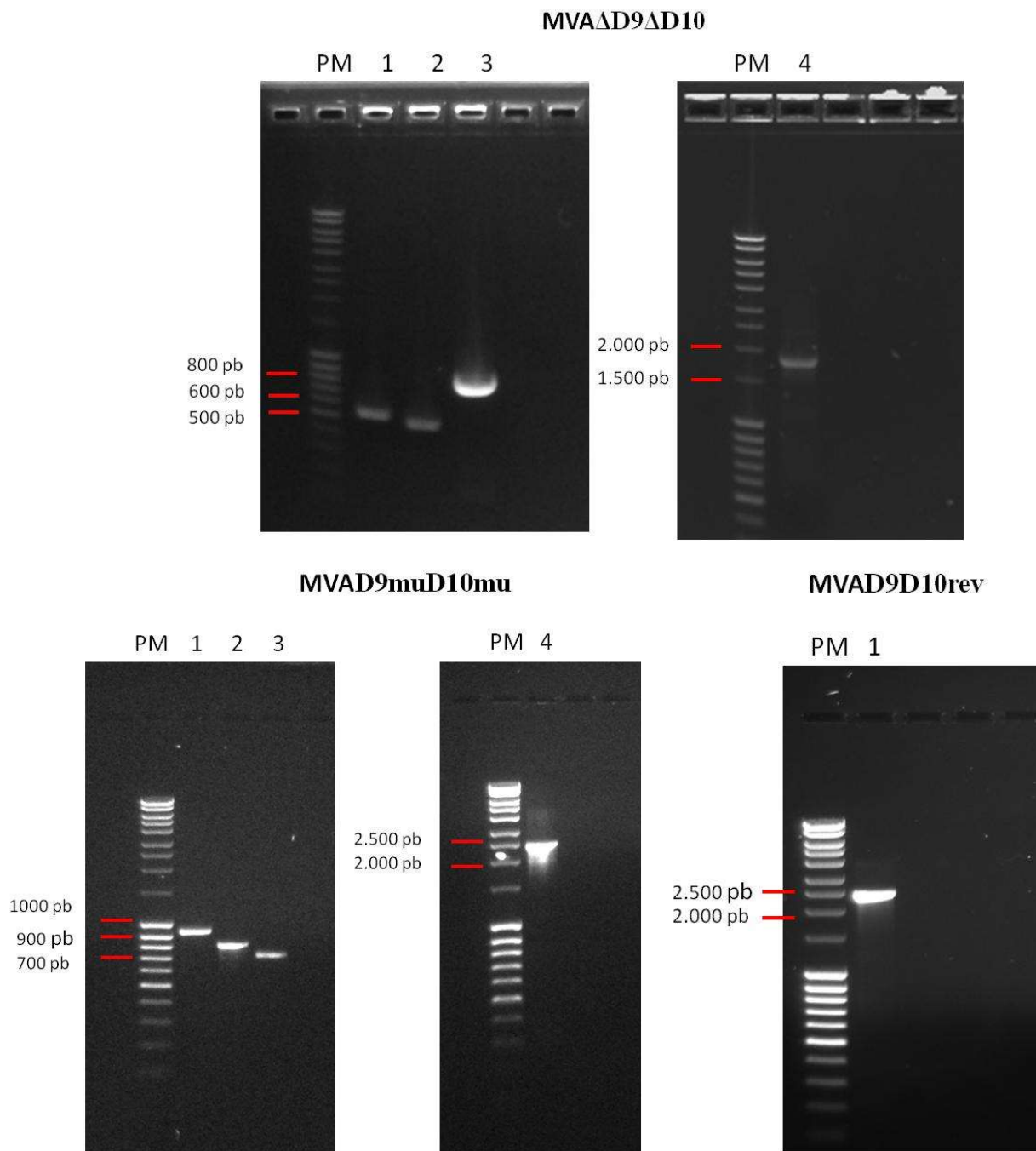
### **1. Obtenção dos diferentes fragmentos utilizados nas construções dos vírus MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10, MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu**

O vírus MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10 foi derivado da amostra MVA, no qual as ORF dos genes D9R e D10R foram substituídas pela ORF do gene EGFP através de recombinação homóloga. O molde para a amplificação do gene EGFP foi o vírus WR $\Delta$ D10 construído por Parrish em 2006 (Parrish, S. e B. Moss., 2006). Para a amplificação dos flancos D8L e D11L o molde de DNA utilizado foi o genoma do vírus MVA.

O vírus MVAD9muD10mu foi construído através da substituição da ORF EGFP pelas ORF D9R e D10R, ambas com duas mutações nos sítios catalíticos das enzimas codificadas pelos respectivos genes. Para confirmar que o fenótipo observado no vírus mutante foi mesmo causado pela ausência dos genes D9R e D10R, as ORF originais foram reinseridas no vírus MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10 dando origem ao MVAD9D10rev (rev = revertente). Este vírus foi utilizado como um controle assim como a amostra MVA selvagem.

Para a construção dos vírus MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10 e MVAD9muD10mu foi necessário um conjunto de quatro reações de PCR (para cada vírus) baseadas nas sobreposições dos seus fragmentos. Já o vírus MVAD9D10rev foi construído através de uma única reação de PCR (FIGURAS 9, 10 e 11). Todos os iniciadores utilizados foram descritos anteriormente nas TABELAS II, III e IV. Os tamanhos dos amplificadores de cada reação estão demonstrados na FIGURA 20.

Os amplificadores obtidos foram purificados do gel de agarose e inseridos no vetor TOPO. Bactérias TOP10 competentes foram transformadas com os vetores contendo os insertos e alguns clones bacterianos positivos para a presença de cada inserto tiveram os plasmídeos extraídos e sequenciados. Os clones sem mutações, ou com apenas mutações silenciosas, foram escolhidos para a utilização na construção dos vírus recombinantes.



**FIGURA 20 – Amplificação dos fragmentos utilizados nas construções dos vírus MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10, MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu.** Visualização após fracionamento eletroforético em gel de agarose 1% e TBE 1X dos produtos das PCR utilizadas nas construções dos MVA recombinantes. Tamanho esperado para cada amplificado - PCR1: 536 pb, PCR2: 501 pb, PCR3: 773 pb e PCR4: 1.800 pb (MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10); PCR1: 947 pb, PCR2: 817 pb, PCR3: 730 pb e PCR4: 2.365 pb (MVAD9muD10mu); PCR1: 2.365 pb (MVAD9D10rev). PM, padrão de tamanho molecular *MassRuler DNA* (Life Technologies); 1, PCR1; 2, PCR2; 3, PCR3 e 4, PCR4

## **2. Sequenciamento e análise das sequências (TOPO/ΔD9ΔD10, TOPO/D9D10rev e TOPO/D9muD10mu)**

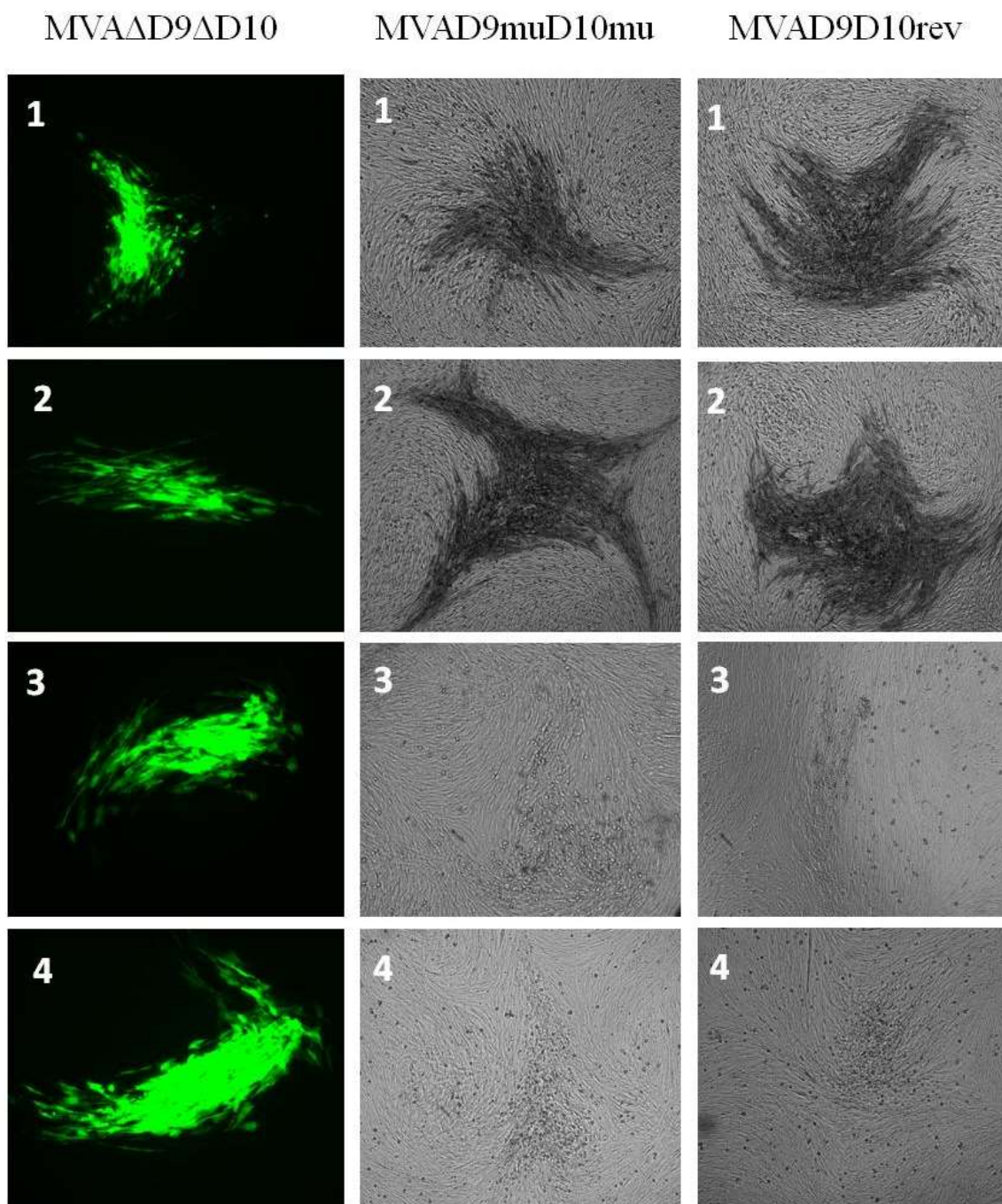
Após análise dos cromatogramas, as sequências consensos geradas para cada clone foram avaliadas com o intuito de verificar se os genes estavam em condições adequadas para expressão ou se continham as modificações necessárias (mutações nos sítios catalíticos).

Os alinhamentos das sequências consensos com as sequências desenhadas para as construções dos vírus estão disponíveis nos **ANEXOS**. A sequência do clone utilizado na construção do vírus MVAΔD9ΔD10 possui uma mutação com troca de aminoácido na ORF do gene EGFP. Como o vírus estava expressando a fluorescência normalmente, decidiu-se por utilizar esse clone mesmo assim. Já a sequência utilizada na construção do vírus MVAD9muD10mu possui uma mutação silenciosa na ORF do gene D10R. Por fim, a sequência do clone utilizado na construção do vírus MVAD9D10rev está correta.

## **3. Geração dos vírus recombinantes MVAΔD9ΔD10, MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu**

De posse das sequências dos plasmídeos contendo os insertos, os vírus recombinantes foram gerados por meio de recombinação homóloga em CEF infectadas com os vírus parentais e transfectadas com os plasmídeos. Em seguida, os vírus recombinantes foram selecionados por sucessivas rodadas (4) de purificação de placas, amplificados, sequenciados, purificados e titulados.

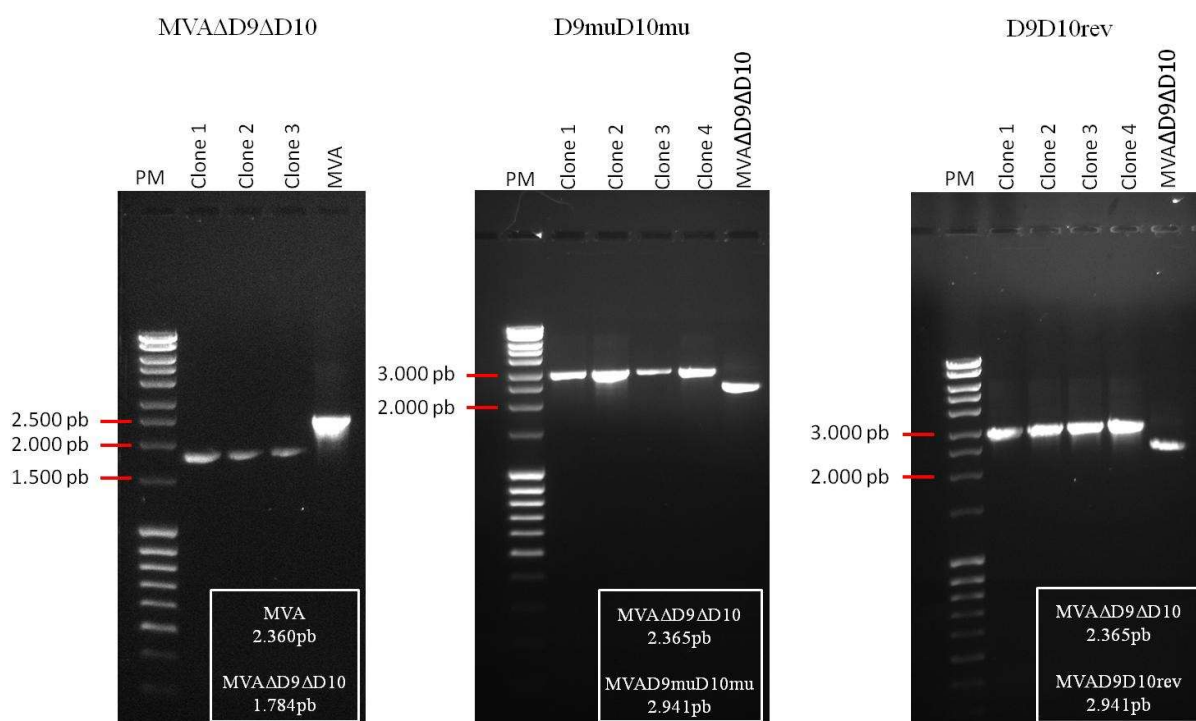
Na **FIGURA 21** estão representadas as rodadas de seleção dos três vírus. O vírus MVAΔD9ΔD10 foi selecionado pela expressão da proteína EGFP, somente os clones verdes eram coletados. Já nos casos dos vírus MVAD9muD10mu e MVAD9D10rev somente os clones que não expressavam mais as proteínas EGFP foram coletados. Nas primeiras duas rodadas de seleção a imunomarcagem com anticorpos foi utilizada a fim de facilitar a observação dos clones, uma vez que o clone recombinante se encontra em uma quantidade muito inferior ao vírus parental e o ECP que o MVA causa em CEF é bem discreto. Já na terceira e na quarta rodada os clones foram coletados apenas pela observação do ECP.



**FIGURA 21 – Rodadas de seleção dos vírus MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10, MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu.** Os clones coletados foram fotografados durante as rodadas de seleção dos vírus recombinantes. Na primeira coluna estão as fotografias dos clones que expressaram a fluorescência verde no microscópio de fluorescência, correspondentes às rodadas de seleção do vírus MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10. Nas segunda e terceira colunas estão as fotografias tiradas dos clones (que não expressaram fluorescência) sob a microscopia ótica com luz transmissível (branca), correspondentes às rodadas de seleção do vírus MVAD9muD10mu (segunda coluna) e MVAD9D10rev (terceira coluna). Os números indicam em qual rodada de seleção a foto foi tirada. Todas as rodadas de seleção foram realizadas em CEF.



Antes de cada clone ser amplificado, foi verificada, pela técnica de PCR, a existência de contaminação com o DNA do vírus parental. Para isso pares de iniciadores que se ligam nas sequências dos genes D8L e D11L foram utilizados. Os tamanhos dos *amplicons* do vírus recombinante e do vírus parental são diferentes e estão indicados na **FIGURA 22**.

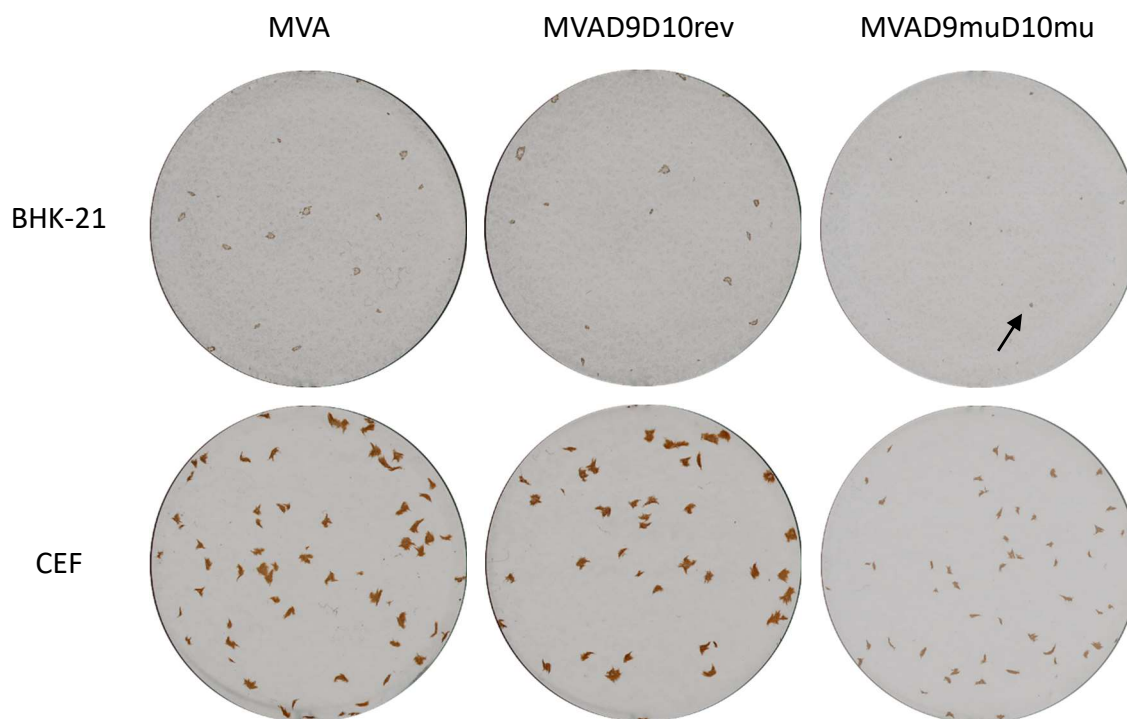


**FIGURA 22 – Verificação da contaminação dos clones com os vírus parentais.** Visualização após fracionamento eletroforético em gel de agarose 1% e TBE 1X dos produtos das PCR utilizadas para verificar a existência de contaminação dos clones selecionados com os vírus parentais. Pares de iniciadores que pareiam com os flancos (genes D8L e D11L) foram utilizados. O tamanho dos *amplicons* esperados para cada vírus está descrito nos quadrados na parte inferior de cada gel. PM, padrão de tamanho molecular *MassRuler DNA* (Life Technologies)

Geralmente, na quarta rodada de seleção já não existia mais contaminação com o vírus parental e os clones seguiam para a fase de amplificação. Caso a contaminação fosse confirmada pela PCR, os clones passavam por mais algumas rodadas de seleção. Após a purificação as regiões gênicas de interesse dos vírus recombinantes foram sequenciadas e as sequências obtidas foram as mesmas descritas no **item 3**. Isto indica que não ocorreram mutações durante os processos de seleção e amplificação dos vírus.

#### 4. Ensaio de placa dos vírus MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu

O primeiro experimento realizado após a construção dos vírus foi o ensaio de placas. Duas linhagens celulares permissivas ao MVA foram cultivadas em placas de seis poços e infectadas com diluições seriadas dos vírus MVA, MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu. As células foram marcadas com anticorpos anti-VACV e as placas virais foram observadas (**FIGURA 23**).



**FIGURA 23** – Ensaio de placa dos vírus MVA, MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu. Monocamadas de CEF e BHK-21, em placas de seis poços, foram infectadas com diluições seriadas dos vírus MVA, MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu. Após a infecção as monocamadas foram cobertas com 0,5% de CMC e incubadas por 72 horas. Em seguida foi feita a imunomarcação para a visualização das placas. A seta está indicando uma placa do vírus MVAD9muD10mu na célula BHK-21.

Os três vírus (MVA parental e recombinantes) formam placas menores nas células BHK-21 do que em CEF (**FIGURA 23**). Além disso, o número de placas formadas em CEF foi em média cinco vezes maior do que em BHK-21, uma vez que a mesma diluição viral foi utilizada para infectar as duas linhagens celulares. O vírus MVAD9D10rev apresentou placas similares ao vírus MVA, como era esperado. Já o vírus MVAD9muD10mu formou placas visivelmente menores do que os vírus controles em ambas as linhagens celulares testadas.

## 5. Ensaio de infectividade viral

Uma vez que a formação de placas depende da disseminação viral de célula a célula, assim como a replicação, o próximo passo foi avaliar as curvas de ciclo único e de crescimento dos vírus MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu. Como a correta reinserção da ORF original no vírus MVAD9D10rev foi confirmada pelo sequenciamento e esse vírus apresentou um perfil semelhante ao do MVA no ensaio de placas, nós optamos por usar apenas ele como controle nos ensaios de infectividade viral.

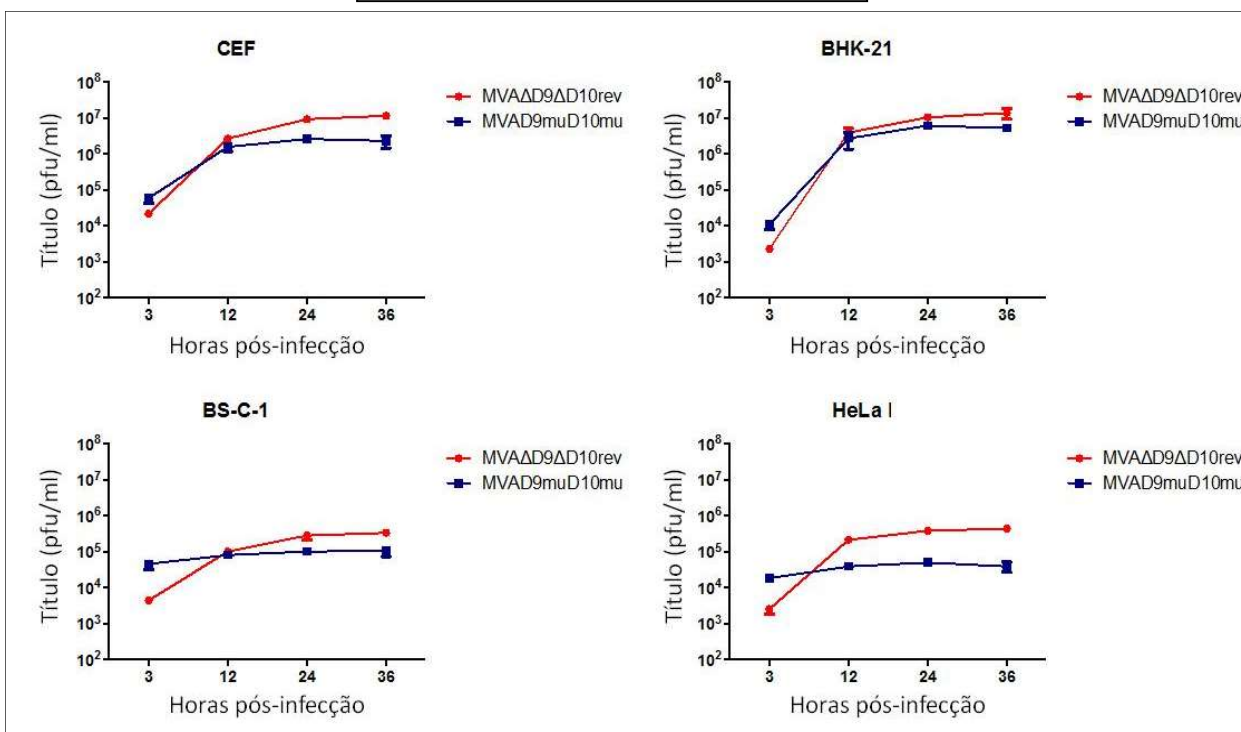
Quatro linhagens celulares (CEF, BHK-21, BC-S-1 e HeLa), implantadas em placas de 12 poços, foram infectadas com os vírus MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu em uma M.O.I de 5 ou de 0,5. Nos tempos determinados (3, 12, 24 e 36 horas) as monocamadas celulares foram raspadas e tituladas em CEF.

Os dois vírus apresentaram rendimentos similares em todas as curvas de ciclo único das quatro linhagens celulares analisadas. Entretanto, uma tendência de redução do rendimento do vírus duplo mutante foi observada em todas as células. Essa redução foi de meio log em CEF, BHK-21 e BS-C-1 e de 1 log na célula HeLa (**FIGURA 24**).

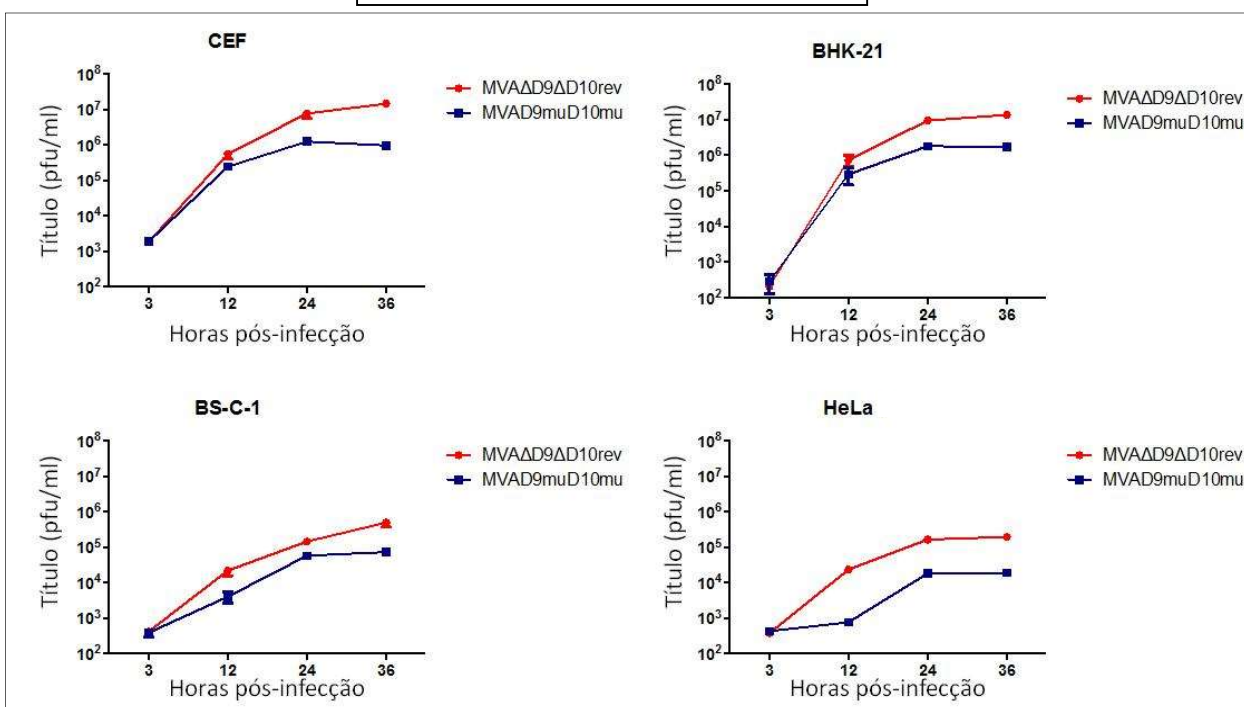
A diferença de rendimento entre os dois vírus foi maior quando as células foram infectadas com 10 vezes menos partículas virais. Em todas as linhagens celulares analisadas o vírus MVAD9muD10mu apresentou 1 log a menos no título viral quando comparado ao vírus controle (MVAD9D10rev).

Apesar do tamanho das placas formadas pelo vírus duplo mutante ser bem menor do que das placas do vírus controle, não foi observada uma redução drástica entre o rendimento viral obtido pelos dois vírus em diferentes linhagens celulares.

Curvas de ciclo único (M.O.I = 5)



Curvas de crescimento (M.O.I = 0.5)



**FIGURA 24** – Curvas de ciclo único e de crescimento dos vírus MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu. Monocamadas de CEF, BHK-21, BS-C-1 e HeLa, em placas de 12 poços, foram infectadas com os vírus indicados em uma M.O.I de 5 ou de 0,5. As monocamadas foram coletadas 3, 12, 24 e 36 horas pós-infecção. Os títulos virais foram determinados por ensaios de placas em CEF.

## 6. Detecção das proteínas virais por ensaio de *Western Blot*

A síntese das proteínas virais foi analisada por ensaios de *Western Blot* para verificar se existe algum dano na produção de proteínas virais em diferentes células infectadas pelos vírus MVAD9muD10mu.

Monocamadas de CEF, BHK-21, BC-S-1 e HeLa, cultivadas em placas de 12 poços, foram infectadas com os vírus MVA, MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu em uma M.O.I de 5 na presença ou não de AraC. Nos tempos determinados as células foram coletadas e as proteínas foram extraídas e submetidas ao ensaio de Western Blot.

O padrão de proteínas virais obtido nas quatro linhagens celulares infectadas foi similar para os três vírus estudados. Porém, algumas considerações devem ser feitas.

Nas células HeLa, BS-C-1 e CEF podemos notar uma redução ou ausência de algumas proteínas intermediárias/tardias expressas 8 horas p.i. nas células infectadas com o vírus duplo mutante. Observando o perfil proteico das células 24 horas p.i. essas proteínas já podem ser visualizadas no blot, indicando que houve um atraso na expressão das mesmas. Porém, algumas proteínas realmente não foram expressas em CEF infectadas pelos vírus duplo mutante, nos tempos analisados. O contrário foi observado nas células BHK-21, onde nas células infectadas com o vírus MVAD9muD10mu algumas proteínas estavam expressas em maiores quantidades 24 horas p.i. Este evento biológico pode ter sido causado tanto pelo aumento real na expressão dessas proteínas, quanto pela persistência maior dos mRNA virais nas células infectadas com o vírus deficiente nas proteínas D9 e D10 (**FIGURA 25**).

Utilizamos a proteína celular – GAPDH – como normalizadora para demonstrar que todas as amostras foram aplicadas na mesma concentração. Entretanto a expressão de GAPDH foi bem fraca nos tempos de 24 horas p.i. das células CEF infectadas com os três vírus. Acreditamos que isto aconteceu devido ao fato de que o MVA se multiplica melhor nessa linhagem celular e, por isso os vírus foram capazes de interromper a síntese proteica das proteínas celulares.

De maneira intrigante, o vírus duplo mutante produziu mais proteínas precoces do que os vírus MVA e MVAD9D10rev em todas as linhagens celulares analisadas. Para tentar descobrir o porquê desse padrão diferente, determinamos o número de partículas virais com um auxílio de um contador de vírus (ViroCyt - Denver, EUA), esse aparelho é um citômetro de fluxo especializado que contabiliza o número de partículas virais que possuem ácidos nucleicos e proteínas. A razão

do número de partículas por PFU (partícula/pfu) calculado para o vírus MVAD9muD10mu foi 207, cem vezes a mais do que para o vírus MVAD9D10rev que teve um valor igual a 2 (**TABELA XI**).

É importante destacar que as curvas de ciclo único e de multiplicação e os ensaios de Western Blot foram feitas com uma PFU igual para os três vírus. Porém, o número de partículas virais utilizados para o vírus MVAD9muD10mu foi cem vezes maior do que para o controle. Além disso, esses experimentos foram realizados apenas uma única vez, seria interessante a repetição considerando o mesmo número de partículas virais para todos os vírus.

**TABELA XI**  
**Resultados obtidos no contador de vírus**

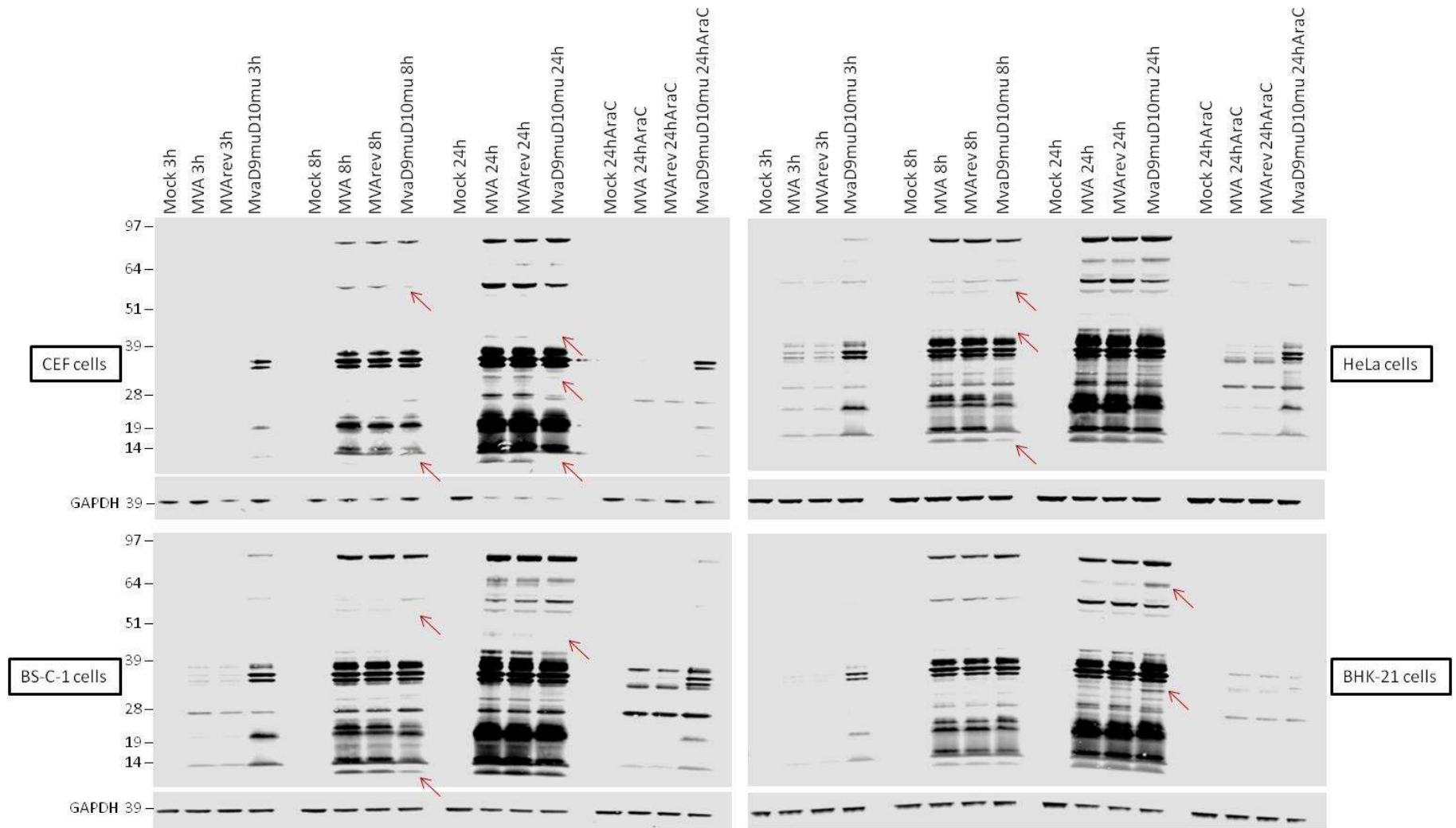
<b>Amostras</b>	<b>PFU/mL</b>	<b>Resultado (partículas virais/mL)</b>	<b>partícula/ unidade infecciosa</b>
MVAD9muD10mu	1.35E+06	2.80E+08	207
MVAD9D10rev	1.33E+06	2.60E+06	2

Obs.: Na primeira coluna aparecem os nomes das amostras, em seguida a concentração de cada vírus calculada pelo ensaio de placas. A terceira coluna mostra o resultado obtido no aparelho e por último a razão entre partículas virais por partículas infecciosas.

## 7. Análise do ciclo viral através de microscopia eletrônica

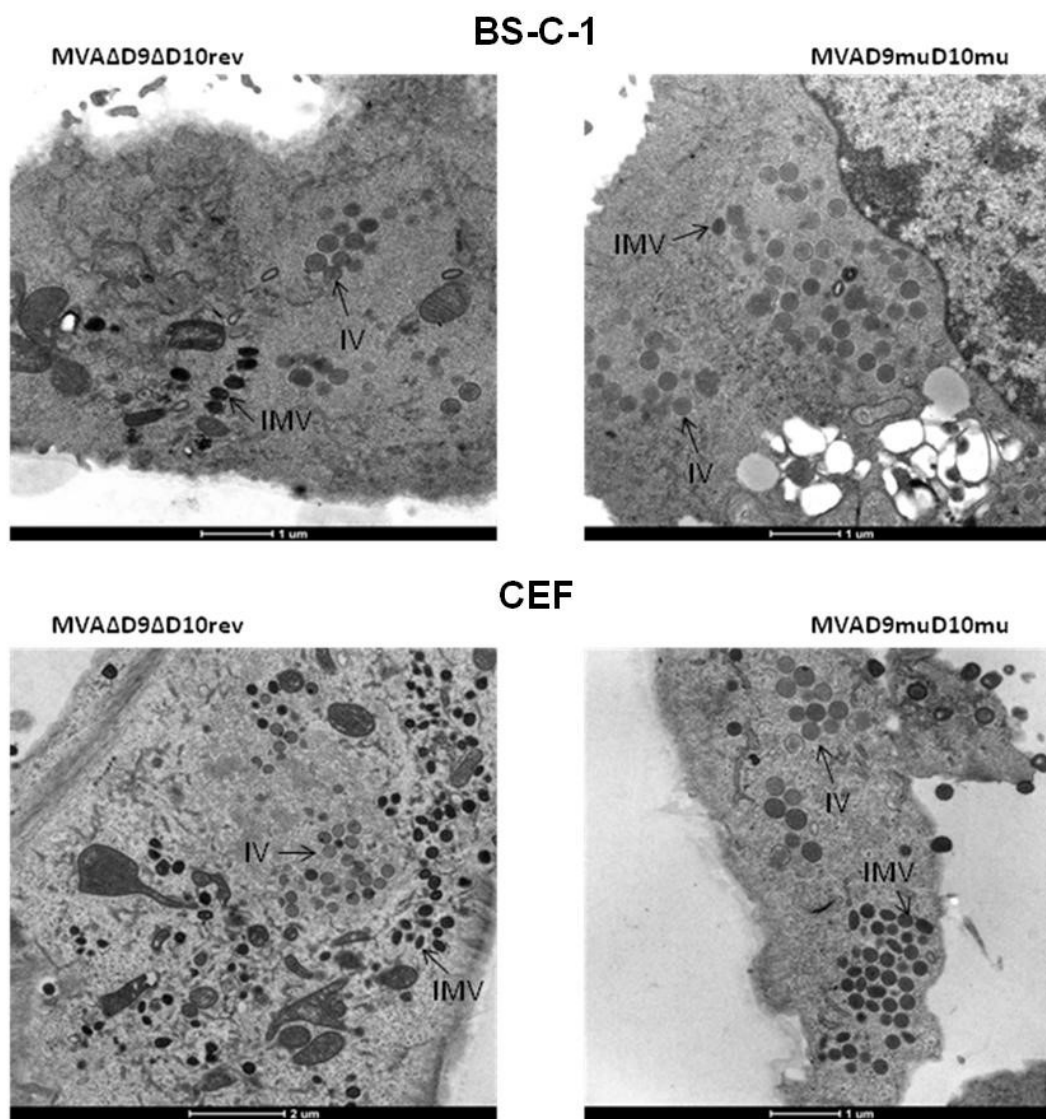
Para verificar algum possível defeito no ciclo de multiplicação do vírus MVAD9muD10mu, células CEF e BS-C-1 foram infectadas em uma M.O.I de 5 com os vírus MVAD9muD10mu e MVAD9D10rev. Após 12 ou 20 horas de infecção as células foram submetidas à técnica de microscopia eletrônica.

Os dois vírus produziram partículas imaturas e maduras nas duas células avaliadas. Nenhuma grande alteração foi vista no ciclo de replicação do vírus duplo mutante (**FIGURA 26**). Ambos os vírus demoraram mais tempo para produzir partículas maduras nas células BS-C-1 do que em CEF (dados não mostrados).



**FIGURA 25 – Expressão das proteínas virais em diferentes linhagens celulares.** Monocamadas de CEF, BHK-21, BS-C-1 e HeLa, em placas de 12 poços, foram infectadas com os vírus indicados em uma M.O.I de 5 na ausência ou na presença de AraC e coletadas nos tempos determinados após a infecção. Os extratos proteicos foram analisados por Western Blot utilizando um anticorpo policlonal anti-VACV produzido em coelho seguido de um anticorpo secundário conjugado a peroxidase. A massa em kDa do padrão de proteína está indicada no lado esquerdo de cada blot.

Aparentemente nenhum defeito no ciclo do vírus duplo mutante foi detectado. De acordo com os resultados obtidos no contador viral, esse vírus produz um número maior de vírus que não são capazes de realizar um ciclo completo na célula e se disseminar para as células vizinhas do que o vírus MVAD9D10rev.



**FIGURA 26** – Microscopia eletrônica de transmissão de células infectadas com os vírus MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu. Monocamadas de CEF, BHK-21, BS-C-1 e HeLa, em placas de 60 mm, foram infectadas com os vírus indicados e preparadas para microscopia eletrônica 20 horas após a infecção. Uma variação típica entre as formas virais maduras e imaturas foram observadas em ambas as células infectadas pelos dois vírus. IV, partícula imatura; IMV, vírus maduro intracelular.

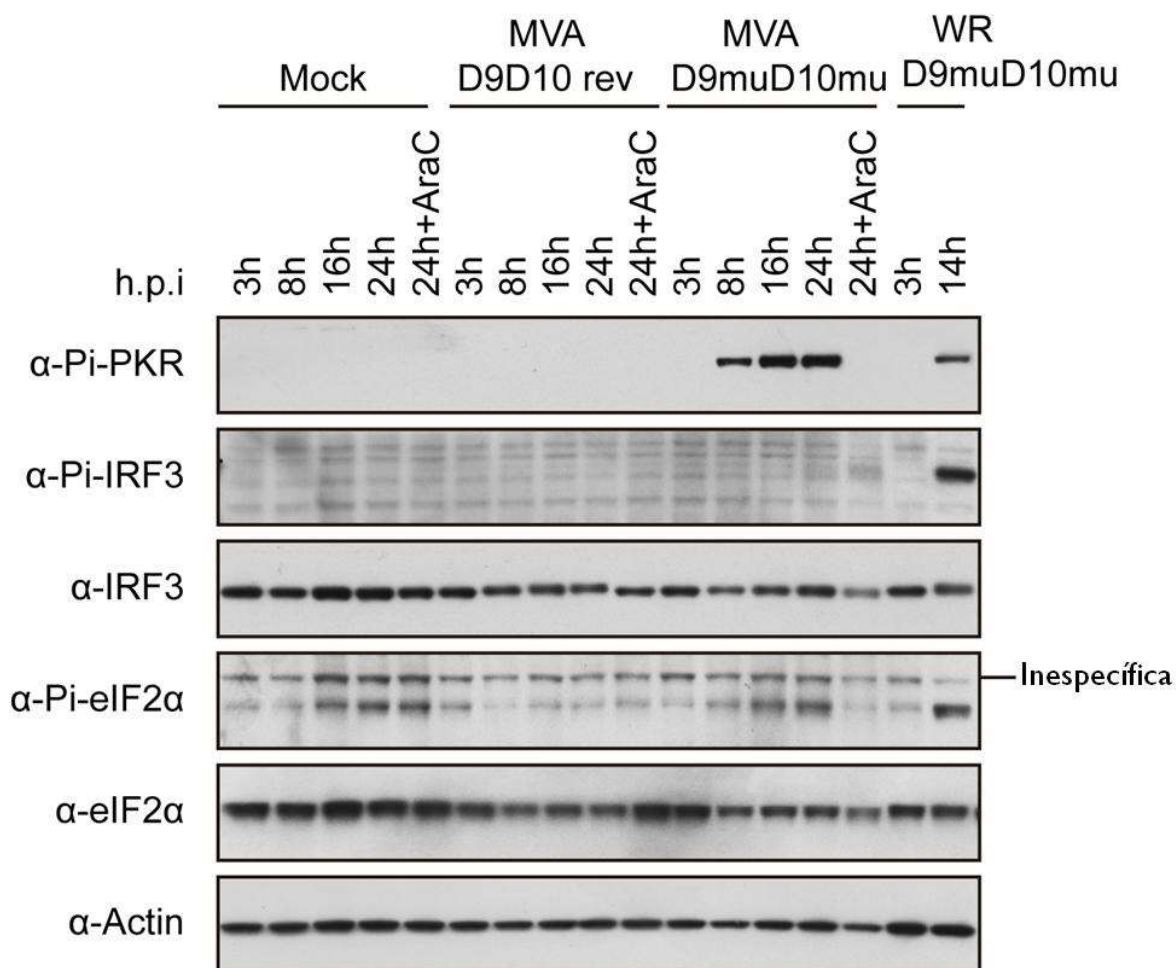


## 8. Detecção da fosforilação de PKR, eIF2 $\alpha$ e IRF3 através do ensaio de Western Blot

Já foi descrito na literatura que o vírus WRD9muD10mu (contendo as mesmas mutações nos sítios catalíticos das enzimas que foram utilizadas neste trabalho) induz a fosforilação de PKR, eIF2 $\alpha$  e IRF3 nas células BS-C-1 infectadas (Liu, S. W., G. C. Katsafanas, et al., 2015). Diante dessa informação resolvemos verificar se o MVAD9muD10mu apresentava o mesmo perfil.

Para isso, células BS-C-1, cultivadas em placas de 12 poços, foram infectadas com os vírus MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu na presença ou ausência de AraC, reagente que impede a replicação do DNA. Nos tempos determinados as monocamadas celulares foram coletadas e os extratos proteicos foram submetidos ao ensaio de *Western Blot*. O vírus WRD9muD10mu foi utilizado como comparação.

O vírus MVAD9muD10mu induziu uma forte fosforilação de PKR a partir de 8 horas de infecção. O fator de transcrição eIF2 $\alpha$  também foi fosforilado, entretanto a fosforilação ocorreu de maneira menos intensa e somente a partir de 16 horas após a infecção. Em ambos os casos o vírus revertente não induziu fosforilação significativa. Nenhuma fosforilação de IRF3 foi visualizada nas células infectadas com o MVA duplo mutante nos tempos testados. Além disso, as fosforilações foram completamente inibidas na presença de AraC, indicando que esse fenômeno depende da replicação do DNA viral ou da expressão de genes tardios (**FIGURA 27**).



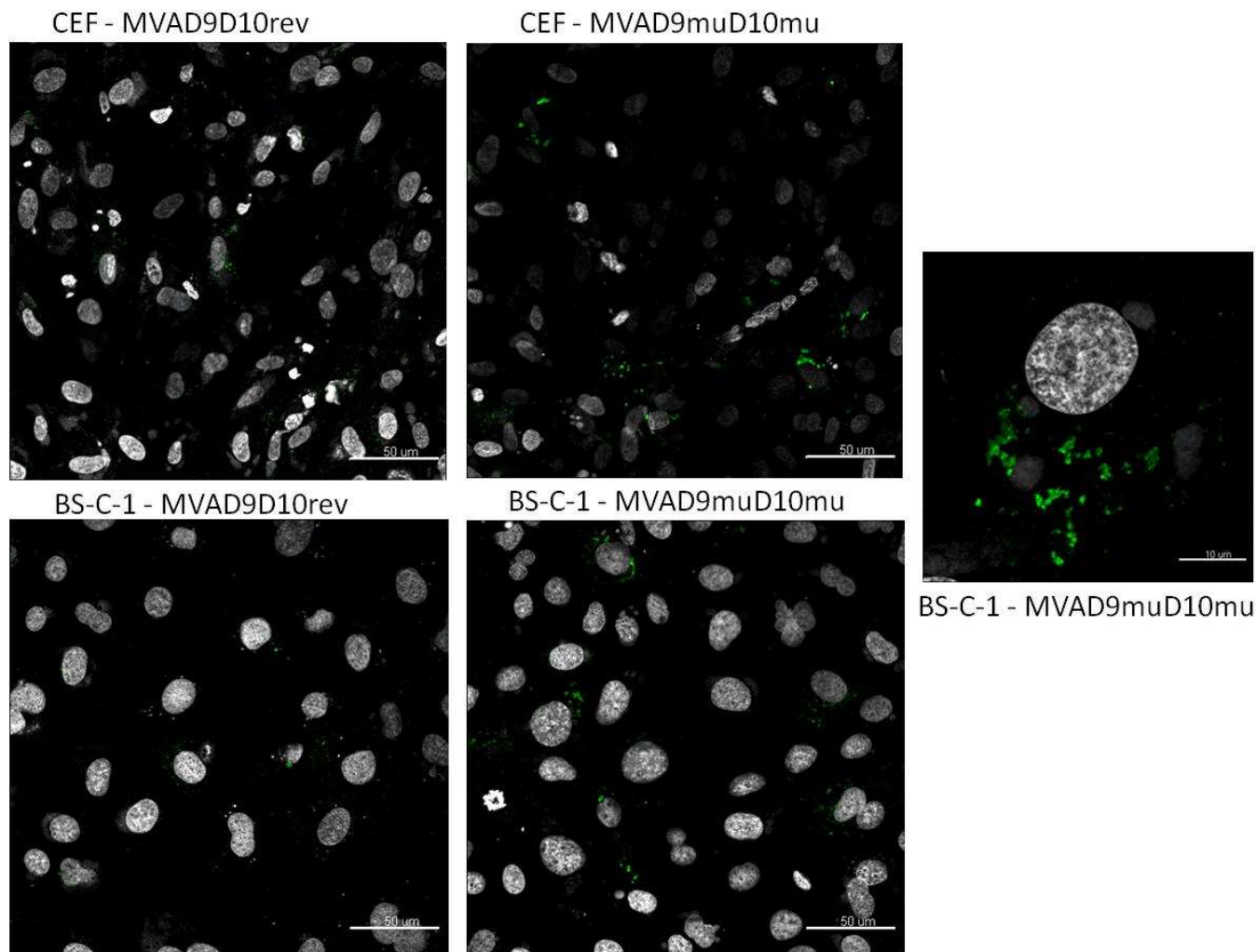
**FIGURA 27 – Fosforilação de PKR, eIF2 $\alpha$  e IRF3 nas células BS-C-1 infectadas com os vírus MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu.** Monocamadas de BS-C-1, em placas de 12 poços, foram infectadas com os vírus indicados em uma M.O.I de 5 na ausência ou na presença de AraC e coletadas nos tempos determinados após a infecção. Os extratos proteicos foram analisados por Western Blot utilizando anticorpos monoclonais produzidos em coelhos contra PKR fosforilada (p-PKR), eIF2 $\alpha$ , eIF2 $\alpha$  fosforilado (p-eIF2 $\alpha$ ), IRF3, IRF3 fosforilado (p-IRF3) seguido de um anticorpo secundário anti-coelho conjugado a peroxidase.

## 9. Visualização do acúmulo de dsRNA através da microscopia confocal

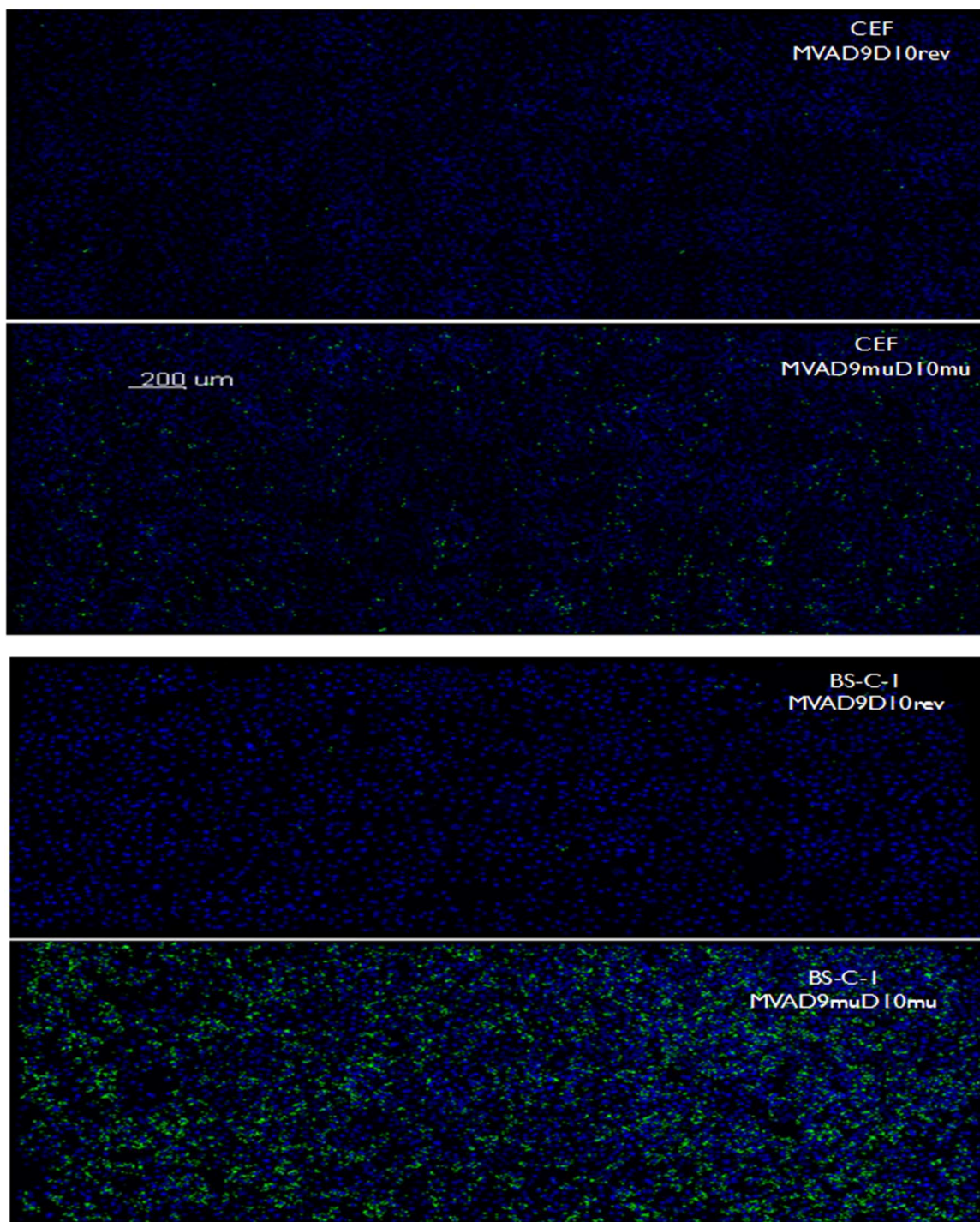
Os dados descritos no item anterior sugerem um aumento na produção de agentes indutores de cascatas de fosforilação de sensores celulares, tais como dsRNA, ou mesmo um acúmulo destas moléculas nas células infectadas pelo MVAD9muD10mu. Para verificar essa possibilidade, monocamadas de CEF e BS-C-1 foram inoculadas com os vírus MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu em uma M.O.I de 5 e após 12 horas da infecção as células foram preparadas

para a microscopia confocal. O corante DAPI foi utilizado para visualizar o núcleo e as fábricas virais e os dsRNA foram marcados com o anticorpo J2.

Um maior número de células produzindo dsRNA foi observado nas células infectadas com o vírus MVAD9muD10mu do que nas células infectadas com o vírus controle. Além disso, foi possível observar que o dsRNA aparece geralmente associado as fábricas virais (**FIGURA 28**).

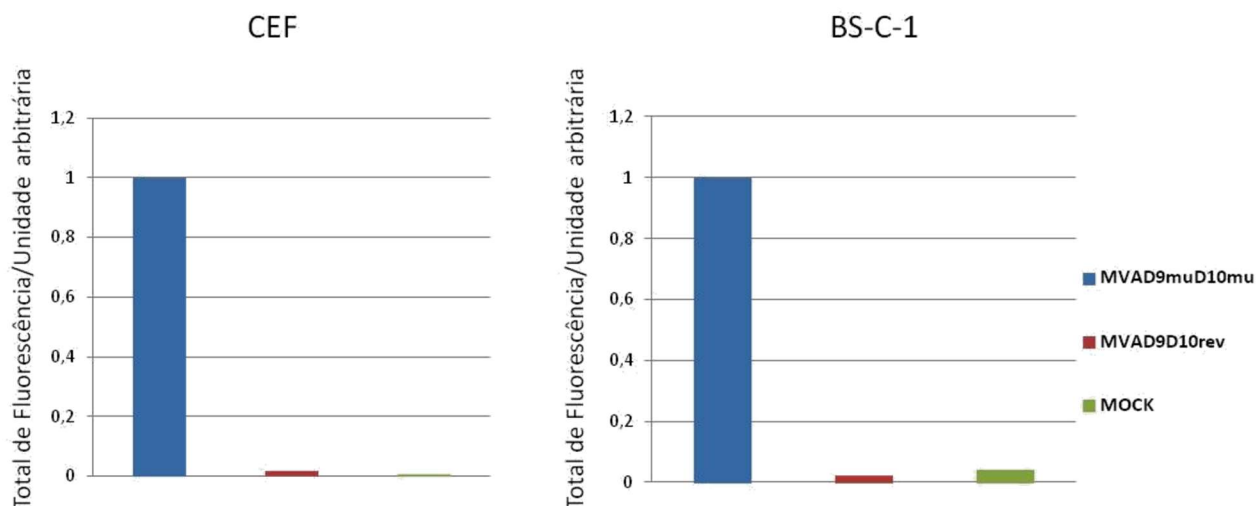


**FIGURA 28 – Acúmulo de dsRNA nas células infectadas com os vírus MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu.** Monocamadas de BS-C-1 e CEF, implantadas em lamínulas, foram infectadas com os vírus indicados em uma M.O.I de 5. Doze horas após a infecção as células foram fixadas e marcadas com o anticorpo monoclonal J2 (produzido em camundongo) específico para dsRNA seguido pelo anticorpo anti-camundongo conjugado e o corante DAPI. As imagens mostram o dsRNA em verde e o DNA em branco.



**FIGURA 29 – Produção de dsRNA nas células infectadas com os vírus MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu.** Monocamadas de BS-C-1 e CEF, implantadas em lamínulas, foram infectadas com os vírus indicados em uma M.O.I de 5. 12 horas após a infecção as células foram fixadas e marcadas com o anticorpo monoclonal J2 (produzido em camundongo) específico para dsRNA seguido pelo anticorpo anti-camundongo conjugado e o corante DAPI. As fotos foram tiradas com o auxílio da técnica “tiling”, onde 50 quadrantes diferentes foram fotografados, representando de maneira geral o acúmulo de dsRNA nas células infectadas. As imagens mostram o dsRNA em verde e o DNA em azul.

Com o auxílio da técnica “tilling” foram capturadas, de forma arbitrária, 50 fotos de diferentes quadrantes da lamínula totalizando entre 1.200 a 4.500 células. Essas fotos juntas formam uma imagem panorâmica que representa uma visão geral da lamínula (**FIGURA 29**). Utilizando o programa Imaris image calculamos a intensidade de fluorescência da marcação do dsRNA em cada célula infectada ou não infectada. Os resultados estão apresentados em forma de gráfico na **FIGURA 30**, confirmando que as células infectadas com o MVAD9muD10mu possuem um maior acúmulo de dsRNA.



**FIGURA 30 – Expressão do dsRNA nas células infectadas com os vírus MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu.** Monocamadas de BS-C-1 e CEF, implantadas em lamínulas, foram infectadas com os vírus indicados em uma M.O.I de 5. 12 horas após a infecção as células foram fixadas e marcadas com o anticorpo monoclonal J2 (produzido em camundongo) específico para dsRNA seguido pelo anticorpo anti-camundongo conjugado e o corante DAPI. A intensidade de fluorescência por célula foi determinada usando o programa de imagem Imaris. A intensidade acumulativa foi calculada automaticamente para 50 quadrantes, o que corresponde entre 1.200 a 4.500 células. Após a normalização do número de células nas diferentes amostras o dado foi representado em forma de gráfico como a média da intensidade média de fluorescência.

## **Resultados referentes ao estudo funcional do gene B18R**

### **10. Obtenção dos diferentes fragmentos utilizados nas construções dos vírus MVA $\Delta$ B18, MVAB18rev, MVAB18 e WR $\Delta$ B18**

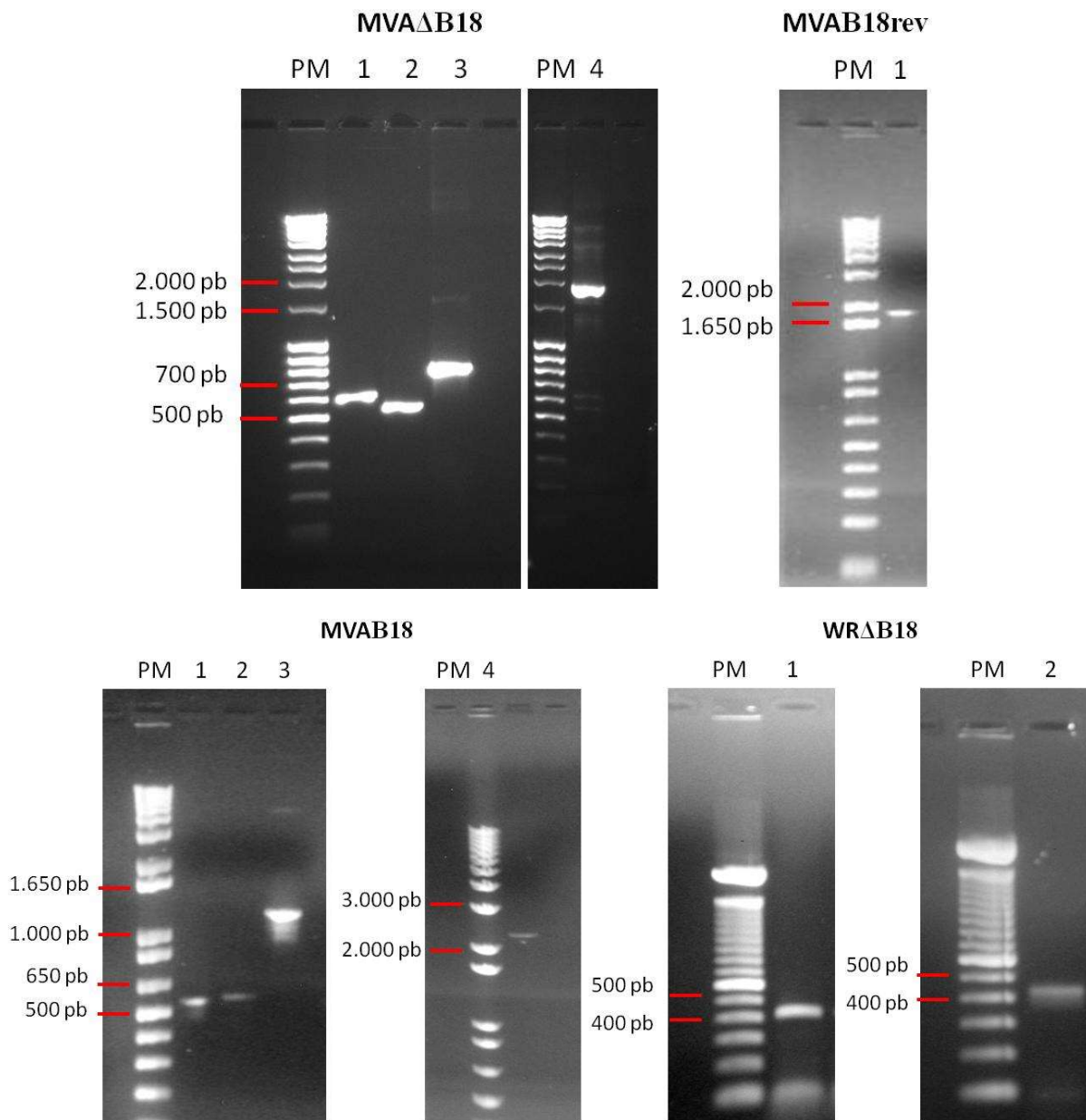
O vírus MVA $\Delta$ B18 foi derivado da amostra MVA, no qual a ORF truncada do gene homólogo a B18R foi substituída pela ORF do gene EGFP através de recombinação homóloga. O molde para a amplificação do gene EGFP foi o vírus WR $\Delta$ D10 construído por Parrish em 2006 (Parrish, S. e B. Moss.,2006). Para a amplificação dos flancos B17R e VACV-Acam3000-190 o molde de DNA foi genoma do vírus MVA.

O vírus MVAB18R foi construído através da substituição da ORF EGFP pelas ORF B18R original do vírus WR com a sequência da etiqueta FLAG na extremidade 3'. Para confirmar que o fenótipo observado no vírus mutante foi mesmo causado pela ausência ou presença do gene B18R a ORF truncada original do MVA foi reinserida no vírus MVA $\Delta$ B18 dando origem ao MVAB18rev (rev = revertente). Este vírus foi utilizado como um controle assim como a amostra MVA.

Para a construção dos vírus MVA $\Delta$ B18 e MVAB18 foi necessário um conjunto de quatro reações de PCR (para cada vírus) baseadas nas sobreposições dos seus fragmentos. Já o vírus MVAB18rev foi construído através de uma única reação de PCR (**FIGURAS 12, 13 e 14**). Todos os iniciadores utilizados foram descritos anteriormente nas **TABELAS V, VI e VII**.

O vírus WR $\Delta$ B18 foi construído com duas reações de PCR simples, uma para cada um dos flancos (WR-199 e WR-201). O molde de DNA utilizado nas duas reações foi o genoma do vírus WR. Os iniciadores utilizados nestas duas reações foram descritos anteriormente na **TABELA VIII**.

Os tamanhos dos *amplicons* de cada reação estão demonstrados na **FIGURA 31**. Eles foram purificados do gel de agarose e os fragmentos que foram utilizados para a construção dos MVA recombinantes foram inseridos no vetor TOPO, já os dois flancos utilizados na construção do WR $\Delta$ B18 foram inseridos no pZippy-NEO/GUS. Bactérias TOP10 ou XL10 Gold competentes foram transformadas com os vetores contendo os insertos e alguns clones bacterianos positivos para a presença de cada inserto tiveram os plasmídeos extraídos e sequenciados. Os clones sem mutações, ou com apenas mutações silenciosas, foram escolhidos para a utilização na construção dos vírus recombinantes.



**FIGURA 31 – Amplificação dos fragmentos utilizados nas construções dos vírus MVAΔB18, MVAB18rev, MVAB18 e WRΔB18.** Visualização após fracionamento eletroforético em gel de agarose 1% e TBE 1X dos produtos das PCR utilizadas nas construções dos vírus recombinantes. Tamanhos esperados para cada *amplicon* - PCR1: 612 pb, PCR2: 534 pb, PCR3: 794 pb e PCR4: 1.899 pb (MVAΔB18); PCR1: 1.831 pb (MVAB18rev); PCR1: 547 pb, PCR2: 566 pb, PCR3: 1.167 pb e PCR4: 2.237 pb (MVAB18); PCR1: 443 pb e PCR2: 433 pb (WRΔB18). PM, padrão de tamanho molecular *MassRuler DNA* (Life Technologies), 100 pb DNA *Ladder* (Invitrogen) ou 1 Kb DNA *Ladder* (Invitrogen); 1, PCR1; 2, PCR2; 3, PCR3 e 4, PCR4

## 11. Sequenciamento e análise das sequências (TOPO/ $\Delta$ B18, TOPO/B18rev, TOPO/B18 e pZippy-NEO/GUS/Flancos 1 e 2)

Após análise dos cromatogramas, as sequências consenso geradas para cada clone foram avaliadas com o intuito de verificar se os genes estavam em condições adequadas para expressão.

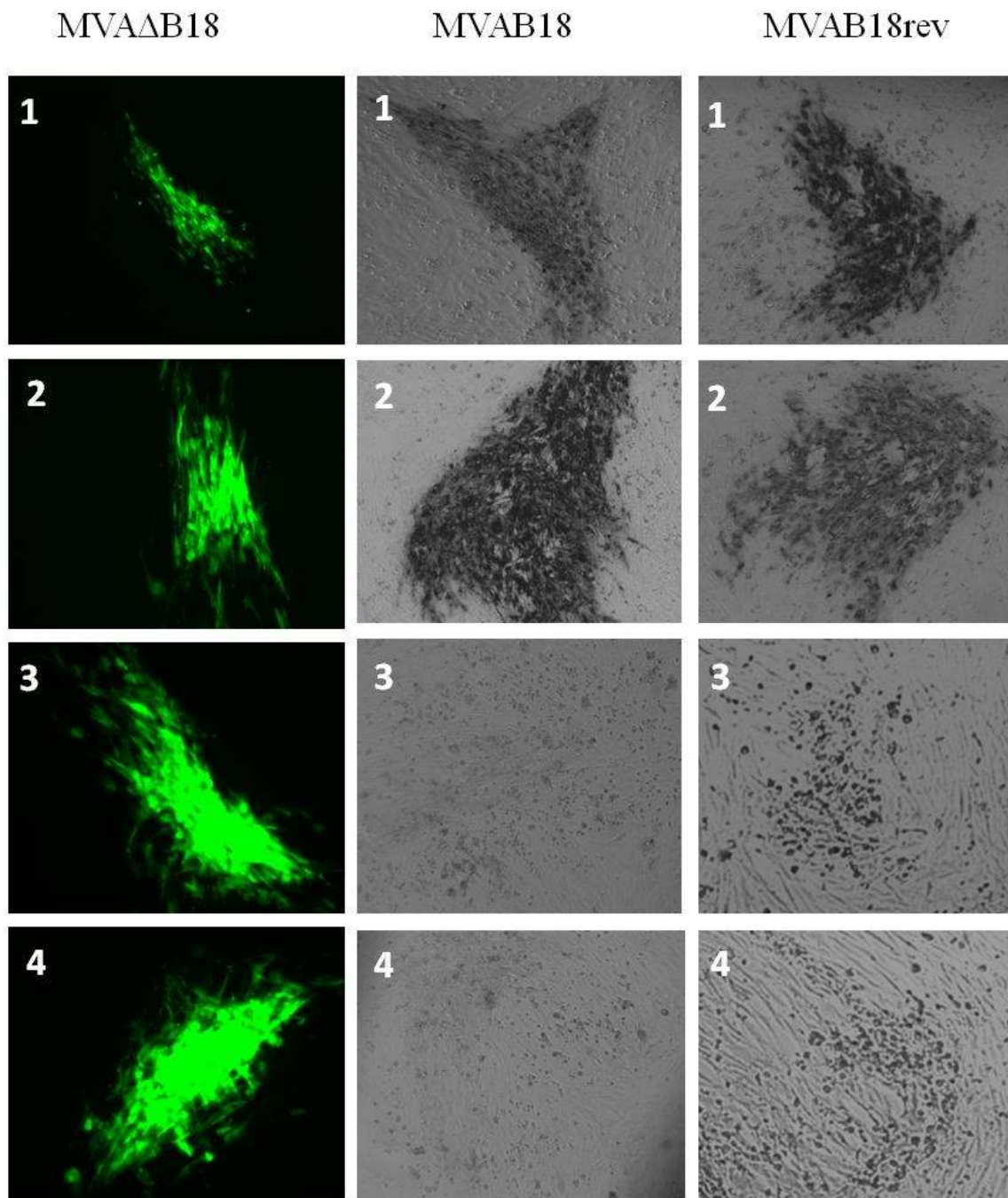
Os alinhamentos das sequências consenso com as sequências desenhadas para as construções dos vírus estão apresentadas nos **ANEXOS**. As sequências dos clones utilizados na construção do vírus MVA $\Delta$ B18 e do vírus MVAB18rev estão corretas. Já a sequência utilizada na construção do vírus MVAB18 possui uma mutação silenciosa na região intergênica entre as ORF B18R e VACV-Acam3000-190. Por fim, a sequência do clone contendo os flancos utilizados na construção do vírus WR $\Delta$ B18 está correta. Os genes NEO e GUS originados do plasmídeo pZippy não foram totalmente sequenciados, uma vez que mutações nestas sequências não implicam em alterações nos resultados que serão descritos a seguir.

## 12. Geração dos vírus recombinantes MVA $\Delta$ B18, MVAB18rev, MVAB18 e WR $\Delta$ B18

De posse das sequências dos plasmídeos contendo os insertos, os vírus recombinantes foram gerados por meio de recombinação homóloga em CEF ou BS-C-40. As células foram infectadas com os vírus parentais e transfectadas com os plasmídeos. Em seguida, os vírus recombinantes foram selecionados por sucessivas rodadas (4) de purificação de placas, amplificados, sequenciados, purificados e titulados.

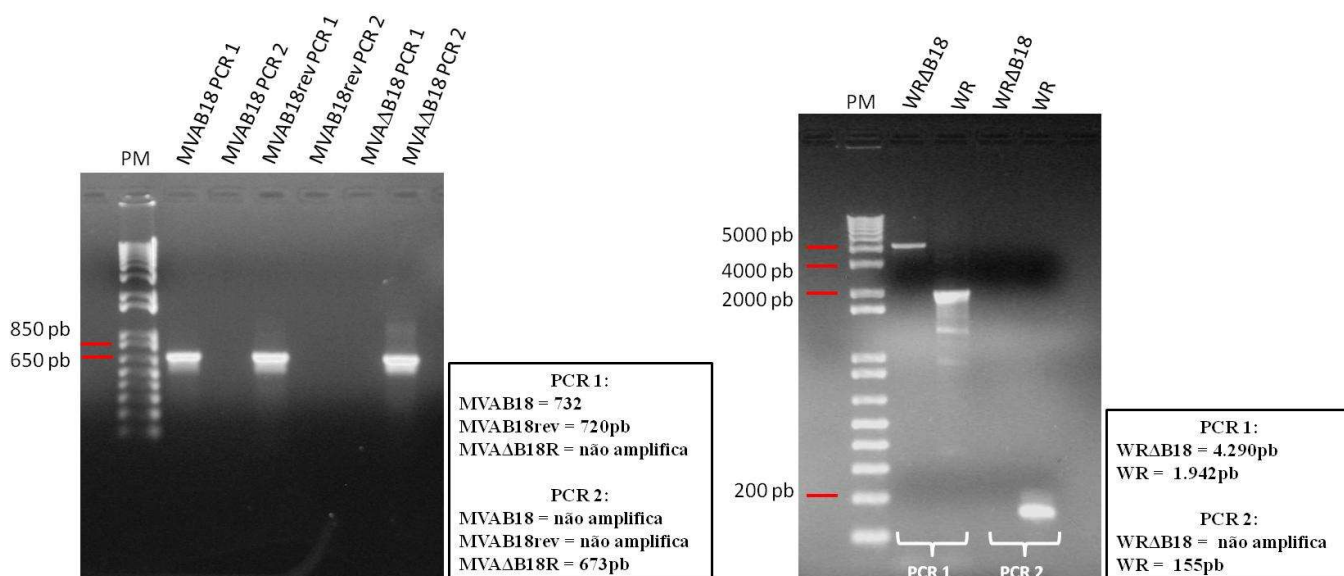
Na **FIGURA 32** estão representadas as rodadas de seleção dos três vírus MVA recombinantes. Já a seleção do vírus WR $\Delta$ B18 não será apresentada. O vírus MVA $\Delta$ B18 foi selecionado pela expressão da proteína EGFP, somente os clones verdes eram coletados. Já nos casos dos vírus MVAB18 e MVAB18rev somente os clones que não expressavam mais as proteínas EGFP foram coletados. Nas primeiras duas rodadas de seleção a imunomarcação com anticorpos foi utilizada a fim de facilitar a observação dos clones, uma vez que o clone recombinante se encontra em uma quantidade muito inferior ao vírus parental e o ECP que o MVA causa em CEF é bem discreto. Na terceira e quarta rodadas os clones foram coletados apenas pela observação do ECP.





**FIGURA 32 – Rodadas de seleção dos vírus MVA $\Delta$ B18, MVAB18rev e MVAB18.** Os clones coletados foram fotografados durante as rodadas de seleção dos vírus recombinantes. Na primeira coluna estão as fotografias dos clones que expressaram a fluorescência verde no microscópio de fluorescência, correspondentes às rodadas de seleção do vírus MVA $\Delta$ B18. Nas segunda e terceira colunas estão as fotografias tiradas dos clones (que não expressam fluorescência) sob a microscopia ótica com luz transmissível (branca), correspondentes às rodadas de seleção do vírus MVAB18 (segunda coluna) e MVAB18rev (terceira coluna). Os números indicam em qual rodada de seleção a foto foi tirada. Todas as rodadas de seleção foram realizadas em CEF.

Antes de cada clone ser amplificado, foi verificada, pela técnica de PCR, a existência de contaminação com o DNA do vírus parental. Para isso um par de iniciadores que se ligam nas sequências dos genes B17R e VACV-Acam3000-190 e outro que amplifica a região interna ou do gene B18R ou do gene EGFP foram utilizados para os clones dos vírus MVA recombinantes. Já para o clone do vírus WR $\Delta$ B18 outros dois pares de iniciadores foram utilizados. O primeiro par se liga nos flancos WR-199 e WR-200 e o outro par de iniciadores foi desenhado para amplificar a parte interna do gene B18R (WR-200). Os resultados das reações de PCR estão detalhados na **FIGURA 33**.



**FIGURA 33 – Verificação da contaminação dos clones com os vírus parentais.** Visualização após fracionamento eletroforético em gel de agarose 1% e TBE 1X dos produtos das PCR utilizadas para verificar a existência de contaminação dos clones selecionados com os vírus parentais. Pares de iniciadores que amplificam os flancos ou que amplificam os genes de interesse foram utilizados. O tamanho dos amplificadores esperados para cada vírus está descrito nos quadrados ao lado de cada gel. PM, 1 Kb DNA *Ladder* (Invitrogen).

Geralmente, na quarta rodada de seleção já não era possível identificar contaminação com o vírus parental e os clones seguiam para a fase de amplificação. Caso a contaminação fosse confirmada pela PCR, os clones passavam por mais algumas rodadas de seleção. Após a purificação os vírus recombinantes foram sequenciados e as sequências obtidas foram as mesmas descritas no

**item 11.** Indicando que não ocorreram mutações durante os processos de seleção e amplificação dos vírus.

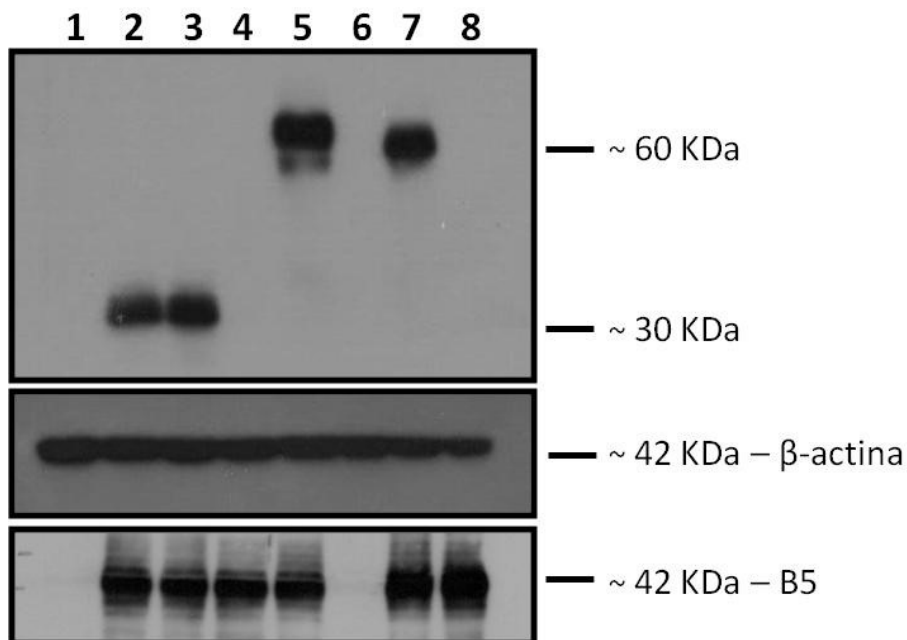
### **13. Verificação das construções dos vírus recombinantes através do Ensaio de *Western Blot***

O primeiro experimento realizado após a construção dos vírus foi o Ensaio de *Western Blot* para verificar se o gene codificador da proteína B18 foi mesmo removido dos vírus MVA $\Delta$ B18 e WR $\Delta$ B18 e se ela foi inserida corretamente no vírus MVAB18.

Duas linhagens celulares foram utilizadas neste ensaio: monocamadas de CEF foram infectadas com os vírus MVA selvagem e recombinantes e monocamadas de BS-C-40 foram infectadas com os vírus WR e WR $\Delta$ B18. Após 24 horas as monocamadas foram coletadas e os extratos proteicos foram submetidos ao ensaio de *Western Blot*.

A detecção da proteína B18 foi feita utilizando um anticorpo comercial anti-B18 (R&D Systems AF8185). Podemos observar na **FIGURA 34** que a proteína truncada dos vírus MVA e MVAB18rev também foi reconhecida pelo anticorpo e pode ser visualizada no blot na altura de 30 KDa. A proteína B18 dos vírus MVAB18 e WR foram detectadas por volta de 60 KDa e nenhuma proteína foi visualizada nos controles de célula nem nas células infectadas com as amostras MVA $\Delta$ B18 e WR $\Delta$ B18, indicando que todos os vírus foram construídos corretamente. Além disso, podemos concluir que a proteína inserida no vírus MVA está sendo expressa normalmente.

A membrana também foi incubada com um anticorpo anti- $\beta$ -actina para mostrar que todas as amostras foram aplicadas na mesma quantidade e com um anticorpo anti-B5 (glicoproteína transmembrana tipo I presente na partícula viral EEV) indicando que todas as células, com exceção dos controles, foram infectadas.



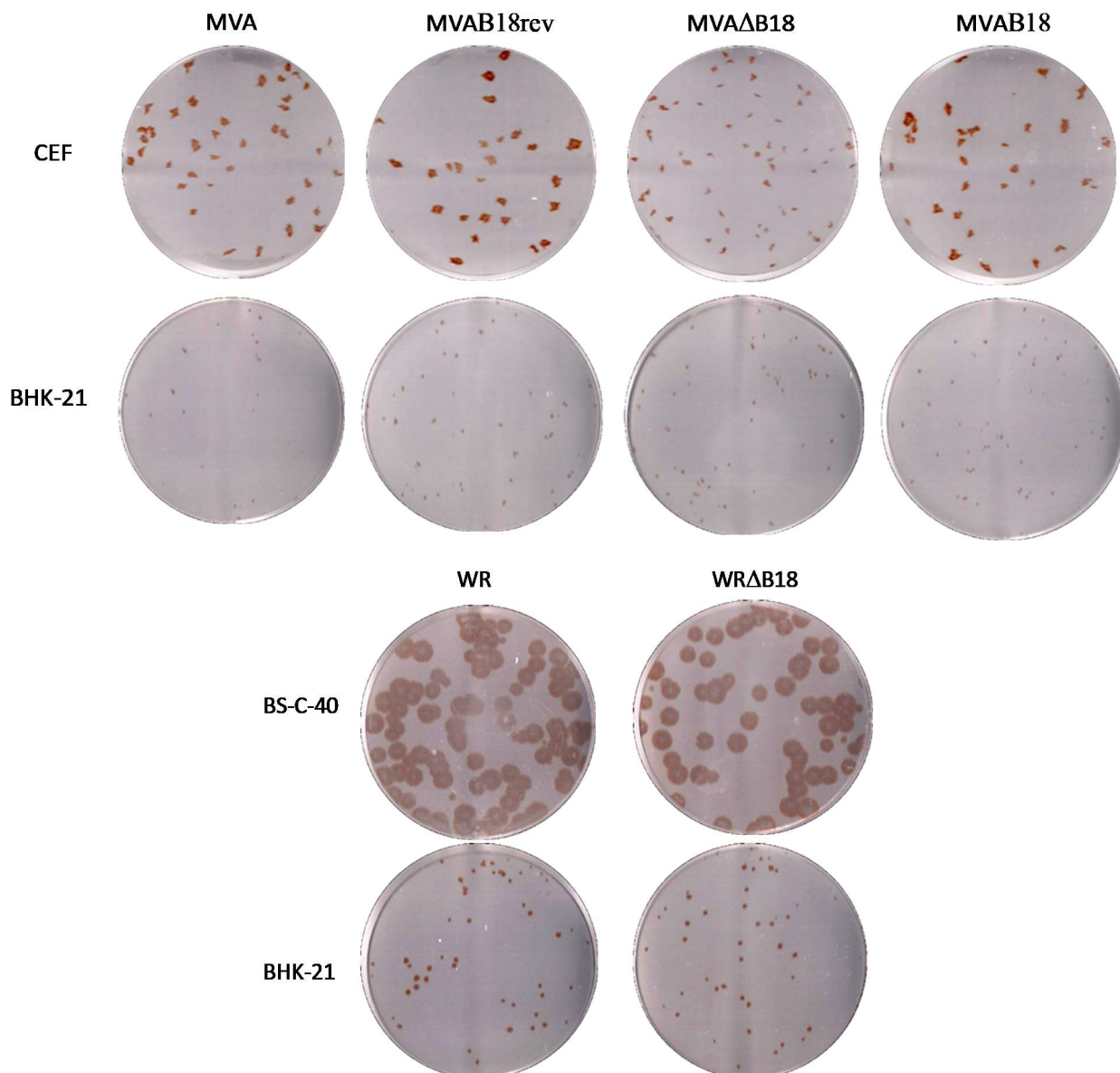
**FIGURA 34 – Detecção da expressão proteína B18 pelos vírus MVA, MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18 e WR.** Western Blot utilizando o extrato proteico das células CEF infectadas com os vírus MVA, MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18 e MVAB18 e das células BS-C-40 infectadas com os vírus WR e WR $\Delta$ B18. As membranas foram marcadas com o anticorpo Anti-B18, Anti- $\beta$ -actina e Anti-B5. 1: extrato proteico de CEF não infectadas; 2: extrato proteico de CEF infectadas com o vírus MVA; 3: extrato proteico de CEF infectadas com o vírus MVAB18rev; 4: extrato proteico de CEF infectadas com o vírus MVA $\Delta$ B18; 5: extrato proteico de CEF infectadas com o vírus MVAB18; 6: extrato proteico de células BS-C-40 não infectadas; 7: extrato proteico de células BS-C-40 infectadas com o vírus WR; 8: extrato proteico de células BS-C-40 infectadas com o vírus WR $\Delta$ B18.

#### 14. Ensaio de placa dos vírus MVA, MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18, MVAB18, WR e WR $\Delta$ B18

Depois de verificar a construção dos vírus recombinantes resolvemos investigar se esses vírus apresentariam alguma alteração no fenótipo de placas. Para isso fizemos o ensaio de placas dos quatro vírus recombinantes gerados mais as duas amostras selvagens. Duas linhagens celulares permissivas ao MVA (CEF e BHK-21) e ao WR (BS-C-40 e BHK-21) foram cultivadas em placas de seis poços e infectadas com diluições seriadas dos vírus MVA, MVA $\Delta$ B18, MVAB18rev, MVAB18, WR e WR $\Delta$ B18. As células foram marcadas com anticorpos anti-VACV e as placas virais foram observadas.

Os vírus MVA, MVAB18rev e MVAB18 apresentaram placas de tamanhos similares em CEF. Já o vírus MVA $\Delta$ B18 formou placas visivelmente menores quando comparadas as placas dos

outros três vírus. Em BHK-21 os quatro vírus apresentaram placas de tamanhos similares e todos eles apresentaram um fenótipo de placa bem menor em BHK-21 do que em CEF. Já os vírus WR e WR $\Delta$ B18 não apresentaram diferenças no perfil das placas em ambas as células analisadas. Além disso, apresentaram um fenótipo de placa bem menor em BHK-21 do que em BS-C-40 (**FIGURA 35**).



**FIGURA 35 – Ensaio de placa dos vírus MVA, MVA $\Delta$ B18, MVAB18rev, MVAB18, WR e WR $\Delta$ B18.** Monocamadas de CEF, BHK-21 e BS-C-40, em placas de seis poços, foram infectadas com diluições seriadas dos vírus indicados. Após a infecção as monocamadas foram cobertas com 0,5% de CMC e incubadas por 72 horas. Em seguida foi feita a imunomarcagem para a visualização das placas.

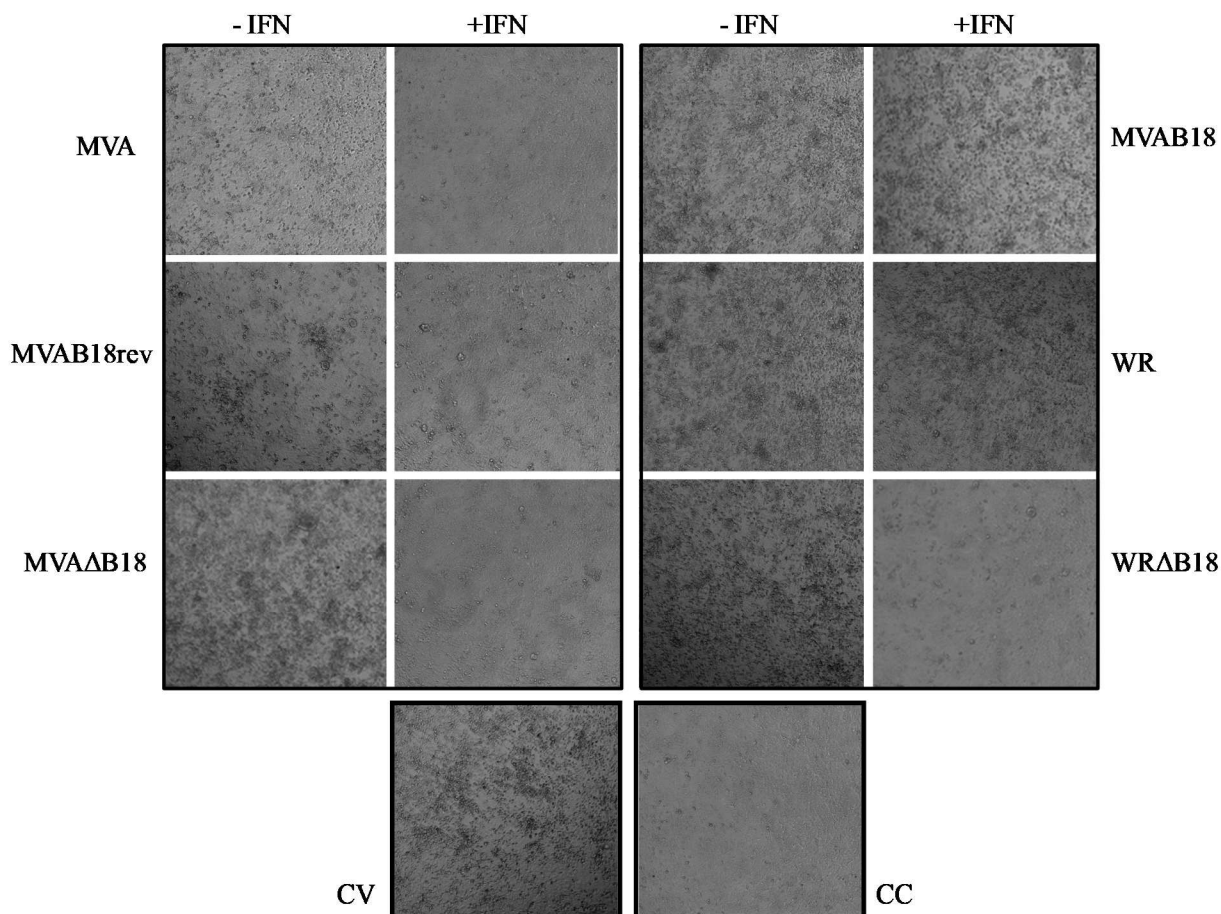
## 15. Verificação da funcionalidade do receptor B18

Depois de verificar uma redução no tamanho das placas formadas pelo vírus MVA $\Delta$ B18 em CEF, resolvemos investigar se os receptores expressos eram funcionais. Para isso infectamos monocamadas de células VERO com os vírus MVA, MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18, MVAB18, WR e WR $\Delta$ B18 em uma M.O.I de 10. Após 16 horas de incubação os sobrenadantes foram coletados e incubados com IFN- $\alpha$  em diferentes concentrações. Essa mistura de sobrenadante mais IFN foi utilizada para tratar novas monocamadas de células VERO. Após 18 horas essas células tratadas foram infectadas com o vírus EMC.

Quando o receptor está presente e funcional ele se liga ao IFN que não é capaz de desencadear o estado antiviral nas células, com isso a infecção ocorre normalmente. Já na ausência do receptor ou quando ele não está funcional o IFN permanece livre e capaz de desencadear o estado antiviral nas células, desta forma o vírus EMC não consegue infectar a monocamada.

Na **FIGURA 36** podemos notar que os receptores expressos pelos vírus MVAB18 e WR foram capazes de inativar o IFN- $\alpha$ . Entretanto, as proteínas truncadas dos vírus MVA e MVAB18rev não são funcionais, ou seja, não se ligam eficientemente ao IFN- $\alpha$ .

Como esperado os vírus MVA $\Delta$ B18 e WR $\Delta$ B18 não foram capazes de inativar o IFN- $\alpha$ . A quantidade de vírus utilizada neste ensaio não foi suficiente para destruir a monocamada, portanto a coloração das placas não ficou nítida. Este ensaio será repetido com uma dose maior do vírus EMC para que possamos visualizar o ECP por meio da coloração com cristal violeta.



**FIGURA 36 – Ensaio funcional do receptor B18.** Células VERO foram infectadas com os vírus MVA, MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18, MVAB18, WR e WR $\Delta$ B18 em uma M.O.I de 10. Após 16 horas os sobrenadantes foram coletados e expostos à 15 minutos na luz ultravioleta. Esses sobrenadantes foram incubados por 90 minutos a 37°C com diferentes concentrações de IFN- $\alpha$ , mas somente a menor concentração está representada na figura (10U). Após incubação esses sobrenadantes foram adicionados à monocamadas de células VERO implantadas em placas de 96 poços. Dezesesseis horas depois as células foram infectadas com o vírus EMC. As imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência EVOS FL Cell Imaging System. -IFN: indica que as células foram tratadas com os sobrenadantes na ausência do IFN- $\alpha$ ; +IFN: indica que as células foram tratadas com os sobrenadantes na presença de 10U do IFN- $\alpha$ ; CC: controle de células, CV: controle de vírus.

## 16. Curvas de ciclo único dos vírus MVA, MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18, MVAB18, WR e WR $\Delta$ B18

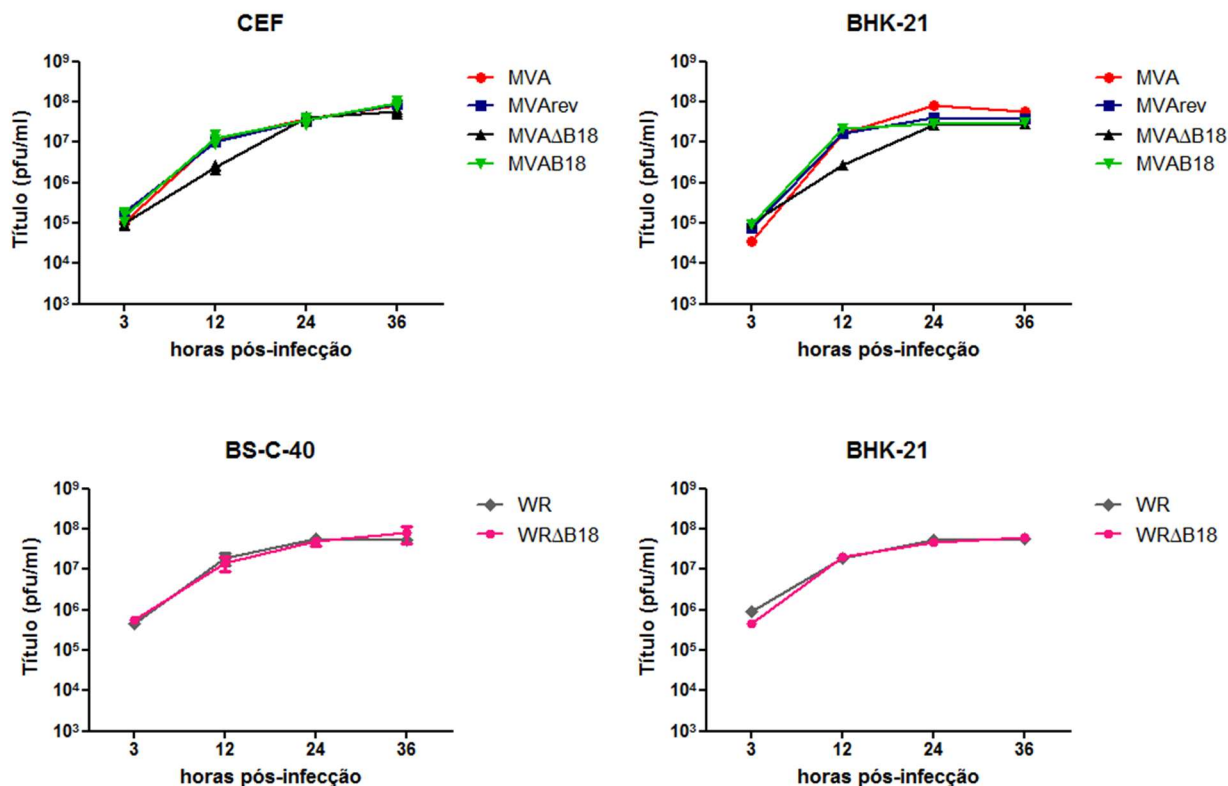
Uma vez que a formação de placas depende da disseminação viral de célula a célula, assim como a replicação, nós resolvemos avaliar as curvas de ciclo único dos vírus MVA, MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18, MVAB18, WR e WR $\Delta$ B18.

Duas linhagens celulares (CEF e BHK-21), implantadas em placas de 12 poços, foram infectadas com os vírus MVA, MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18 e MVAB18 em uma M.O.I de 5. Já os vírus WR e WR $\Delta$ B18 foram utilizados para infectar as células BS-C-40 e BHK-21 na mesma M.O.I. Nos tempos determinados (3, 12, 24 e 36 horas) as monocamadas celulares foram raspadas e tituladas em CEF para os MVA e em BS-C-40 para os WR.

O MVA e os MVA recombinantes apresentaram rendimentos similares em todas as curvas de ciclo único das duas linhagens celulares analisadas (CEF e BHK-21). O mesmo aconteceu com os vírus WR e WR $\Delta$ B18. O rendimento dos dois vírus foi semelhante nas duas linhagens celulares (BHK-21 e BS-C-40) [FIGURA 37].

Apesar do tamanho das placas formadas pelo vírus MVA $\Delta$ B18 ser menor do que o das placas do vírus controle, não foi observada uma alteração do rendimento viral obtido por esse vírus nas duas linhagens celulares infectadas com uma M.O.I alta.





**FIGURA 37 –** Curvas de ciclo único dos vírus MVA, MVAB18rev, MVAΔB18, MVAB18, WR e WRΔB18. Monocamadas de CEF, BHK-21 e BS-C-40, em placas de 12 poços, foram infectadas com os vírus indicados em uma M.O.I de 5. As monocamadas foram coletadas 3, 12, 24 e 36 horas pós-infecção. Os títulos virais foram determinados por ensaios de placas em CEF, para os vírus MVA, e em BS-C-40, para os WR.

## 17. Infecção experimental em camundongos BALB/c e avaliação da resposta imune

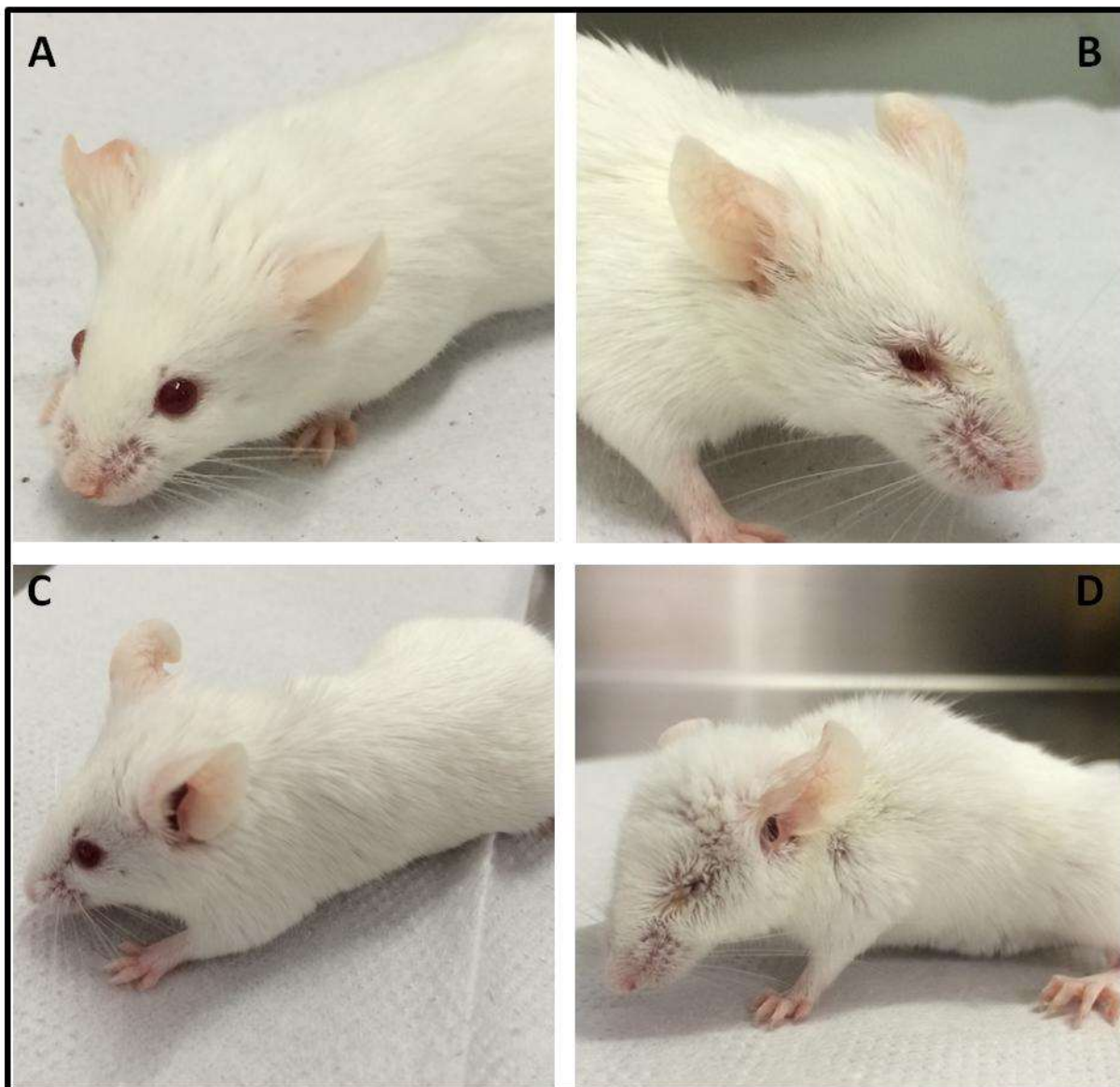
Após realizar os estudos “in vitro” utilizamos camundongos machos BALB/c para avaliar a infecção assim como a resposta imune desencadeada pelos diferentes vírus recombinantes – MVAB18rev, MVAΔB18, MVAB18 e WRΔB18.

Devido ao fato da amostra MVAB18rev ter apresentado o mesmo perfil da amostra MVA nos ensaios “in vitro”, decidimos utilizar apenas o MVAB18rev como controle nos experimentos realizados com camundongos.

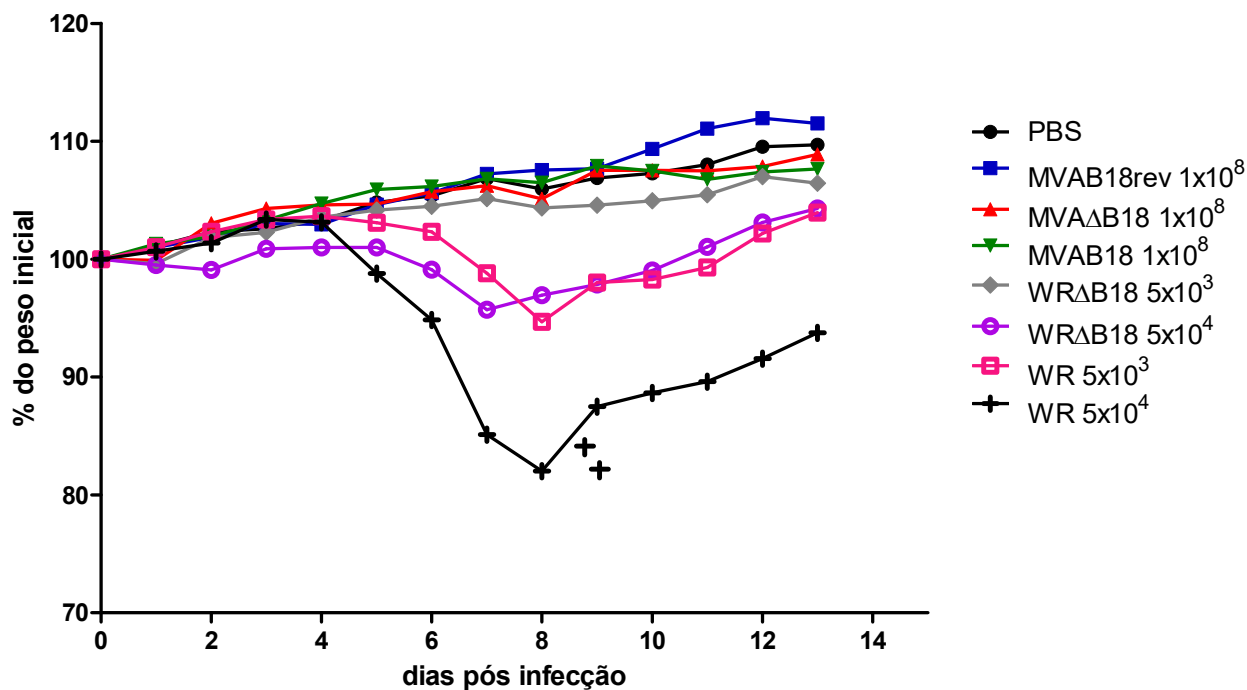
### 17.1 Sinais clínicos apresentados pelos camundongos após infecção intranasal

Os camundongos foram submetidos à infecção pela via i.n. com as amostras MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18, MVAB18, WR e WR $\Delta$ B18 na tentativa de mimetizar a infecção natural causada pelos VACV (Ferreira, J. M., J. S. Abrahao, et al., 2008; Moss, B., 2011).

Nenhum dos animais infectados com os vírus MVA recombinantes ( $10^8$  PFU) apresentou quaisquer sinais clínicos e as variações de peso foram semelhantes aos animais do grupo controle (PBS). Os animais infectados com os vírus WR $\Delta$ B18 na dose de  $5 \times 10^3$  PFU também não apresentaram sinais clínicos, nem perderam peso (**FIGURAS 38A e 39**). Já os animais infectados com o vírus WR na dose de  $5 \times 10^3$  PFU perderam peso a partir do sexto dia p.i. e no nono dia já começaram a recuperá-lo. Esses animais apresentaram sinais clínicos brandos – pouca secreção nos olhos, leve arqueamento de dorso e pouca piloereção. Os animais infectados com o vírus WR $\Delta$ B18 na dose de  $5 \times 10^4$  PFU apresentaram um único sinal clínico aparente – perda de peso nos dias 6 e 7 p.i.. Por fim, os animais que receberam  $5 \times 10^4$  PFU de WR apresentaram os sinais clássicos da infecção por esse vírus. Todos os animais tiveram perda de peso, piloereção, arqueamento de dorso e edema na face com secreções nos olhos, com início no sexto dia p.i. e 30% dos animais morreram no nono dia p.i. (**FIGURAS 38B, C e D e 39**).



**FIGURA 38 – Sinais clínicos dos animais infectados com os vírus WR e WRΔB18 no oitavo dia p.i.** Os camundongos foram inoculados com 10μL da solução viral pela via i.n. Os animais infectados com os vírus MVAB18rev, MVAΔB18 e MVAB18 não apresentaram nenhum sinal clínico aparente, se assemelhando aos animais infectados com a menor dose do vírus WRΔB18, por isso não foram apresentados na figura. Os animais infectados com a dose de  $5 \times 10^3$  (A) e  $5 \times 10^4$  (C) PFU do vírus WRΔB18 não apresentaram sinais clínicos. Já os animais infectados com a dose  $5 \times 10^3$  (B) do vírus WR apresentaram pouca secreção nos olhos, leve arqueamento de dorso e pouca piloereção. Por fim os animais infectados com a dose  $5 \times 10^4$  (D) do vírus WR tiveram perda de peso, piloereção, arqueamento de dorso e edema na face com secreções nos olhos.

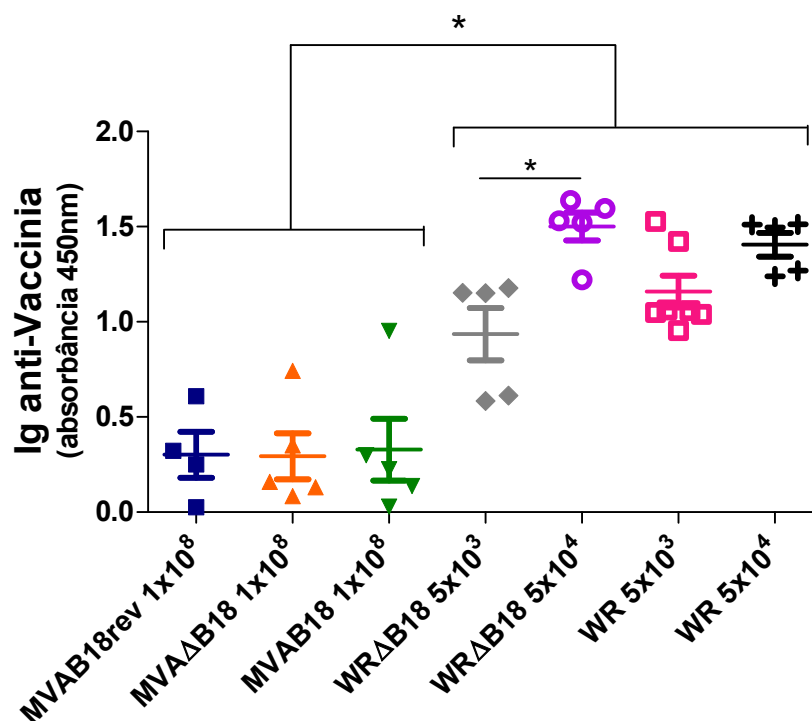


**FIGURA 39** – Variação de peso dos animais infectados pela via intranasal com os vírus MVAB18rev, MVAΔB18, MVAB18, WR e WRΔB18. Os camundongos foram infectados pela via intranasal com os vírus MVAB18rev, MVAΔB18, MVAB18, WR e WRΔB18 nas doses indicadas na legenda do gráfico. O grupo controle recebeu apenas PBS. Os animais foram pesados durante 13 dias e os valores indicados no gráfico correspondem à média diária da porcentagem do peso inicial (n=5 a7). + significa que algum animal morreu ou foi sacrificado devido à perda de 30% do peso inicial.

## 17.2 Detecção de anticorpos séricos específicos

Para verificar a produção de anticorpos anti-vaccinia pelos animais inoculados, amostras de soro foram coletadas no décimo quarto dia de infecção e submetidas ao ensaio de ELISA indireto. Todos os grupos de camundongos infectados foram positivos para a produção de anticorpos específicos para antígenos do vírus, comparando com os valores de absorbância obtidos para o grupo controle (PBS). Os animais infectados com as amostras replicativas (WR e WRΔB18), em ambas as doses, apresentaram uma produção significativamente maior de anticorpos comparado aos animais infectados com os diferentes MVA recombinantes. Além disso, o aumento de 1 log na dose da infecção do vírus WRΔB18 aumentou significativamente a produção de anticorpos específico pelos animais infectados quando comparados aos animais que receberam a dose de

$5 \times 10^3$ . Não houve diferença estatística na produção de anticorpos entre os animais infectados com os vírus MVA recombinantes nem entre os animais infectados com o vírus WR expressando ou não a proteína B18 (FIGURA 40).



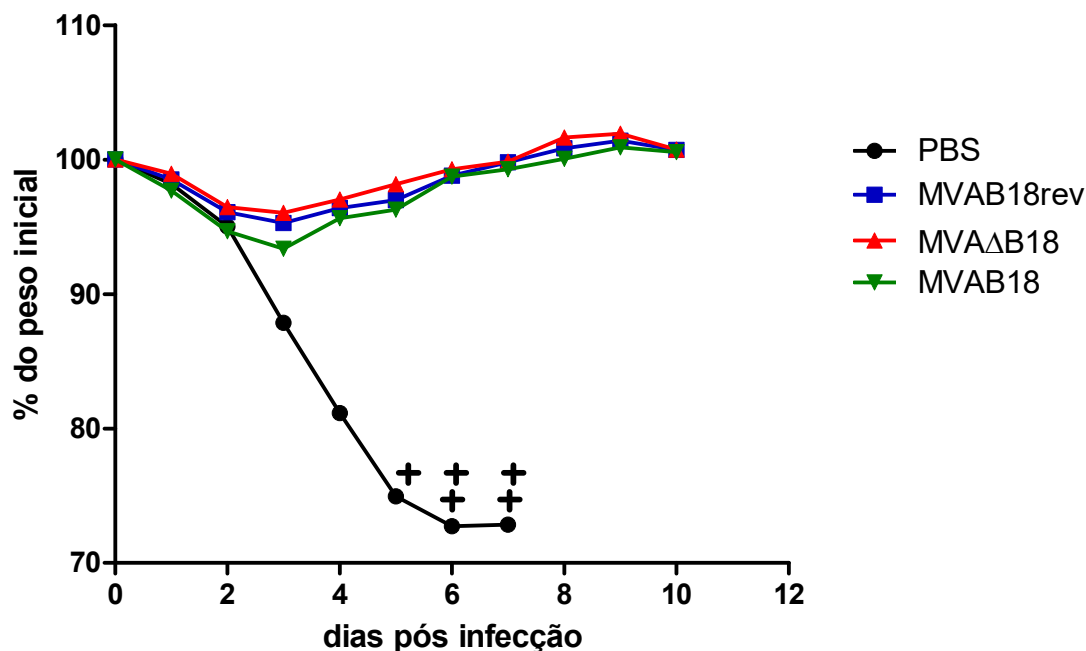
**FIGURA 40** – Avaliação da produção de anticorpos totais anti-vaccinia. Anticorpos totais anti-vaccinia foram dosados por ELISA indireto a partir do soro dos camundongos inoculados com MVAB18rev, MVAΔB18, MVAB18, WR e WRΔB18. As barras representam a média ± erro padrão dos valores de absorbância obtidos para cada camundongo do grupo (n=5 a7). \* indica diferença estatística ( $P < 0.05$ ) entre os grupos.

### 17.3 Avaliação da proteção induzida pelas amostras MVAB18rev, MVAΔB18 e MVAB18

Para avaliar a indução de proteção, animais BALB/c inoculados com os vírus MVAB18rev, MVAΔB18 e MVAB18 foram desafiados com a amostra WR 21 dias após a imunização. Em seguida, foram monitorados diariamente durante 10 dias para determinação da mortalidade e dos níveis de proteção.

Os animais imunizados com os três vírus perderam peso de maneira similar nos primeiros dias após o desafio. A partir do quinto dia pós-desafio todos os animais começaram a recuperar o peso e sobreviveram à infecção pelo vírus WR. Nenhum outro sinal clínico foi notado nestes

animais durante o período de monitoramento. Diferentemente, os camundongos do grupo controle não imunizado perderam peso a partir do primeiro dia pós-desafio e até o sétimo dia todos já haviam morrido (**FIGURA 41**).



**FIGURA 41 – Avaliação da proteção.** Camundongos BALB/c machos, entre 6 e 8 semanas, foram infectados pela via i.d. com  $10^8$  PFU dos vírus MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18 e MVAB18. O grupo controle recebeu apenas PBS. Vinte e um dias após a infecção os animais foram desafiados com  $10^6$  PFU do vírus WR pela via i.n. Os animais foram pesados durante 10 dias e os valores indicados no gráfico correspondem à média diária da porcentagem do peso inicial (n=5). + significa que algum animal morreu ou foi sacrificado devido à perda de mais de 30% do peso inicial.

#### 17.4 Subpopulações celulares

A **TABELA XII** apresenta os resultados da análise das subpopulações celulares no baço dos camundongos BALB/c infectados com as diferentes amostras virais. Não houve diferença significativa na frequência de células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e linfócitos B entre os grupos.

TABELA XII

Frequência das populações celulares no baço dos animais infectados e no grupo controle

Subpopulações celulares			
Grupos	Linfócitos T CD4 <sup>+</sup>	Linfócitos T CD8 <sup>+</sup>	Linfócitos B CD19 <sup>+</sup>
PBS	23,8 ± 0,4	13,7 ± 0,5	56,2 ± 0,8
MVAB18rev	23,5 ± 1,5	13,6 ± 0,5	57,1 ± 1,9
MVAΔB18	25,8 ± 0,8	14,5 ± 0,4	53,2 ± 1,0
MVAB18	22,7 ± 0,6	12,5 ± 0,3	58,8 ± 0,9
WRΔB18	24,8 ± 0,8	14,1 ± 0,4	55,1 ± 1,1
WR	23,8 ± 0,8	12,3 ± 0,8	58,8 ± 1,5

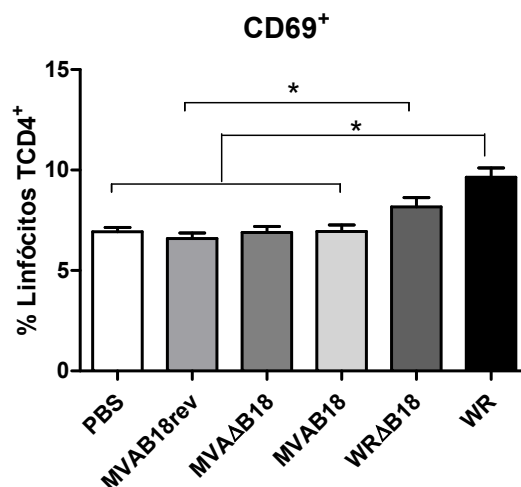
Os dados representam a média ± o erro padrão das porcentagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e células B dentro da população de linfócitos analisados por citometria de fluxo.

### 17.5 Perfil de ativação celular

#### Linfócitos T

Foram avaliadas as moléculas CD69, um marcador de ativação recente, CD62L, L-selectina presente em linfócitos virgens e ausente em células ativadas, CD44, glicoproteína altamente expressa nas células ativadas e nas células de memória e o fator de transcrição Foxp3.

Os animais infectados com o vírus WR apresentaram maior frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup> expressando CD69 quando comparados aos animais do grupo controle e aos animais que foram inoculados com os diferentes MVA recombinantes. Já os camundongos infectados com o vírus WRΔB18 tiveram maior frequência dessa população de linfócitos ativados apenas em relação ao grupo MVAB18rev (**FIGURA 42**).



**FIGURA 42** – Frequência de células T CD4<sup>+</sup> expressando a molécula CD69 no baço dos camundongos. Esplenócitos dos camundongos sacrificados com quatorze dias de infecção foram incubados com anticorpos ligados à fluorocromos para detecção da expressão de CD4 e CD69 na superfície celular através de citometria de fluxo. As barras representam a média ± erro padrão da frequência de cada tipo celular em relação ao número total de linfócitos CD4<sup>+</sup>. Asteriscos indicam diferenças estatísticas ( $P < 0.05$ ) entre os grupos ( $n = 5$ ).

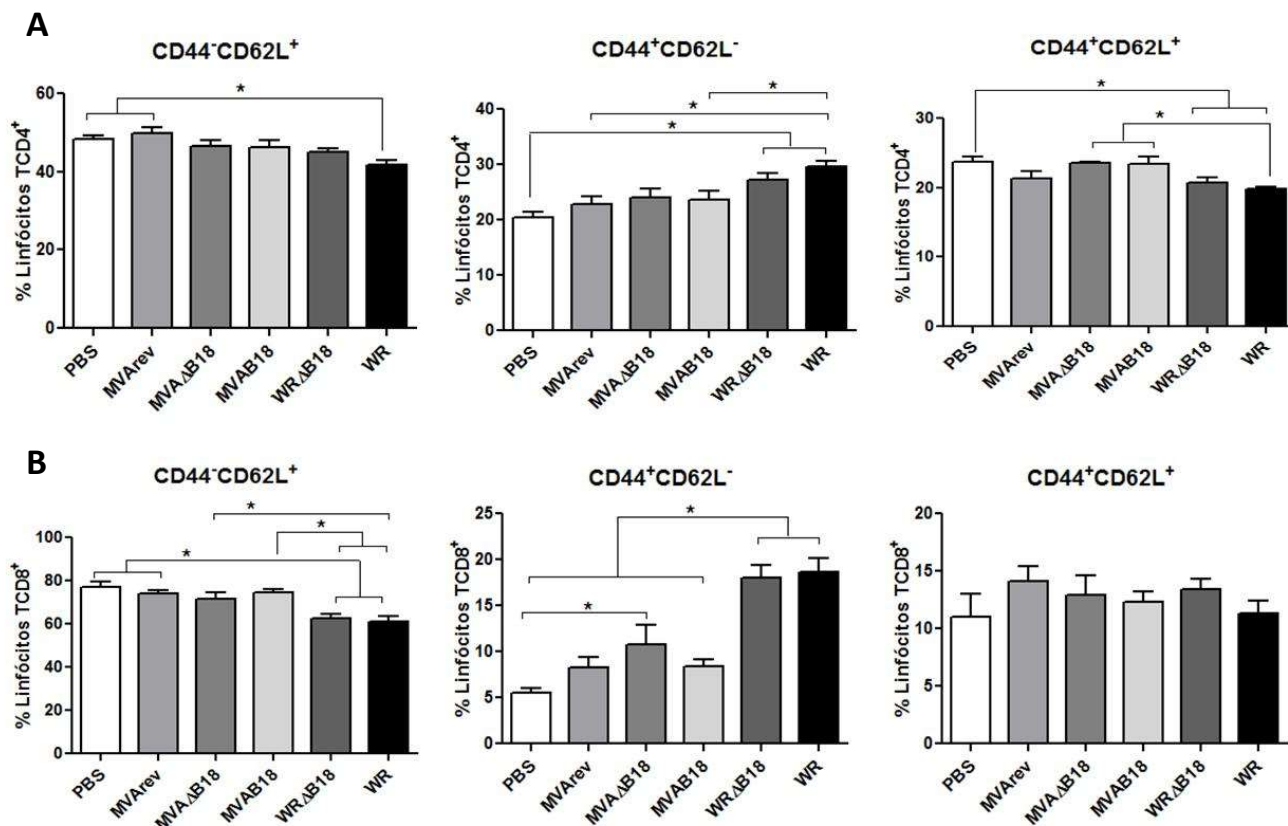
Em relação aos linfócitos T *naive* (CD44<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>), vimos que os animais infectados com o vírus WR apresentaram frequência menor que animais do grupo controle PBS e do grupo MVAB18rev (**FIGURA 43A**). A frequência dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> *naive* foi menor nos animais infectados com os vírus WR e WRΔB18 do que nos camundongos dos grupos controle PBS, MVAB18rev e MVAB18. Além disso, a frequência das células T CD8<sup>+</sup> *naive* dos animais infectados com o vírus WR é menor do que a dos animais que receberam o vírus MVAΔB18 (**FIGURA 43B**).

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> efetores (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) representam uma porcentagem de células maior nos animais infectados com os vírus WR quando comparados aos grupos controle PBS e MVAB18 e essas células também aparecem em uma frequência maior nos animais inoculados com o vírus WRΔB18 quando comparados aos animais do grupo controle PBS (**FIGURA 43A**). A frequência dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> efetores é maior nos animais infectados com os vírus WR e WRΔB18 quando comparados aos animais dos demais grupos (**FIGURA 43B**).

As células T CD4<sup>+</sup> de memória central (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) apareceram em menor frequência nos animais infectados com o vírus WR quando comparados aos grupos controle, MVAΔB18 e MVAB18. Os animais infectados com o vírus WRΔB18 também apresentaram uma redução dessas células quando comparados ao grupo controle PBS (**FIGURA 43A**). Já as células T CD8<sup>+</sup> de



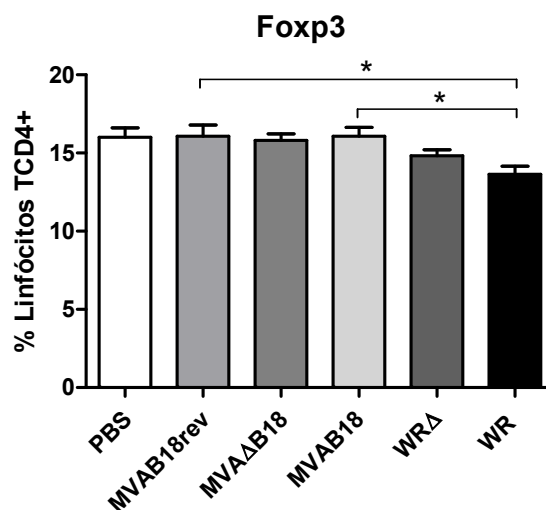
memória central não apresentaram diferença significativa na sua frequência entre os grupos avaliados (FIGURA 43B).



**FIGURA 43 – Frequência de linfócitos T *naive*, efetores e de memória central no baço dos camundongos.**

Esplenócitos dos camundongos sacrificados com quatorze dias de infecção foram incubados com anticorpos ligados à fluorocromos para detecção da expressão de CD4, CD8, CD44 e CD62L na superfície celular através de citometria de fluxo. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da frequência de cada tipo celular em relação total de CD4<sup>+</sup> (A) ou CD8<sup>+</sup> (B). Asteriscos indicam diferenças estatísticas ( $P < 0.05$ ) entre os grupos ( $n = 5$ ).

Por fim avaliamos as células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) e notamos uma redução na frequência dessas células nos camundongos infectados com o vírus WR quando comparados aos animais dos grupos MVAB18rev e MVAB18 (FIGURA 44).

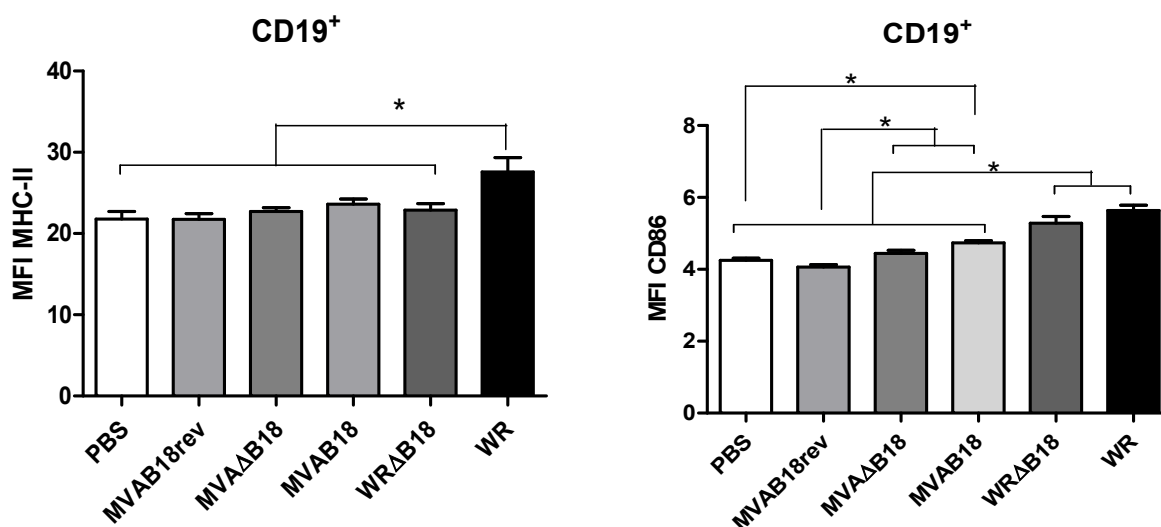


**FIGURA 44 – Frequência de células T reguladoras no baço dos camundongos.** Esplenócitos dos camundongos sacrificados com quatorze dias de infecção foram incubados com anticorpos ligados à fluorocromos para detecção da expressão de CD4 na superfície celular e Foxp3 intranuclear através de citometria de fluxo. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da frequência de cada tipo celular em relação ao número total de linfócitos CD4<sup>+</sup>. Asteriscos indicam diferenças estatísticas ( $P < 0.05$ ) entre os grupos ( $n = 5$ ).

### **Linfócitos B**

O nível de expressão de MHC-II foi avaliada nas células B dos camundongos infectados e se mostrou aumentado no grupo infectado por WR comparado aos demais grupos analisados (**FIGURA 45**).

Ao avaliar a expressão média da molécula co-estimuladora CD86 nos linfócitos B observamos um aumento significativo nas células dos camundongos infectados com os vírus WR e WRΔB18 quando comparados aos animais dos demais grupos. Os animais infectados com o vírus MVAB18rev apresentaram uma menor expressão de CD86 quando comparados aos animais infectados com os vírus MVAΔB18 e MVAB18, que por sua vez apresentaram um aumento na expressão dessa molécula quando comparado ao grupo controle PBS (**FIGURA 45**).



**FIGURA 45 – Expressão das moléculas MHC-II e CD86 nas células B dos camundongos.** Esplenócitos dos camundongos sacrificados com quatorze dias de infecção foram incubados com anticorpos ligados à fluorocromos para detecção da expressão de CD19, MHC-II e CD86 na superfície celular através de citometria de fluxo. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da intensidade média de fluorescência das moléculas MHC-II e CD86 nos linfócitos CD19<sup>+</sup>. Asteriscos indicam diferenças estatísticas ( $P < 0.05$ ) entre os grupos ( $n = 5$ ).

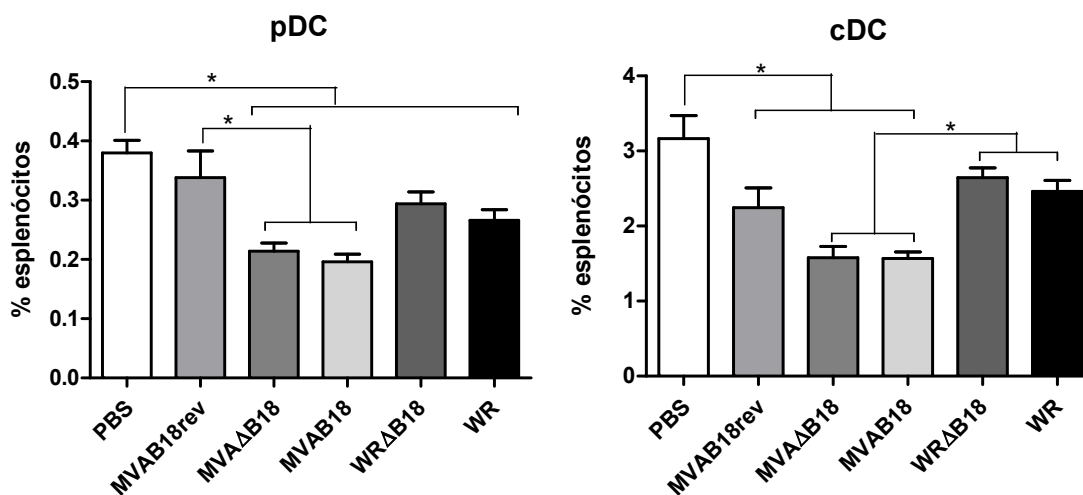
### Células Dendríticas

Inicialmente analisamos a frequência de células dendríticas totais e dos subtipos presentes no baço vinte e quatro horas após a inoculação das diferentes amostras virais. Em seguida, avaliamos a ativação dessas células a partir do nível de moléculas de MHC e co-estimuladoras. Dentro da população de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>/MHC-II<sup>+</sup>) avaliamos as dendríticas plasmocitóides (B220<sup>+</sup>) e convencionais (mieloide CD11b<sup>+</sup> e linfoide CD8α<sup>+</sup>), conforme exemplificado na figura 19.

Com exceção dos camundongos infectados com o vírus MVAB18rev, todos os outros grupos infectados apresentaram uma diminuição na frequência das células dendríticas plasmocitóides (pDC) quando comparados ao grupo controle. Além disso, os animais do grupo MVAB18rev apresentaram uma frequência maior de pDC do que os animais infectados com os vírus MVAΔB18 e MVAB18 (**FIGURA 46**).

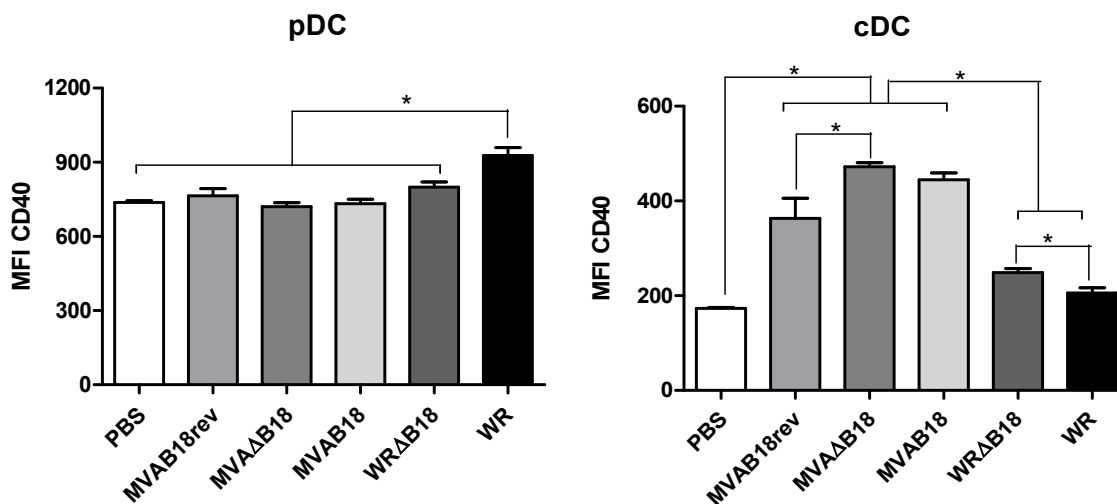
Com relação às células dendríticas convencionais (cDC) os grupos infectados com os três diferentes vírus MVA recombinantes apresentaram uma frequência menor dessas células quando comparados ao grupo controle PBS. Por sua vez, os animais infectados com os vírus WR e

WR $\Delta$ B18 apresentaram uma frequência maior de cDC do que os animais dos grupos MVA $\Delta$ B18 e MVAB18 (FIGURA 46).



**FIGURA 46 – Frequência das células dendríticas plasmocitóides e convencionais dos camundongos.** Esplenócitos dos camundongos sacrificados 24 horas após a infecção foram incubados com anticorpos ligados à fluorocromos para detecção da expressão de CD11c, MHC-II, B220, CD11b e CD8 $\alpha$  na superfície celular através de citometria de fluxo. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da frequência de células em relação ao total de esplenócitos. Asteriscos indicam diferença estatística ( $P < 0.05$ ) entre os grupos ( $n = 5$ ).

A expressão da molécula CD40 nas pDC foi maior nos animais infectados com o vírus WR quando comparado aos demais grupos. Nas cDC esse perfil se inverte. A expressão de CD40 é significativamente maior nos animais infectados com os três MVA recombinantes. Além disso, a expressão dessa molécula é maior nos animais infectados com o vírus MVA $\Delta$ B18 do que nos animais do grupo MVAB18rev. Assim como é maior nos animais infectados com o vírus WR $\Delta$ B18 do que nos animais do grupo WR (FIGURA 47).

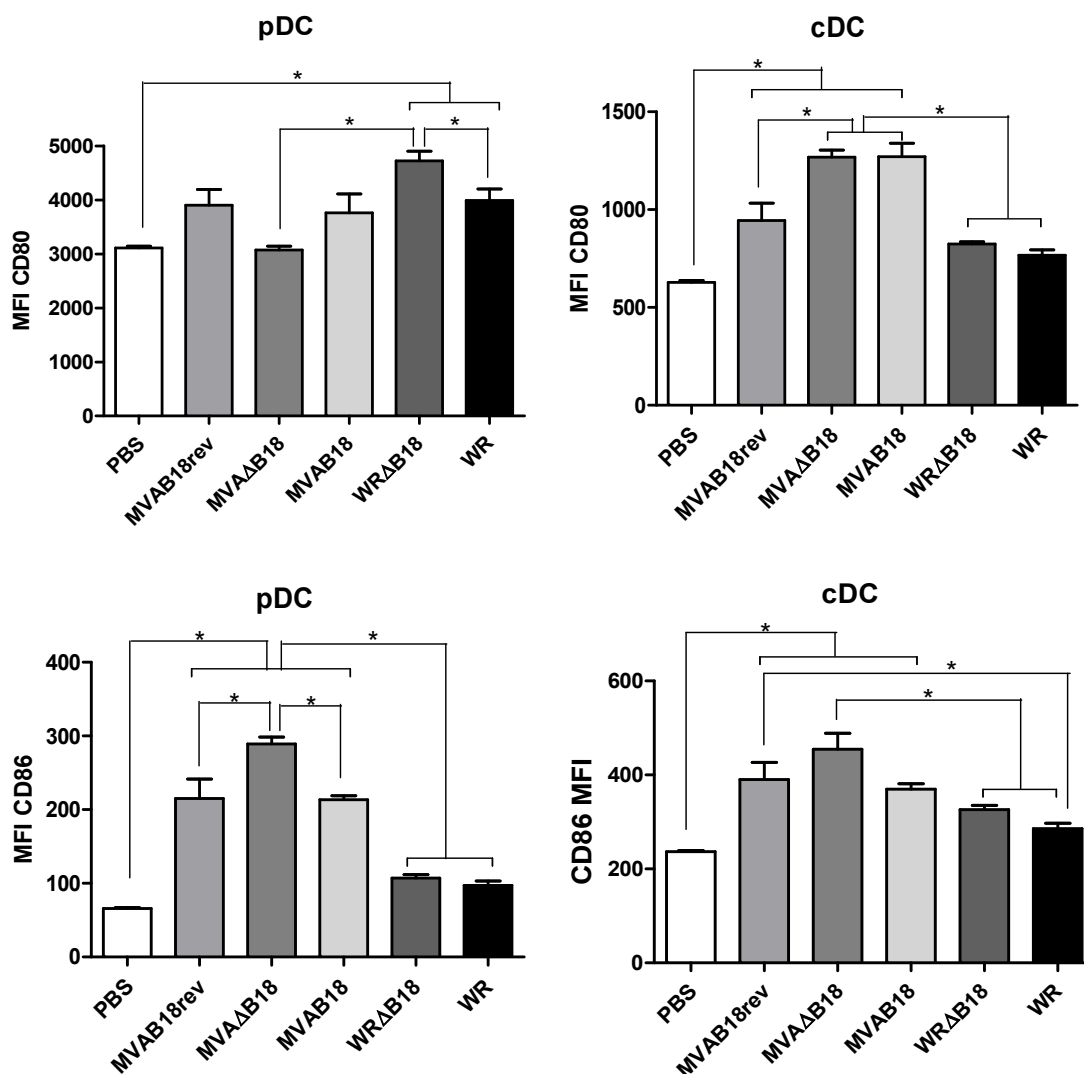


**FIGURA 47 – Expressão da molécula CD40 nas células dendríticas plasmocitóides e convencionais dos camundongos.** Esplenócitos dos camundongos sacrificados 24 horas após a infecção foram incubados com anticorpos ligados à fluorocromos para detecção da expressão de CD11c, MHC-II, B220, CD11b, CD8α e CD40 na superfície celular através de citometria de fluxo. As barras representam a média ± erro padrão da intensidade média de fluorescência da molécula CD40 nas células dendríticas. Asteriscos indicam diferença estatística ( $P < 0.05$ ) entre os grupos ( $n = 5$ ).

A expressão de CD80 foi significativamente maior nas pDC dos animais infectados com os vírus WR e WRΔB18 em relação ao grupo controle PBS. Além disso, a expressão dessa molécula foi maior nos camundongos infectados com o vírus WRΔB18 quando comparados aos grupos WR e MVAΔB18. Dentro das cDC o cenário se inverte novamente. A expressão de CD80 é significativamente maior nas cDC dos animais infectados com os três vírus MVA recombinantes em relação ao grupo controle. Além disso, os animais infectados com os vírus MVAΔB18 e MVAB18 apresentaram uma expressão maior desta molécula do que os animais infectados com os vírus MVAB18rev, WR e WRΔB18 (**FIGURA 48**).

Com relação à molécula CD86, a sua expressão dentro das pDC foi maior nos animais dos três grupos que receberam os vírus MVA recombinantes quando comparados aos demais. Vimos também que a expressão desta molécula foi maior nas pDC dos animais infectados com o vírus MVAΔB18 do que nos animais infectados com os vírus MVAB18rev e MVAB18. Dentro da população de cDC a expressão de CD86 foi maior nos animais infectados com os três vírus MVA recombinantes quando comparados ao grupo controle PBS. Além disso, a expressão desta molécula foi significativamente maior nos animais infectados com o vírus MVAΔB18 com relação aos

animais do grupo WR e WR $\Delta$ B18. E também foi significativamente maior nas cDC dos animais infectados com o vírus MVAB18rev, porém só em relação ao grupo WR (FIGURA 48).

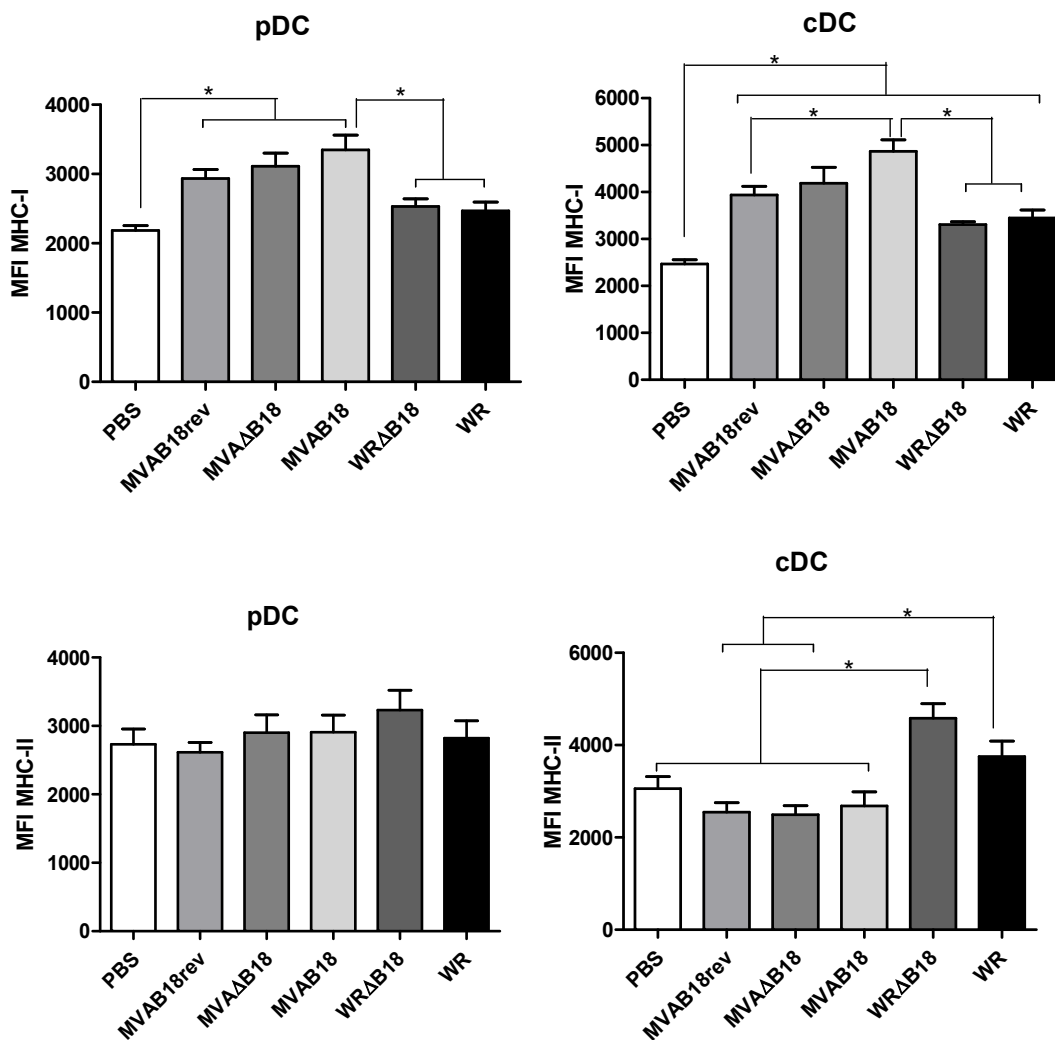


**FIGURA 48 – Expressão das moléculas CD80 e CD86 nas células dendríticas plasmocitóides e convencionais dos camundongos.** Esplenócitos dos camundongos sacrificados 24 horas após a infecção foram incubados com anticorpos ligados à fluorocromos para detecção da expressão de CD11c, MHC-II, B220, CD11b, CD8 $\alpha$ , CD80 e CD86 na superfície celular através de citometria de fluxo. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da intensidade média de fluorescência das moléculas CD80 e CD86 nas células dendríticas. Asteriscos indicam diferença estatística ( $P < 0.05$ ) entre os grupos ( $n = 5$ ).

Por fim analisamos o perfil da expressão das moléculas MHC de classes I e II nas duas subpopulações de células dendríticas. A frequência de MHC-I nas pDC dos animais infectados com os três vírus MVA recombinantes é maior do que nas células dos animais do grupo controle PBS.

E somente as células dos animais infectados com o vírus MVAB18 tiveram um aumento significativo na expressão dessa molécula quando comparadas às células dos animais infectados com os vírus WR e WR $\Delta$ B18. Já nas células dendríticas convencionais todos os animais infectados tiveram um aumento da expressão do MHC-II com relação ao grupo controle PBS. Além disso, os animais infectados com o vírus MVAB18 tiveram um aumento significativo na expressão dessa molécula quando comparados aos grupos MVAB18rev, WR e WR $\Delta$ B18 (**FIGURA 49**).

Não houve diferença significativa entre todos os grupos avaliados na expressão de MHC-II nas pDC. Já nas cDC a expressão desta molécula foi maior nos animais do grupo WR $\Delta$ B18 quando comparado aos animais dos grupos controle, MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18 e MVAB18. Além disso, os animais infectados com o vírus WR tiveram um aumento da expressão de MHC-II nas cDC com relação aos animais infectados com os vírus MVAB18rev e MVA $\Delta$ B18 (**FIGURA 49**).



**FIGURA 49 – Expressão de MHC-I e MHC-II nas células dendríticas plasmocitóides e convencionais dos camundongos.** Esplenócitos dos camundongos sacrificados 24 horas após a infecção foram incubados com anticorpos ligados à fluorocromos para detecção da expressão de CD11c, MHC-II, B220, CD11b, CD8 $\alpha$  e MHC-I na superfície celular através de citometria de fluxo. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da intensidade média de fluorescência das moléculas MHC-I e MHC-II nas células dendríticas. Asteriscos indicam diferença estatística ( $P < 0.05$ ) entre os grupos ( $n = 5$ ).



## **Discussão**

---

O OPXV *Vaccinia Ankara* modificado (MVA) foi altamente atenuado através de inúmeras passagens em culturas de fibroblastos de embrião de galinha. Essa atenuação ocasionou a perda de genes relacionados à capacidade de imunomodulação e espectro de hospedeiros e tornou o MVA incapaz de se multiplicar produtivamente na maioria das linhagens celulares de mamíferos. Devido a essas características o MVA é considerado um vetor vacinal seguro e vem sendo utilizado em nosso laboratório na tentativa de produzir novas vacinas (*Drexler, I, C. Staib, et al., 2004; Rocha, C. D., B. C. Caetano, et al., 2004; Mcfadden, G., 2005*).

Os OPXV possuem diversos genes que codificam proteínas envolvidas na evasão imune. Essas proteínas possuem como alvos muitos mediadores da imunidade inata incluindo os IFN, TNF, interleucinas, sistema do complemento e quimiocinas. Além disso, esses vírus são capazes de produzir proteínas que interferem em diferentes vias de sinalização celular (*Moss, B. e J. L. Shisler, 2001; Johnston, J. B. e G. Mcfadden, 2003; Liu, L., Z. Xu, et al., 2005*).

O MVA, apesar de ter perdido diversos genes durante o processo de atenuação, conservou no seu genoma alguns genes de imunomodulação e outros relacionados com a tentativa de escape do reconhecimento pelo hospedeiro. Portanto, esse vírus é uma ótima ferramenta para o estudo da função específica de alguns genes. Amostras como o WR, por exemplo, possuem muitos genes capazes de interferir na resposta do hospedeiro dificultando o estudo de um gene isolado.

Além disso, o MVA é bastante utilizado como vetor viral na tentativa de se obter novas vacinas. O melhoramento da eficiência desse vetor é muito importante para as linhas de pesquisa desenvolvidas atualmente no nosso laboratório. Inserções ou deleções de genes chaves podem melhorar o efeito adjuvante causado pelo vetor viral aumentando assim a resposta específica contra o antígeno carregado.

Dentro desse contexto resolvemos estudar, primeiramente, os genes D9R e D10R. Esses genes codificam proteínas (D9 e D10) 25% idênticas entre si e que são altamente conservadas nos poxvírus. As proteínas D9 e D10 clivam o cap 5' dos mRNA expondo estes mRNA à ação das exonucleases (*Parrish, S. e B. Moss., 2006*).

Parrish e colaboradores foram os primeiros a conseguir gerar, em 2006, um vírus WR recombinante que não expressasse a proteína D10. Eles substituíram toda a ORF do gene D10R pela ORF do gene EGFP. Um estudo anterior já havia demonstrado que uma superexpressão da proteína D10 diminui os níveis de mRNA que possuem o cap 5' e dos seus produtos traducionais. Esse fenômeno também pode ser observado quando há uma superexpressão de D9, porém em uma

menor intensidade. Utilizando o mutante WR $\Delta$ D10 em ensaios “in vitro”, Parrish e colaboradores descobriram que a ausência dessa proteína causa um atraso no início da transcrição dos genes virais, além de aumentar a durabilidade dos mRNA virais e celulares e atrasar a interrupção da síntese de proteínas celulares nas células infectadas (Shors, T., J. G. Keck, *et al.*, 1999; Parrish, S. e B. Moss., 2006).

Diante das funções até então conhecidas dos genes D9R e D10R, resolvemos inativá-los no vírus MVA a fim de aumentar a sua imunogenicidade e testá-lo como vetor vacinal. Sem essas enzimas a transição entre os estágios precoce e tardio da replicação viral é mais lenta, a síntese proteica celular é mantida por mais tempo e, portanto a produção de proteínas envolvidas na resposta antiviral também pode aumentar. As mutações inseridas nos sítios catalíticos das duas enzimas já haviam sido testadas por Parrish e colaboradores em 2007. Eles demonstraram que o motivo “mut T”, altamente conservado, compreende 23 aminoácidos e que ao trocar dois ácidos glutâmicos por duas glutaminas as enzimas se tornavam inativas, ou seja, não eram mais capazes de remover o cap 5’ dos mRNA (Parrish, S. e B. Moss., 2007; Parrish, S., W. Resch, *et al.*, 2007).

Assim, três vírus recombinantes foram gerados com as modificações desejadas (**FIGURAS 9, 10 e 11**). O primeiro vírus (MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10) teve as ORF D9R e D10R substituídas pela ORF do gene EGFP. Este vírus foi gerado apenas para funcionar como ferramenta para a construção dos outros dois vírus. Já foi demonstrado na literatura que o vírus WR $\Delta$ D10 (que possui a ORF EGFP no lugar da D10R) apresenta um fenótipo de placa menor do que o vírus WRD10mu (que contém as duas modificações no sítio catalítico da enzima). Acredita-se que a substituição completa da ORF D10R tenha prejudicado a transcrição dos genes vizinhos ou que a proteína D10 exerça várias funções (Senkevich, T. G., L. S. Wyatt, *et al.*, 2008; Liu, S. W., L. S. Wyatt, *et al.*, 2014). Por isso, optamos em fazer as análises apenas com os outros dois vírus (MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu).

O MVAD9D10rev teve a OFR do gene EGFP substituída pelas ORF originais dos genes D9 e D10. Esse vírus foi construído para ser utilizado como controle garantindo que o fenótipo observado do vírus MVAD9muD10mu não resultou de uma mutação espontânea, não detectada, em outra parte do genoma.

A geração de vírus MVA recombinantes ocorre naturalmente e em taxas relativamente altas (~0,1%) [Moss, B., 1996; Mastrangelo, M. J., L. C. Eisenlohr *et al.*, 2000]. Assim, os vírus MVA recombinantes foram facilmente gerados e selecionados com o auxílio da expressão do gene EGFP

ou com o auxílio de anticorpos anti-vaccinia. Clones de tamanho gradualmente maior, ou seja, com um maior número de células infectadas, foram obtidos com a sucessão das rodadas de seleção, mostrando que o processo de seleção foi eficiente em isolar os vírus MVA recombinantes dos parentais (**FIGURA 21**). Além disso, durante o processo de amplificação, monocamadas de células apresentaram-se totalmente infectadas pelos vírus MVA recombinantes, com exceção do vírus MVA $\Delta$ D9 $\Delta$ D10, que após sofrer as deleções apresentou títulos muito baixos, mesmo em CEF.

O sequenciamento desses vírus mostrou que as sequências de interesse estavam em condições apropriadas para expressão, apresentando-se em janela de leitura, com códons de iniciação e terminação nas posições adequadas, bem como apresentando as modificações desejadas (**ANEXOS**).

O fenótipo de placas dos vírus MVA, MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu nas células BHK-21 e CEF está demonstrado na **FIGURA 23**. As placas formadas pelo vírus duplo mutante foram menores em CEF do que as dos vírus controles e foram quase imperceptíveis em BHK-21. Analisamos também a replicação do vírus mutante em quatro linhagens celulares e vimos que em uma M.O.I alta (5) a diferença no rendimento do vírus MVAD9muD10mu é em média meio log inferior aos rendimentos dos vírus controles. Quando diminuimos a M.O.I (0,5) essa diferença tende a aumentar, passando para 1 log (**FIGURA 24**). Liu inseriu as mesmas modificações utilizadas neste trabalho nas proteínas D9 e D10 do vírus WR. Esse vírus apresentou um defeito grave na replicação em BS-C-1 e em HeLa. A diferença do rendimento do vírus mutante foi de 3 logs a menos do que o vírus controle nessas duas linhagens celulares (Liu, S. W., G. C. Katsafanas, et al., 2015). No vírus MVA construído neste trabalho a mutação das duas enzimas não acarretou um defeito tão grave na replicação deste vírus nas quatro linhagens analisadas.

Analisamos também um possível defeito no ciclo de multiplicação do vírus MVA duplo mutante através da técnica de microscopia eletrônica. Verificamos que com 20 horas de infecção tanto o vírus MVAD9D10rev quanto o MVAD9muD10mu foram capazes de formar partículas IV e IMV nas duas linhagens celulares utilizadas (BS-C-1 e CEF) (**FIGURA 26**). Entretanto, observamos que o vírus MVAD9D10rev foi capaz de formar um número maior de partículas IMV na célula BS-C-1 do que o vírus MVAD9muD10mu, vinte horas pós infecção. Esses resultados podem indicar que a mutação de alguma forma prejudica a montagem de partículas maduras ou que o ciclo do vírus MVAD9muD10mu é mais lento que o do vírus controle na células BS-C-1.

Entretanto, seria necessário avaliar o ciclo de multiplicação após 20 horas de infecção para avaliarmos as duas possibilidades.

A **FIGURA 25** demonstra que células HeLa, BS-C-1 e CEF infectadas pelo vírus duplo mutante apresentaram um atraso na expressão de algumas proteínas virais. Esse resultado está de acordo com o estudo feito por Parrish em 2006 no qual os vírus deficientes em D9 ou D10 apresentaram um atraso na transcrição de alguns genes (*Parrish, S. e B. Moss.,2006*). Entretanto, nos tempos analisados, não vimos esse mesmo perfil nos extratos das células BHK-21. Nessa linhagem celular duas proteínas virais apresentaram uma expressão maior após infecção pelo vírus MVAD9muD10mu. Isso pode ter sido causado tanto pelo aumento real na produção dessas proteínas ou pela persistência dos mRNA virais nas células infectadas pelo MVAD9muD10mu, conforme demonstrado por Parrish e colaboradores (*Parrish, S. e B. Moss.,2006*). No trabalho de Liu, o vírus WRD9muD10mu apresentou uma redução da síntese das proteínas pós-replicativas (intermediárias e tardias) nas células BS-C-1 e HeLa (*Liu, S. W., G. C. Katsafanas, et al.,2015*). No presente estudo não foi observado o mesmo perfil para o vírus MVA duplo mutante. Entretanto, para uma análise mais completa seria necessário submeter os extratos celulares à técnica de eletroforese em campo pulsado com marcação por radioisótopos. Dessa maneira conseguiríamos complementar a análise das proteínas virais e ainda analisar as proteínas da célula hospedeira.

Curiosamente em todos os extratos celulares visualizamos uma expressão maior das proteínas virais precoces nas células infectadas com o vírus MVAD9muD10mu. Esse padrão não foi obtido no trabalho de Liu com o vírus WR duplo mutante. Os dados obtidos com o contador de vírus da ViroCyt mostram que o número de partículas por PFU (partícula/pfu) calculado para o vírus MVAD9muD10mu foi cem vezes maior que para o vírus MVAD9D10rev. Portanto, podemos especular que as proteínas precoces que aparecem no blot são proteínas estruturais ou até mesmo outras proteínas encapsidadas com a partícula que já estavam presentes no inóculo. Para tirar essa dúvida seria interessante submeter ao ensaio de *western blot* somente os vírus purificados na mesma quantidade que utilizamos para infectar as células. Em 2006, Parrish também observou essa diferença no número de partículas por PFU entre o vírus mutante e o selvagem, mas nesse caso somente o gene D10R havia sido removido do vírus WR. A razão do número de partículas por PFU do vírus mutante foi 10 vezes maior do que a do vírus selvagem (*Parrish, S. e B. Moss.,2006*). Não sabemos ao certo o que poderia aumentar a produção de partículas não infecciosa nos vírus mutantes. O mau funcionamento do *turnover* dos mRNA (devido à inativação das proteínas D9 e

D10) ou o aumento da resposta antiviral do hospedeiro poderiam contribuir para defeitos sutis na montagem de novas partículas virais.

Através da microscopia confocal constatamos que as células (CEF e BS-C-1) infectadas com o vírus MVAD9muD10mu apresentavam um maior acúmulo de RNA de dupla fita (dsRNA) do que as células infectadas com o vírus controle (MVAD9D10rev) [FIGURA 28]. Através da técnica “tilling” observamos que o acúmulo de dsRNA foi maior nas células BS-C-1 infectadas com o vírus duplo mutante do que nas células CEF (FIGURA 29). Entretanto nem todas as células infectadas produziram dsRNA no tempo analisado (20h p.i.). No trabalho de Liu foi demonstrado que o vírus WRD9muD10mu apresenta uma grande redução da expressão de proteínas virais intermediária/tardias em BS-C-1, e nós não verificamos isso com o vírus MVA duplo mutante. Porém Liu mostrou que todas as células BS-C-1 infectadas com o vírus WRD9muD10mu apresentaram acúmulo de dsRNA (Liu, S. W., G. C. Katsafanas, et al., 2015). Neste trabalho vimos que apesar de todas as células estarem infectadas menos da metade produziu dsRNA. Portanto, é possível que a expressão proteica das outras células (que não estavam acumulando dsRNA) possam ter mascarado o perfil daquelas que estavam acumulando e por isso não conseguimos visualizar a redução das proteínas intermediárias e tardias, observada por Liu.

O dsRNA é sem dúvida o principal PAMP viral devido a sua produção por quase todos os vírus em algum estágio do ciclo replicativo. A produção do dsRNA induz a fosforilação da PKR que por sua vez fosforila o fator inicial da tradução eIF2 $\alpha$ , bloqueando a síntese proteica (DeWitte-Orr, S.T., K. L., Mossman, 2010). Para verificar a ativação dessa via nas células BC-S-1 infectadas pelo vírus MVAD9muD10mu submetemos os extratos celulares ao ensaio de *western blot* (FIGURA 27). Após oito horas de infecção foi possível verificar uma forte fosforilação da PKR. A fosforilação do fator eIF2 $\alpha$  foi bem discreta após 8 horas e se tornou mais visível após dezesseis horas de infecção. Liu demonstrou que após sete horas de infecção o vírus WRD9muD10mu já induzia uma forte fosforilação da PKR e do fator eIF2 $\alpha$  e a partir de 10 horas o IRF3 também já estava fosforilado (Liu, S. W., G. C. Katsafanas, et al., 2015). A PKR fosforilada também induz a ativação do IRF-3 que induz a expressão de IFN tipo I. Entretanto, não detectamos fosforilação de IRF3 nas células infectadas pelo vírus MVAD9muD10mu durante o período de 24 horas. Esses resultados confirmam o acúmulo de dsRNA detectado na microscopia confocal e mostra que esse PAMP está ativando a resposta antiviral celular.

Em resumo, visualizamos um grande acúmulo de dsRNA nas células infectadas com o vírus MVAD9muD10mu. Uma vez que somente os sítios catalíticos das enzimas D9 e D10 foram inativados, podemos concluir que além de participarem da remoção do cap 5' dos mRNA essas enzimas, de alguma forma, previnem a formação do dsRNA ou aceleram a sua degradação. Os mesmos resultados foram obtidos por Liu ao inativar as duas enzimas do vírus WR (*Liu, S. W., G. C. Katsafanas, et al., 2015*).

As enzimas D9 e D10 removem o cap 5' dos mRNA virais e celulares deixando-os susceptíveis à degradação pela exonuclease celular Xrn1. Quando os VACV infectam células depletadas para Xrn1 ocorre um aumento no acúmulo de dsRNA e a replicação do vírus é prejudicada. Portanto, de alguma forma D9 e D10 atuam de maneira coordenada com a enzima celular mediando a degradação do mRNA e evitando o acúmulo do dsRNA. Além disso, esse acúmulo ativa a resposta imune inata responsiva a este PAMP resultando na inativação do fator de tradução eIF2 $\alpha$  e na clivagem do rRNA mediada pela enzima RNase-L (*Burgess, H. M. e I. Mohr., 2015*).

Até então já sabíamos que os poxvírus codificam algumas proteínas precoces que tentam evitar o reconhecimento do dsRNA e a resposta antiviral desencadeada por ele. A principal delas é a proteína E3 que se liga ao dsRNA sequestrando-o e inibindo a ativação de PKR e da RNase-L (*Chang, H. W., J. C. Watson, et al., 1992; Rivas, C., J. Gil, et al., 1998*). Outra proteína é a K3 que inibe que a PKR fosforile o eIF2 $\alpha$  (*Davies, M. V., O. Elroy-Stein, et al., 1992; Carroll, K., O. Elroy-Stein, et al., 1993*). Mais recentemente foi descoberta a proteína K1 que reduz os níveis de dsRNA nos tempos iniciais da infecção (*Willis, K. L., J. O. Langland, et al., 2011*). É claro que ainda temos muito que entender sobre como as proteínas D9 e D10 previnem o acúmulo do dsRNA. Neste contexto, várias perguntas em relação ao mecanismo de ação destas proteínas são pertinentes. Elas previniriam a formação do dsRNA? Ou causariam a sua degradação? Por que o acúmulo do dsRNA é maior em algumas linhagens celulares? Não obstante, nossos resultados, avaliados em conjunto com os outros previamente obtidos (*Liu, S. W., G. C. Katsafanas, et al., 2015*), sugerem que mais um mecanismo de evasão da resposta imune está sendo descoberto nos OPXV.

Uma vez que o vírus MVA duplo mutante gerado neste trabalho pode ser mais imunogênico que a amostra original, seria interessante avaliar a resposta imune desencadeada e possivelmente inserir um gene exógeno para avaliá-lo como vetor viral.

O outro gene estudado neste trabalho foi o B18R. Esse gene codifica o receptor solúvel para IFN tipo I, uma glicoproteína de 60 a 65 KDa pertencente à super família das imunoglobulinas. Para estudar os efeitos da inserção ou da remoção deste gene construímos quatro vírus. O primeiro vírus a ser construído foi o vírus MVA $\Delta$ B18, onde a ORF truncada do gene homólogo ao B18R foi trocada pela ORF do gene EGFP. Este vírus foi construído por dois motivos: primeiramente para analisar se a proteína truncada conservou alguma função de receptor solúvel para IFN tipo I, e em segundo lugar, para inserir o gene B18R completo e funcional do vírus WR na amostra MVA, sendo, para tanto, necessário remover integralmente o gene truncado homólogo.

A partir do vírus MVA $\Delta$ B18 dois outros vírus foram construídos – MVAB18 e MVAB18rev. Neste último a sequência original da ORF homóloga à B18R do vírus MVA foi reinserida no lugar da ORF EGFP. Este vírus foi utilizado como controle para garantir que os fenótipos dos vírus MVA $\Delta$ B18 e MVAB18 não tenham sido causados por alguma mutação espontânea em outras partes do genoma. Já na construção do vírus MVAB18 a ORF B18R do vírus WR foi inserida no lugar da ORF EGFP. Além disso, também construímos um vírus WR no qual a ORF B18R foi substituída pelas sequências dos genes NEO e GUS oriundas do plasmídeo pZIPPY. Este vírus foi construído para ser utilizado como um controle em todos os ensaios uma vez que já existem na literatura alguns dados sobre os efeitos da remoção do gene B18R no vírus WR.

Os vírus MVA recombinantes foram prontamente gerados e selecionados com o auxílio da expressão do gene EGFP ou com o auxílio de anticorpos anti-vaccinia (**FIGURA 32**) como já foi detalhado anteriormente para os vírus construídos no estudo das proteínas D9 e D10. A seleção do vírus WR $\Delta$ B18 foi um pouco diferente uma vez que utilizamos o substrato X-Gluc e o antibiótico geneticina para selecionar os clones recombinantes. O sequenciamento de todos os vírus mostrou que as sequências de interesse estavam corretas (**ANEXOS**).

Para verificar a construção dos vírus, células BS-C-40 e CEF, foram infectadas com os vírus selvagens e recombinantes e os extratos celulares foram submetidos à técnica de *western blot* (**FIGURA 34**). A proteína B18 não foi detectada nas células infectadas com os vírus MVA $\Delta$ B18 ou WR $\Delta$ B18 indicando que o gene B18R realmente foi removido dos genomas virais. A detecção da proteína viral B5 mostra que essas células foram efetivamente infectadas. As células infectadas com os vírus MVAB18 ou WR expressaram uma proteína de 60 a 65 KDa conforme descrito na literatura, indicando que o gene B18R do vírus WR foi inserido corretamente na amostra MVA



(Symons, J. A., A. Alcami, et al., 1995; Alcami, A., J. A. Symons, et al., 2000). Por fim, as células infectadas com os vírus MVA e MVAB18rev apresentaram uma proteína com peso molecular de ~35 KDa, confirmando que o vírus MVAB18rev foi construído corretamente. A deleção de 20 nucleotídeos no gene homólogo ao B18R gerou uma proteína truncada com a metade do peso molecular da proteína do vírus WR.

A primeira avaliação fenotípica que fizemos foi comparar o tamanho das placas formadas pelos vírus selvagens e recombinantes em duas linhagens celulares diferentes. Na célula BHK-21 os vírus MVA, MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18 e MVAB18 apresentaram um fenótipo de placas semelhante. Entretanto, o vírus MVA $\Delta$ B18 formou placas visivelmente menores que os outros vírus em CEF. Como já é sabido que BHK-21 não produz IFN tipo I (Kong, W. P., G. D. Ghadge, et al., 1994) e que CEF é capaz de produzir essa citocina (Heller, E. D., A. M. Levy, et al., 1997) supomos que a proteína B18, mesmo truncada, estaria se ligando ao IFN. Sem a proteína B18, o IFN produzido pelas células estaria conseguindo limitar a disseminação do vírus. Entretanto, o fenótipo de placas dos vírus WR e WR $\Delta$ B18 foi semelhante nos dois tipos celulares avaliados – BHK-21 e BS-C-40 (**FIGURA 35**). Como a linhagem celular BS-C é capaz de produzir IFN (Desmyter, J., J. L. Melnick, et al., 1968) a justificativa dada acima não se aplicaria neste caso. Alcami e colaboradores mostraram que o WR sem o gene B18R possui o mesmo fenótipo de placa da amostra selvagem na célula BS-C-1, mas quando a cultura celular é tratada com IFN- $\alpha$  logo após a infecção viral as placas formadas pelo vírus mutante são bem menores do que as do vírus selvagem (Alcami, A., J. A. Symons, et al., 2000). É possível especular que, no caso do vírus WR, a sabida existência de outros mecanismos de evasão viral à imunidade inata, muitos dos quais estão suposta ou efetivamente ausentes da amostra MVA, podem comprometer a produção ou ação do IFN.

Resolvemos testar então a funcionalidade dos receptores expressos pelos vírus. Nesse ensaio quando o receptor está funcional ele se liga ao IFN- $\alpha$  inativando-o. Dessa maneira o IFN não é capaz de desencadear o estado antiviral nas células da cultura e o vírus EMC consegue infectá-las. Como podemos ver na **FIGURA 36** somente os receptores produzidos pelos vírus MVAB18 e WR são funcionais. Esse ensaio foi primeiramente realizado por Symons e colaboradores, em 1995. Eles conseguiram comprovar através deste ensaio a funcionalidade do receptor produzido pelo vírus WR (Symons, J. A., A. Alcami, et al., 1995). Os vírus MVA e MVAB18rev codificam uma proteína B18 truncada que não é capaz de inativar o IFN. Waibler e

colaboradores, em 2008, mostraram que ao contrário do vírus WR o MVA induz uma resposta causada pelo IFN nas células dendríticas. Além disso, eles conseguiram demonstrar que alguns vírus coletados durante as passagens do processo de atenuação do MVA eram capazes de inibir a resposta desencadeada pelo IFN. Portanto, os autores argumentam que o receptor solúvel B18 do vírus MVA perdeu a sua funcionalidade entre as passagens 152 e 386 (*Waibler, Z., M. Anzaghe, et al., 2009*). O fato da proteína B18 não ser funcional no vírus MVA também está de acordo com a descoberta de Alcami e colaboradores. Eles afirmaram que a proteína B18 do MVA é truncada na extremidade C-terminal. Esta porção é justamente a responsável pela interação com o IFN tipo I (*Alcami, A., J. A. Symons, et al., 2000*).

O resultado obtido no ensaio de IFN nos permitiu concluir que a suposição sobre a funcionalidade da proteína B18 truncada do MVA não procedia. Se o receptor B18 do MVA não é funcional não faz sentido o vírus MVA $\Delta$ B18 apresentar um fenótipo de placa menor somente pela perda do receptor. Ao investigarmos a literatura vimos que Senkevich e colaboradores mostraram que o gene EGFP, sob o controle do promotor p11, no lugar da ORF G6R afetou o crescimento do vírus VACV em CEF (*Senkevich, T. G., L. S. Wyatt, et al., 2008*). Portanto, é possível que o EGFP também tenha prejudicado a disseminação do vírus MVA $\Delta$ B18 em CEF. Por outro lado, uma especulação provocativa teria a ver com a possibilidade de a proteína truncada reter alguma outra função que não aquela descrita anteriormente para a proteína B18 íntegra. Assim, a perda desta suposta função seria responsável pelo efeito fenotípico da redução do tamanho da placa viral.

Os últimos experimentos “in vitro” realizados com esses vírus foram as curvas de ciclo único. Para isso infectamos as linhagens celulares CEF e BHK-21 com os vírus MVA, MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18 e MVAB18 e as linhagens celulares BS-C-40 e BHK-21 com os vírus WR e WR $\Delta$ B18. Não vimos diferença nos rendimentos virais em nenhuma das curvas geradas. Entretanto, talvez a infecção de células CEF (produtoras de IFN) com os vírus MVA selvagem e recombinantes, em uma M.O.I. baixa, possa revelar uma vantagem de disseminação do vírus MVAB18 em relação aos demais. Já foi descrito na literatura que o vírus MVA sem o gene E3L não consegue se multiplicar em CEF. Nas células infectadas com esse vírus mutante os níveis de IFN produzidos foram muito maiores do que nas células infectadas com o vírus MVA. A infecção pelo vírus MVA em CEF estimula a produção de IFN por essas células e na ausência da proteína E3 aquela citocina consegue inibir a replicação viral (*Hornemann, S., O. Harlin, et al., 2003*). Por

isso, acreditamos que se o MVA possuir mais uma forma de evitar a resposta antiviral desencadeada pelo IFN o rendimento desse vírus será ainda maior em CEF.

Em seguida, realizamos alguns experimentos “in vivo” para avaliar a diferença de virulência entre as amostras virais e das respostas imunes desencadeadas por elas. Para os ensaios em camundongos utilizamos o vírus MVAB18rev como controle visto que o mesmo foi construído a partir do mesmo clone que os outros vírus e portanto é um controle ainda melhor que a amostra MVA.

Para os experimentos onde avaliamos os sinais clínicos e os níveis de anticorpos específicos gerados pela infecção com as amostras virais, os camundongos BALB/c machos foram inoculados pela via intranasal com  $10^8$  PFU das amostras MVA e com  $5 \times 10^3$  PFU das amostras WR. Escolhemos a dose mais alta que seria possível para a inoculação dos MVA recombinantes de acordo com os títulos dos nossos vírus purificados, uma vez que esses vírus não se multiplicam produtivamente nas células dos camundongos doses altas são frequentemente utilizadas na literatura. A dose de  $10^8$  PFU, por exemplo, é frequentemente escolhida para ensaios de imunização utilizando vírus MVA, recombinantes ou não (Cottingham, M. G. e M. W. Carroll.,2013). O cálculo da dose dos vírus WR e WRΔB18 foi feito com base no trabalho de Ferreira e colaboradores, o qual mostrou que a LD50 do vírus WR é igual a  $10^4$  PFU (Ferreira, J. M., B. P. Drumond, et al.,2008). Com base nesse valor escolhemos trabalhar com meio log abaixo da LD50. Entretanto, nenhum animal morreu e todos tiveram apenas sinais leves de infecção. Por isso, resolvemos infectar outros dois grupos de camundongos com a dose de  $5 \times 10^4$  dos vírus WR ou WRΔB18. Provavelmente essa diferença na LD50 tenha ocorrido pela diferença da linhagem celular utilizada na titulação. Ferreira e colaboradores titularam o vírus WR na célula VERO, nós titulamos em BS-C-40. Além disso, eles infectaram camundongos com apenas quatro semanas, nós utilizamos os camundongos entre 6 a 8 semanas.

A infecção intranasal com a amostra WR resulta em infecção aguda do pulmão, onde ocorre a replicação inicial do vírus, seguida por disseminação para diversos órgãos, incluindo cérebro, baço e fígado (Turner, G. S., 1967; Smee, D. F., K. W. Bailey, et al., 2001; Reading, P. C. e G. L. Smith, 2003). O MVA, devido à sua incapacidade de se replicar eficientemente na maioria das células de mamíferos, não consegue se multiplicar no pulmão quando inoculado pela via intranasal e seu título detectável decai rapidamente. Mesmo quando inoculado em altas doses, o MVA não se dissemina para outros tecidos do hospedeiro (Abdalahman, I., I. Gurt, et al., 2006). Tais

características dos vírus utilizados no presente trabalho podem explicar a mortalidade e os sinais clínicos observados nos animais do grupo WR e não nos demais camundongos (**FIGURAS 38 e 39**).

Nenhum dos animais infectados com os vírus MVA recombinantes ( $10^8$  PFU) apresentou quaisquer sinais clínicos e as variações de peso foram semelhantes aos animais do grupo controle (PBS). Como já era esperado, a inserção do gene B18R não causou nenhum efeito na virulência da amostra MVA. Uma vez que essa amostra não se replica nas células do camundongo a inserção de um único gene de evasão da resposta imune não foi capaz de tornar a amostra MVA mais virulenta para os camundongos BALB/c. Já os animais infectados com o vírus WR $\Delta$ B18 só começaram a apresentar sinais clínicos quando infectados com  $5 \times 10^4$  PFU. Nesta dose os animais apenas perderam cerca de 5% do seu peso original nos dias 6 e 7 p.i.. Esses resultados estão de acordo com o trabalho publicado por Symons e colaboradores, em 1995. Eles também removeram o gene B18R do vírus WR e viram que os animais infectados com  $10^4$  PFU do vírus recombinante perdiam 5% do peso inicial entre os dias 6 e 8 p.i.. Já os animais infectados com  $10^5$  PFU perdiam pouco mais de 20% do peso inicial entre os dias 8 e 10 p.i. e somente na dose de  $10^6$  PFU o vírus era letal para os camundongos (*Symons, J. A., A. Alcami, et al., 1995*). Por fim verificamos que os animais infectados com  $5 \times 10^3$  PFU do vírus WR apresentaram sinais brandos da infecção e perderam 5% do peso inicial entre os dias 6 e 9 p.i.. Na dose mais alta os animais apresentaram os sinais clássicos da infecção i.n. pelo vírus WR (perda de peso, piloereção, arqueamento de dorso e edema na face com secreções nos olhos) e 30% dos animais morreram ou tiveram que ser eutanasiados em razão da perda de peso máxima permitida pelo protocolo de ética em pesquisa com animais (CEUA-UFMG). Estes dados indicam que a LD50 da amostra WR utilizada neste trabalho é superior a  $5 \times 10^4$ .

O gene B18R exerce um papel importante na virulência da amostra replicativa. Sem produzir o receptor solúvel o vírus perde uma de suas estratégias para evitar a resposta antiviral desencadeada pelo IFN tipo I. Com isso, a disseminação viral para os outros órgão é prejudicada (*Symons, J. A., A. Alcami, et al., 1995*). Além disso, espera-se que a presença do gene funcional também seja capaz de modular aspectos e características imunológicas do hospedeiro que sofrem ação positiva ou negativa dos IFN.

As informações relativas à resposta imune dos hospedeiros humanos ou animais à infecção por OPXV emergentes são relativamente escassas, especialmente se compararmos ao volume de

conhecimento imunológico à cerca da infecção por outros vírus clinicamente relevantes. A maioria dos dados é proveniente de infecções experimentais em animais, utilizando-se o protótipo dos poxvírus, ou de imunizações eventuais em seres humanos, utilizando-se amostras vacinais disponíveis em países que ainda mantêm a vacinação contra varíola em grupos populacionais específicos, tais como militares ou grupos de voluntários (*Silva Gomes, J. A., F. F. De Araujo, et al., 2012*). Esses estudos revelam que tanto a resposta imune humoral como a celular, possuem funções essenciais na geração de proteção contra infecções por OPXV. Entretanto já se sabe que o perfil da resposta imune contra esses vírus varia muito de acordo com a via de inoculação, com o hospedeiro e com a espécie viral (*Xu, R., A. J. Johnson, et al., 2004; Putz, M. M., C. M. Midgley, et al., 2006*).

A infecção por OPXV induz uma forte resposta humoral contra múltiplos componentes estruturais da partícula viral (*Fang, M. e L. J. Sigal., 2005; Putz, M. M., C. M. Midgley, et al., 2006*). Consistente com essa informação, os soros dos animais infectados com os vírus MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18, MVAB18, WR e WR $\Delta$ B18 apresentaram anticorpos capazes de reconhecer o vírus WR purificado (**FIGURA 40**). Entretanto, os animais infectados com os vírus WR e WR $\Delta$ B18 produziram uma quantidade bem maior de anticorpos específicos do que os animais infectados com os vírus MVA recombinantes. Além disso, os camundongos infectados com a dose maior do vírus WR $\Delta$ B18 produziram significativamente mais anticorpos do que os animais que foram inoculados com um log a menos do mesmo vírus, sendo a produção de anticorpos, no caso deste vírus replicativo, um fenômeno dose-dependente.

Abdahlrman e colaboradores, em 2006, compararam a infecção intranasal de camundongos BALB/c com as amostras MVA, LST e WR em diferentes doses e mostraram que os animais infectados com WR possuíam altos títulos de vírus no pulmão e de anticorpos neutralizantes no soro, no décimo quarto dia de infecção. O grupo infectado por LST mostrou títulos consideráveis apenas na primeira semana de infecção e somente induziu a produção de anticorpos neutralizantes quando administrado em altas doses. Já o MVA foi encontrado no pulmão dos animais apenas nos primeiros dois dias de infecção e não induziu a produção de anticorpos neutralizantes (*Abdahlrman, I., I. Gurt, et al., 2006*). Outros trabalhos na literatura comparando animais infectados com WR e MVA mostram que o WR induz uma resposta mais expressiva de anticorpos específicos e de anticorpos neutralizantes do que o MVA (*Ramirez, J. C., M. M. Gherardi, et al., 2000a; Ramirez, J. C., M. M. Gherardi, et al., 2000b*). A menor resposta humoral observada nos camundongos

infectados por MVA nos estudos citados e também no presente trabalho (**FIGURA 40**) pode ser explicada pela incapacidade do MVA de se multiplicar produtivamente e, portanto, expor menor quantidade de antígenos virais ao sistema imune do hospedeiro.

Xu e colaboradores demonstraram em 2008 que o receptor solúvel do IFN tipo I (homóloga a B18) produzida pelo ECTV é um alvo natural da resposta humoral antiviral desencadeada pela infecção. O soro dos animais infectados com o vírus ECTV foi capaz de reconhecer o receptor solúvel purificado e de neutralizar o efeito biológico do receptor em cultura de células. Além disso, todos os camundongos (BALB/c) imunizados somente com a proteína homóloga a B18 purificada sobreviveram ao desafio com o ECTV. Ou seja, os anticorpos gerados contra o receptor solúvel foram suficientes para prevenir a infecção letal do ECTV (Xu, R. H., M. Cohen, et al., 2008). Por isso, resolvemos investigar se o título de anticorpos anti-VACV totais era maior nos animais que possuíam a proteína B18. De acordo com o gráfico da **FIGURA 40** não houve diferença estatística na produção de anticorpos entre os animais que expressam B18 e aqueles que não expressam. Esse resultado foi corroborado quando imunizamos os camundongos com os três MVA recombinantes (MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18 e MVAB18) e todos protegeram igualmente os animais frente ao desafio letal com a amostra WR (**FIGURA 41**).

Verificamos que as células B de camundongos infectados com vírus WR e MVA que expressam esse receptor apresentam uma maior ativação, quando analisadas quanto ao nível de expressão de MHC de classe 2 e da molécula co-estimuladora CD86 (**FIGURA 45**). Portanto, apesar da presença da proteína B18 não influenciar no título de anticorpos específicos, talvez isso possa ter efeito na sua função de apresentação de antígenos ou na geração de linfócitos B de memória.

Além da ação dos anticorpos nas infecções por OPXV, o papel da resposta imune celular e da cooperação entre linfócitos B e células T CD4<sup>+</sup> tem sido estudado em infecções experimentais e em humanos. Estudos utilizando camundongos depletados especificamente para determinadas populações celulares, demonstraram que a falta de linfócitos T CD4<sup>+</sup> leva à incapacidade do hospedeiro em eliminar a infecção aguda pelo vírus WR, uma vez que a carga viral se manteve elevada até o vigésimo dia p.i.. Já a depleção de linfócitos T CD8<sup>+</sup> não acarretou a perda da capacidade de controlar a infecção primária, a carga viral se manteve semelhante ao grupo controle durante todo o curso da infecção. A resposta de anticorpos também foi monitorada nos animais que tiveram suas células depletadas. Nos camundongos com ausência de células T CD8<sup>+</sup> a resposta

humoral não foi alterada, diferentemente dos animais depletados de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Experimentos demonstraram ainda a eficiente resposta citotóxica das células T CD8<sup>+</sup> específicas para o WR, sugerindo que estas células não são essenciais para a eliminação do vírus durante uma infecção aguda, mas exercem função protetora na ausência da imunidade humoral mediada por células T CD4<sup>+</sup>. Além disso, os autores relataram que os anticorpos específicos para a amostra WR são muito importantes na eliminação da partícula viral e para prevenir a sua replicação. Esses resultados indicam que a resposta de anticorpos dependente de célula T CD4<sup>+</sup> é importante no controle inicial da infecção por VACV e proporciona imunidade protetora de longa duração, mas em casos de deficiência de células B ou de células T CD4<sup>+</sup>, a resposta mediada pelas células T CD8<sup>+</sup> pode ser muito importante no controle da infecção viral (Xu, R., A. J. Johnson, et al., 2004).

No presente estudo, não verificamos alterações na frequência de linfócitos B e T no baço em nenhum dos grupos analisados. Entretanto, encontramos algumas diferenças no perfil de ativação celular, nas proporções entre células naive, efetoras e de memória, e também nas células T reguladoras.

Observamos maior porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> expressando a molécula de ativação CD69 nos grupos infectados por WR em comparação com os demais grupos e ao controle PBS e que essa diferença é ainda maior na presença do receptor B18 (**FIGURA 42**). Isso pode indicar algum mecanismo de ativação celular independente de IFN tipo I ou um efeito da maior virulência do vírus WR selvagem.

A redução de células T naive e a maior frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> efetores nos animais infectados por WR e WRΔB18 (**FIGURA 43**) está de acordo com os dados da literatura que descrevem a alta disseminação desse vírus para outros órgãos além do sítio da exposição inicial (Turner, G. S., 1967; Smee, D. F., K. W. Bailey, et al., 2001; Reading, P. C. e G. L. Smith, 2003). Pode, portanto, ter ocorrido maior circulação de antígenos e consequente sensibilização de linfócitos virgens nos linfonodos drenantes. Com isso as células estimuladas perdem a selectina CD62L e superexpressam a molécula CD44, e então migram em direção aos tecidos afetados na tentativa de controlar a infecção.

A presença ou ausência do receptor B18 não influenciou o efeito da infecção nessas populações linfocitárias. A única exceção foi o aumento de células T CD8<sup>+</sup> efetoras visto no grupo infectado pelo MVAΔB18. Essa diferença talvez possa refletir um efeito da presença da proteína EGFP. O efeito imunogênico dessa proteína já foi demonstrado em alguns trabalhos. Gambotto e

colaboradores identificaram uma porção da proteína EGFP (peptídeo EGFP200-208) que se liga fortemente a moléculas de MHC de classe I de camundongos BALB/c e é capaz de gerar linfócitos T CD8 efetores após imunização com vetor viral contendo EGFP (*Gambotto et al., 2000*). O aumento na proporção de células efectoras nos camundongos infectados com os vírus WR pode ser um somatório da diferenciação a partir de mais células T naive, mas também pela ativação de células T de memória central, visto que ambas as populações estão reduzidas nestes grupos. Conforme revisado pelo grupo de Lanzavecchia, a proliferação de células T de memória pode se dar não apenas pela estimulação antigênica, mas também por citocinas como IL-15. Além disso, as células T de memória central podem além de proliferar em resposta a citocinas, se diferenciar em células efectoras expressando receptores para quimiocinas inflamatórias e produtoras de citocinas (*Sallusto et al. 2004*). Como o WR é mais virulento e a sua infecção mais duradoura, é possível que com quatorze dias de infecção a reestimulação antigênica e a presença de citocinas pro-inflamatórias estejam contribuindo para esse balanço maior de células T efectoras.

A menor frequência de células T reguladoras Foxp3<sup>+</sup> (**FIGURA 44**) observada no grupo infectado pelo vírus WR é corroborada por demonstrações de uma dramática redução dessa população em infecções experimentais parasitárias, bacterianas e virais, especificamente pelo vírus vaccínia (*Benson et al., 2012*). As Tregs exercem efeitos imunorreguladores diversos e essenciais para homeostase do sistema imune, como a prevenção de autoimunidade e a limitação de respostas inflamatórias e na imunidade contra patógenos (*Sakaguchi et al. 2008*). Após a infecção por vaccínia, a redução de Tregs é essencial para iniciar as respostas T efectoras envolvidas na proteção anti-infecciosa. O mecanismo envolvido nessa expansão de células efectoras e de privação de Tregs após a infecção por WR pode envolver a limitação da disponibilidade de IL-2, como descrito por Benson, visto que essa citocina é essencial para a sobrevivência dos linfócitos supressores (*Fontenot, J. D. e A. Y. Rudensky, 2005*). A atividade do sistema imune compreende um balanço entre funções efectoras e reguladoras, e de acordo com os dados obtidos nos gráficos das **FIGURAS 44 e 43** e na maior patogenicidade de WR em relação ao WRΔB18, podemos concluir que na ausência do receptor solúvel de IFN tipo I, esse vírus tem impacto menor na ativação da resposta T efetora e consequente manutenção de níveis de Tregs mais similares ao grupo controle.

Um dos objetivos desse estudo foi esclarecer o papel de um dos genes mais importantes na interferência da resposta imune do hospedeiro, a proteína B18, que limita a ativação do estado anti-viral nos VACV. Isto é particularmente importante no caso do vírus MVA, uma vez que os outros



genes homólogos àqueles envolvidos no bloqueio do estado antiviral via IFN tipo I pelos *Vaccinia virus* WR – os genes E3L e K3L, estão preservados no genoma do MVA. Avaliamos os efeitos da deleção ou inserção desse gene nos vírus WR e MVA na resposta imune do hospedeiro, em termos de ativação de linfócitos e na produção de anticorpos específicos. Entretanto, dado o papel dos IFN tipo I na resposta inata e inicial após a exposição aos vírus, partimos para o estudo do efeito da proteína B18 nas células dendríticas (DC).

As DC constituem as células apresentadoras de antígenos mais eficientes e possuem uma capacidade única na ativação de resposta imune inata e adaptativa. Devido a sua alta eficiência na ativação de linfócitos T naive, as células dendríticas são consideradas a principal forma de integração entre a imunidade natural e adquirida (*Lanzavecchia, A. e F. Sallusto, 2001*). Após reconhecer padrões moleculares associados a patógenos, DC imaturas residentes em tecidos periféricos captam e processam antígenos e migram para os órgãos linfoides secundários enquanto sofrem maturação e ativação. Essas células passam então a secretar citocinas e aumentam a expressão de moléculas co-estimuladoras e MHC de classe I e II, se tornando eficientes APC capazes de ativar tanto células T CD4<sup>+</sup> quanto CD8<sup>+</sup> (*Inaba, K., S. Turley, et al., 2000; Norbury, C. C., D. Malide, et al., 2002*). Entretanto, existem múltiplos subtipos de DCs que podem ser distinguidos por seu fenótipo e função tanto em seres humanos quanto em camundongos (*Shortman, K. e Y. J. Liu, 2002*).

Em geral, as DC podem ser divididas em dois grandes grupos: células dendríticas plasmocitóides (pDC - CD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>) e células dendríticas convencionais (cDC - CD11c<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>). As cDC são predominantes no baço e podem ainda ser distinguidas entre linfoides (CD8<sup>+</sup>); cuja função está mais associada a alta produção de IL-12 e ativação de linfócitos citotóxicos; e mielóides (CD11b<sup>+</sup>); mais relacionadas à diferenciação de células Th2. As pDC são especializadas na produção de IFN tipo I (*Nakano, H., M. Yanagita et al., 2001; Belz, G. T., C. M. Smith et al., 2004*). Sabe-se da grande capacidade dos vírus em evadir o sistema imune do hospedeiro, e um dos efeitos de uma infecção viral é alterar a proporção entre essas populações de células dendríticas. Isso ocorre, por exemplo, em infecções por citomegalovírus murino e vírus da coriomeningite linfocítica (*Dalod, M., T. Hamilton et al., 2003; Zuniga, E. I., D. B. McGavern et al., 2004*).

A redução na população de pDC observada em todos os grupos e a redução de cDC nos animais infectados com os MVA selvagem e recombinantes podem ser explicados pela já descrita indução de apoptose por VACV em células dendríticas (*Chahroudi, A., D. A. Garber, et al., 2006*).

Como já demonstrado por Yao e colaboradores, são encontradas DC infectadas no baço de camundongos 24h após inoculação com VACV (Yao, Y., P. Li et al., 2007). Seria necessário confirmar o diferente perfil observado no grupo MVAB18rev, visto que o vírus selvagem também é descrito como causador de apoptose nessas células. Considerando que as cDC representam uma parcela muito maior das DC no baço, a perda nos grupos infectados por MVA em relação ao WR foi bem mais acentuada. De fato, Chahroudi e colaboradores mostraram que tanto o VACV quanto o MVA induzem a apoptose nas DC infectadas. Entretanto, as células infectadas com MVA morrem mais cedo do que as infectadas com o VACV. A apoptose dessas células pode estimular o sistema imune do hospedeiro uma vez que as DC não infectadas podem apresentar de maneira cruzada os antígenos virais oriundos das células apoptóticas para as células T CD8<sup>+</sup>. A apresentação cruzada pode ser o principal mecanismo de indução da resposta imune após a infecção pelos OPXV (Chahroudi, A., D. A. Garber, et al., 2006). A presença ou ausência da proteína B18 não influenciou na redução das DC esplênicas 24h após a infecção. Entretanto, talvez em um tempo posterior, o bloqueio da ação parácrina do IFN tipo I pelos vírus capazes de produzir B18 poderia ocasionar alguma diferença na indução de apoptose de outras células DC.

Em seguida, passamos a avaliar como cada uma das amostras virais afetava a ativação das células dendríticas, analisando a expressão de moléculas co-estimuladoras e de MHC. Após 24h de infecção, verificamos que as DC no baço de camundongos infectados por WR apresentaram aumento na expressão de CD40, CD80 e MHC-II. A ausência de B18 parece acentuar essa ativação. De fato, os IFN tipo I exercem diversos efeitos nas DC, modulando sua maturação, diferenciação, migração e expressão de moléculas co-estimuladoras e MHC-II (Montoya, M., G. Schiavoni et al., 2002).

As DC dos camundongos infectados pelos três MVA recombinantes tiveram aumento na maioria das moléculas co-estimuladoras avaliadas e MHC-I, tanto nas pDC e nas cDC. De maneira geral, a deleção ou inserção do gene B18R no MVA não causou alterações significativas na ativação das DC, com aumento de algumas moléculas indicativas de ativação no grupo infectado por MVAB18.

Em uma análise ampla, os vírus WR e WRΔB18 parecem estimular mais a ativação de pDC, enquanto os três vírus MVA recombinantes induzem ativação tanto de pDC, quanto de cDC. Pode-se notar um aumento na quantidade de MHC-II nas cDC de animais infectados por WR e WRΔB18. O efeito das infecções por VACV em DC já foi demonstrado na literatura tanto in vitro

quanto in vivo. Em um trabalho que utilizou uma estratégia de estudo similar, foi observada ativação de DC que produziam citocinas pró-inflamatórias no baço após a infecção por VACV, porém essas DC possuíam comprometimento na apresentação de antígenos via MHC-II. Assim como nos nossos resultados, esses autores descreveram um aumento de MHC-II nas DC 24h após infecção por VACV. Porém, com 48h, o nível de MHC-II reduzia a níveis menores que o controle não infectado e as DC eram menos eficientes em ativar a proliferação de linfócitos T “in vitro” (Yao, Y., P. Li et al., 2007). Torna-se importante avaliar em trabalhos posteriores ao nosso estudo, além das moléculas avaliadas, a capacidade de ativação de linfócitos T e a produção de citocinas em DC infectadas pelos vírus MVA e WR produtores ou não de B18.

## **Conclusões**

---

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que a inativação dos sítios catalíticos das enzimas D9 e D10 do vírus MVA, além de atrasar a transição entre os estágios precoces e tardios do ciclo viral e a interrupção da síntese proteica celular, causa um acúmulo de dsRNA principalmente nas células BS-C-1 infectadas pelo vírus duplo mutante. Esse acúmulo é capaz de ativar vias de sinalização celular que vão desencadear a resposta antiviral que principalmente interrompe a síntese de proteínas na célula infectada e estimula a produção de IFN tipo I. Além disso, a inativação das duas enzimas causou uma redução no tamanho das placas formadas pelo vírus duplo mutante nas duas linhagens celulares avaliadas e reduziu o título viral deste vírus em quatro tipos celulares diferentes. Provavelmente o MVAD9muD10mu construído neste trabalho é mais imunogênico que a amostra original, sendo, portanto, um bom candidato para vetor vacinal. Entretanto, deve-se avaliar se o aumento na imunogenicidade não atrapalhará vacinas de doses múltiplas ou a administração de outras vacinas utilizando o MVA como vetor. Outra abordagem é a utilização desse vírus duplo mutante como vacina viva na proteção contra as doenças causadas pelos OPXV. Se ele for realmente mais imunogênico que a amostra original, provavelmente será ainda mais eficiente para ser utilizado como vacina.

Quanto ao gene B18R podemos concluir que a amostra MVA original não expressa uma proteína funcional. A remoção deste gene na amostra MVA causou uma redução do tamanho das placas virais formadas em CEF. Entretanto, há a possibilidade de que essa alteração de fenótipo tenha sido causada pelo gene EGFP. As amostras contendo ou não a proteína B18 não apresentaram diferença no rendimento viral nas curvas de ciclo único. A presença ou ausência dessa proteína no vírus MVA também não causou diferença na virulência das amostras nem na capacidade de gerar proteção contra a infecção pelo vírus WR. De uma forma geral a inserção do gene B18R na amostra MVA não afetou a ativação dos linfócitos T e B nos parâmetros analisados, mas talvez o tempo avaliado tenha sido tardio para esses vírus. Além disso, a inserção também não causou alterações significativas na ativação das DC, entretanto algumas moléculas de ativação estavam mais expressas no vírus MVAB18, sendo necessárias análises funcionais para se chegar a uma conclusão mais definitiva. Com relação ao vírus WR a deleção causou uma redução significativa na virulência da amostra WR $\Delta$ B18 quando comparada a amostra original. Dentro dos parâmetros analisados podemos concluir que a ausência da proteína B18 no vírus WR causa uma maior ativação das DC e uma menor ativação de linfócitos B e T. Como as alterações encontradas na ativação das DC e linfócitos diante a presença ou ausência da proteína B18 ainda não foram dramáticas seria

necessário uma avaliação mais refinada da resposta imune contra os antígenos virais ou contra uma proteína exógena carregada por essas amostras virais.

# Perspectivas

---

- ✓ Avaliar a capacidade replicativa de todos os vírus construídos neste trabalho através de curvas de crescimento em diferentes linhagens celulares utilizando uma M.O.I. baixa (0,01).
- ✓ Submeter os vírus MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu purificados ao ensaio de *western blot* para confirmar a diferença observada no padrão das proteínas precoces.
- ✓ Avaliar a expressão de IFN tipo I em células infectadas com os vírus MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu através de citometria de fluxo.
- ✓ Avaliar em modelo murino a imunogenicidade dos vírus MVAD9D10rev e MVAD9muD10mu através de citometria de fluxo. Avaliando a ativação celular e a produção de citocinas nos linfócitos dos animais infectados.
- ✓ Inserir um gene exógeno no vírus MVAD9muD10mu e testá-lo como vetor vacinal.
- ✓ Construção do vírus MVA $\Delta$ B18 utilizando stop códon no início da sequência ao invés de inserir a ORF EGFP.
- ✓ Dosagem de citocinas através de PCR em tempo real nos baços dos animais infectados com os vírus MVAB18rev, MVA $\Delta$ B18, MVAB18, WR e WR $\Delta$ B18, 24 horas após a infecção.



## **Referências Bibliográficas**

Abdahlrman, 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.

Abrahao, J. S., M. I. Guedes, G. S. Trindade, F. G. Fonseca, R. K. Campos, B. F. Mota, Z. I. Lobato, A. T. Silva-Fernandes, G. O. Rodrigues, L. S. Lima, P. C. Ferreira, C. A. Bonjardim e E. G. Kroon. One more piece in the VACV ecological puzzle: could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil? PLoS One, v.4, n.10, p.e7428. 2009.

Alcami, A., J. A. Symons e G. L. Smith. The vaccinia virus soluble alpha/beta interferon (IFN) receptor binds to the cell surface and protects cells from the antiviral effects of IFN. J Virol, v.74, n.23, Dec, p.11230-9. 2000.

Amato, R. J. 5T4-modified vaccinia Ankara: progress in tumor-associated antigen-based immunotherapy. Expert Opin Biol Ther, v.10, n.2, Feb, p.281-7. 2010.

Andrew, M. E., B. E. Coupar e D. B. Boyle. Humoral and cell-mediated immune responses to recombinant vaccinia viruses in mice. Immunol Cell Biol, v.67 ( Pt 5), Oct, p.331-7. 1989.

Antia, R., V. V. Ganusov e R. Ahmed. The role of models in understanding CD8+ T-cell memory. Nat Rev Immunol, v.5, n.2, Feb, p.101-11. 2005.

Antoine, G., F. Scheifflinger, F. Dorner e F. G. Falkner. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. Virology, v.244, n.2, May 10, p.365-96. 1998.

Badovinac, V. P. e J. T. Harty. Programming, demarcating, and manipulating CD8+ T-cell memory. Immunol Rev, v.211, Jun, p.67-80. 2006.

Baumgarth, N. A two-phase model of B-cell activation. Immunol Rev, v.176, Aug, p.171-80. 2000.

Belyakov, I. M., P. Earl, A. Dzutsev, V. A. Kuznetsov, M. Lemon, L. S. Wyatt, J. T. Snyder, J. D. Ahlers, G. Franchini, B. Moss e J. A. Berzofsky. Shared modes of protection against poxvirus infection by attenuated and conventional smallpox vaccine viruses. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.16, Aug 5, p.9458-63. 2003.

Belz, G. T., C. M. Smith, D. Eichner, K. Shortman, G. Karupiah, F. R. Carbone e W. R. Heath. Cutting edge: conventional CD8 alpha+ dendritic cells are generally involved in priming CTL immunity to viruses. J Immunol, v.172, n.4, Feb 15, p.1996-2000. 2004.

Benson, A., S. Murray, P. Divakar, N. Burnaevskiy, R. Pifer, J. Forman e F. Yarovinsky. Microbial infection-induced expansion of effector T cells overcomes the suppressive effects of regulatory T cells via an IL-2 deprivation mechanism. J Immunol, v.188, n.2, Jan 15, p.800-10. 2012.

Biron, C. A. Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections. Semin Immunol, v.10, n.5, Oct, p.383-90. 1998.

Biron, C. A. e G. C., Sen. Poxviruses. IN: Fields, B .N.; Knipe, D. M.; *et al.* (Ed.). Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers p. 249-278, 2007.

Blanchard, T. J., A. Alcami, P. Andrea e G. L. Smith. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. J Gen Virol, v.79 ( Pt 5), May, p.1159-67. 1998.

Boehm, U., T. Klamp, M. Groot e J. C. Howard. Cellular responses to interferon-gamma. Annu Rev Immunol, v.15, p.749-95. 1997.

Bonjardim, C. A., P. C. Ferreira e E. G. Kroon. Interferons: signaling, antiviral and viral evasion. Immunol Lett, v.122, n.1, Jan 29, p.1-11. 2009.

Bork, P. Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally? Proteins, v.17, n.4, Dec, p.363-74. 1993.

Briody, B. A. Response of mice to ectromelia and vaccinia viruses. Bacteriol Rev, v.23, n.2, Jun, p.61-95. 1959.

Broyles, S. S. Vaccinia virus transcription. J Gen Virol, v.84, n.Pt 9, Sep, p.2293-303. 2003.

Buller, R. M. The BALB/c mouse as a model to study orthopoxviruses. Curr Top Microbiol Immunol, v.122, p.148-53. 1985.

Buller, R. M. e G. J. Palumbo. Poxvirus pathogenesis. Microbiol Rev, v.55, n.1, Mar, p.80-122. 1991.

Burgess, H. M. e I. Mohr. Cellular 5'-3' mRNA exonuclease Xrn1 controls double-stranded RNA accumulation and anti-viral responses. Cell Host Microbe, v.17, n.3, Mar 11, p.332-44. 2015.

Campos, M. A. S. e E.G., Kroon. Critical period for irreversible block of Vaccinia virus replication. Review Microbiology, v.24, 104-110. 1993.

Carroll, K., O. Elroy-Stein, B. Moss e R. Jagus. Recombinant vaccinia virus K3L gene product prevents activation of double-stranded RNA-dependent, initiation factor 2 alpha-specific protein kinase. J Biol Chem, v.268, n.17, Jun 15, p.12837-42. 1993.

Carter, G. C., M. Law, M. Hollinshead e G. L. Smith. Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. J Gen Virol, v.86, n.Pt 5, May, p.1279-90. 2005.

Chahroudi, A., D. A. Garber, P. Reeves, L. Liu, D. Kalman e M. B. Feinberg. Differences and similarities in viral life cycle progression and host cell physiology after infection of human dendritic cells with modified vaccinia virus Ankara and vaccinia virus. J Virol, v.80, n.17, Sep,

p.8469-81. 2006.

Chang, H. W., J. C. Watson e B. L. Jacobs. The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.11, Jun 1, p.4825-9. 1992.

Chang, S. J., J. C. Hsiao, S. Sonnberg, C. T. Chiang, M. H. Yang, D. L. Tzou, A. A. Mercer e W. Chang. Poxvirus host range protein CP77 contains an F-box-like domain that is necessary to suppress NF-kappaB activation by tumor necrosis factor alpha but is independent of its host range function. J Virol, v.83, n.9, May, p.4140-52. 2009.

Colamonici, O. R., P. Domanski, S. M. Sweitzer, A. Larner e R. M. Buller. Vaccinia virus B18R gene encodes a type I interferon-binding protein that blocks interferon alpha transmembrane signaling. J Biol Chem, v.270, n.27, Jul 7, p.15974-8. 1995.

Condit, R. C. e E. G. Niles. Regulation of viral transcription elongation and termination during vaccinia virus infection. Biochim Biophys Acta, v.1577, n.2, Sep 13, p.325-36. 2002.

Coras, B., S. Essbauer, M. Pfeffer, H. Meyer, J. Schroder, W. Stolz, M. Landthaler e T. Vogt. Cowpox and a cat. Lancet, v.365, n.9457, Jan 29-Feb 4, p.446. 2005.

Cottingham, M. G. e M. W. Carroll. Recombinant MVA vaccines: dispelling the myths. Vaccine, v.31, n.39, Sep 6, p.4247-51.

Da Fonseca, F. e B. Moss. Poxvirus DNA topoisomerase knockout mutant exhibits decreased infectivity associated with reduced early transcription. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.20, Sep 30, p.11291-6. 2003.

Da Fonseca, F. G., E. J. Wolffe, A. Weisberg e B. Moss. Effects of deletion or stringent repression of the H3L envelope gene on vaccinia virus replication. J Virol, v.74, n.16, Aug, p.7518-28. 2000.

Daher Freitas, L. F. Caracterização da resposta imune induzida pelo vírus *Vaccinia Ankara* modificado (MVA) em modelo murino. Belo Horizonte: UFMG, Mar. Dissertação de Mestrado - Curso de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

Dalod, M., T. Hamilton, R. Salomon, T. P. Salazar-Mather, S. C. Henry, J. D. Hamilton e C. A. Biron. Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. J Exp Med, v.197, n.7, Apr 7, p.885-98. 2003.

Damaso, C. R., J. J. Esposito, R. C. Condit e N. Moussatche. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. Virology, v.277, n.2, Nov 25, p.439-49. 2000.

Damon, I. K. Poxviruses. IN: Fields, B .N.; Knipe, D. M.; *et al.* (Ed.). *Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers p. 2947-2975, 2007.

Dangoor, A., P. Lorigan, U. Keilholz, D. Schadendorf, A. Harris, C. Ottensmeier, J. Smyth, K. Hoffmann, R. Anderson, M. Cripps, J. Schneider e R. Hawkins. Clinical and immunological responses in metastatic melanoma patients vaccinated with a high-dose poly-epitope vaccine. Cancer Immunol Immunother, v.59, n.6, Jun, p.863-73. 2010.

Davies, M. V., O. Elroy-Stein, R. Jagus, B. Moss e R. J. Kaufman. The vaccinia virus K3L gene product potentiates translation by inhibiting double-stranded-RNA-activated protein kinase and phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2. J Virol, v.66, n.4, Apr, p.1943-50. 1992.

De Souza Trindade, G., F. G. Da Fonseca, J. T. Marques, M. L. Nogueira, L. C. Mendes, A. S. Borges, J. R. Peiro, E. M. Pituco, C. A. Bonjardim, P. C. Ferreira e E. G. Kroon. Aracatuba virus: a vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle. Emerg Infect Dis, v.9, n.2, Feb, p.155-60. 2003.

Dehaven, B. C., N. M. Girgis, Y. Xiao, P. N. Hudson, V. A. Olson, I. K. Damon e S. N. Isaacs. Poxvirus complement control proteins are expressed on the cell surface through an intermolecular disulfide bridge with the viral A56 protein. J Virol, v.84, n.21, Nov, p.11245-54. 2010.

Desmyter, J., J. L. Melnick e W. E. Rawls. Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). J Virol, v.2, n.10, Oct, p.955-61. 1968.

DeWitte-Orr, S.T., K. L., Mossman. dsRNA and the innate antiviral immune response. Future Virology, v.5, n.3, p.325-341. 2010.

Diven, D. G. An overview of poxviruses. J Am Acad Dermatol, v.44, n.1, Jan, p.1-16. 2001.

Drexler, I., C. Staib e G. Sutter. Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential? Curr Opin Biotechnol, v.15, n.6, Dec, p.506-12. 2004.

Drillien, R., D. Spehner e D. Hanau. Modified vaccinia virus Ankara induces moderate activation of human dendritic cells. J Gen Virol, v.85, n.Pt 8, Aug, p.2167-75. 2004.

Esposito, J. J. e F. Fenner. IN: Fields, B .N.; Knipe, D. M.; *et al.* (Ed.). Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers p. 2885-2921, 2001.

Esteban, D. J. e R. M. Buller. Ectromelia virus: the causative agent of mousepox. J Gen Virol, v.86, n.Pt 10, Oct, p.2645-59. 2005.

Fang, M. e L. J. Sigal. Antibodies and CD8+ T cells are complementary and essential for natural resistance to a highly lethal cytopathic virus. J Immunol, v.175, n.10, Nov 15, p.6829-36. 2005.

Fenner, F. The pathogenesis of the acute exanthems; an interpretation based on experimental investigations with mousepox; infectious ectromelia of mice. Lancet, v.2, n.6537, Dec 11, p.915-20. 1948.

Fenner, F., R. Wittek e K. R. Dumbell. The Orthopoxvirus. IN: Academic Press, San Diego, 1989.

Fenner, F. Adventures with poxviruses of vertebrates. FEMS Microbiol Rev, v.24, n.2, Apr, p.123-33. 2000.

Fernandez De Marco Mdel, M., A. Alejo, P. Hudson, I. K. Damon e A. Alcami. The highly virulent variola and monkeypox viruses express secreted inhibitors of type I interferon. FASEB J, v.24, n.5, May, p.1479-88. 2010.

Ferreira, J. M., J. S. Abrahao, B. P. Drumond, F. M. Oliveira, P. A. Alves, M. A. Pascoal-Xavier, Z. I. Lobato, C. A. Bonjardim, P. C. Ferreira e E. G. Kroon. Vaccinia virus: shedding and horizontal transmission in a murine model. J Gen Virol, v.89, n.Pt 12, Dec, p.2986-91. 2008.

Ferreira, J. M., B. P. Drumond, M. I. Guedes, M. A. Pascoal-Xavier, C. M. Almeida-Leite, R. M. Arantes, B. E. Mota, J. S. Abrahao, P. A. Alves, F. M. Oliveira, P. C. Ferreira, C. A. Bonjardim, Z. I. Lobato e E. G. Kroon. Virulence in murine model shows the existence of two distinct populations of Brazilian Vaccinia virus strains. PLoS One, v.3, n.8, p.e3043. 2008.

Ferreira, J. M., B. P. Drumond, J. S. Abrahão, Z. I. .P. Lobato, C. A. Bonjardim, P. C. P. Frreira e E. G. Kroon. Brazilian vaccinia virus strains show a classical Orthopoxvirus infection course and cross-protection. Asian Pac. J. Trop. Med., v.2, n.2, p.21-26. 2009.

Ferrier-Rembert, A., R. Drillien, J. N. Tournier, D. Garin e J. M. Crance. Intranasal cowpox virus infection of the mouse as a model for preclinical evaluation of smallpox vaccines. Vaccine, v.25, n.25, Jun 15, p.4809-17. 2007.

Fontenot, J. D. e A. Y. Rudensky. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. Nat Immunol, v.6, n.4, Apr, p.331-7. 2005.

Fu, X., A. Rivera, L. Tao e X. Zhang. Incorporation of the B18R gene of vaccinia virus into an oncolytic herpes simplex virus improves antitumor activity. Mol Ther, v.20, n.10, Oct, p.1871-81. 2012.

Gambotto, A., G. Dworacki, V. Cicinnati, T. Kenniston, J. Steitz, T. Tuting, P. D. Robbins e A. B. Deleo. Immunogenicity of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in BALB/c mice: identification of an H2-Kd-restricted CTL epitope. Gene Ther, v.7, n.23, Dec, p.2036-40. 2000.

Garcia, F., J. C. Bernaldo De Quiros, C. E. Gomez, B. Perdiguero, J. L. Najera, V. Jimenez, J. Garcia-Arriaza, A. C. Guardo, I. Perez, V. Diaz-Brito, M. S. Conde, N. Gonzalez, A. Alvarez, J. Alcami, J. L. Jimenez, J. Pich, J. A. Arnaiz, M. J. Maleno, A. Leon, M. A. Munoz-Fernandez, P. Liljestrom, J. Weber, G. Pantaleo, J. M. Gatell, M. Plana e M. Esteban. Safety and immunogenicity of a modified pox vector-based HIV/AIDS vaccine candidate expressing Env, Gag, Pol and Nef proteins of HIV-1 subtype B (MVA-B) in healthy HIV-1-uninfected volunteers: A phase I clinical trial (RISVAC02). Vaccine, v.29, n.46, Oct 26, p.8309-16. 2011.

Gillard, S., D. Spehner, R. Drillien e A. Kirn. Localization and sequence of a vaccinia virus gene required for multiplication in human cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.83, n.15, Aug, p.5573-7. 1986.

Goldsmith, C. S. Morphologic differentiation of viruses beyond the family level. Viruses, v.6, n.12, Dec, p.4902-13. 2014.

Gomez, C. E., B. Perdiguero, J. L. Najera, C. O. Sorzano, V. Jimenez, R. Gonzalez-Sanz e M. Esteban. Removal of vaccinia virus genes that block interferon type I and II pathways improves adaptive and memory responses of the HIV/AIDS vaccine candidate NYVAC-C in mice. J Virol, v.86, n.9, May, p.5026-38. 2012.

Gourley, T. S., E. J. Wherry, D. Masopust e R. Ahmed. Generation and maintenance of immunological memory. Semin Immunol, v.16, n.5, Oct, p.323-33. 2004.

Guimaraes-Walker, A., N. Mackie, S. McCormack, T. Hanke, C. Schmidt, J. Gilmour, B. Barin, A. McMichael, J. Weber, K. Legg, A. Babiker, P. Hayes, F. Gotch, C. Smith, L. Dally, L. Dorrell, I. Cebere, R. Kay, N. Winstone, S. Moore, N. Goonetilleke e P. Fast. Lessons from IAVI-006, a phase I clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the pThr.HIVA DNA and MVA.HIVA vaccines in a prime-boost strategy to induce HIV-1 specific T-cell responses in healthy volunteers. Vaccine, v.26, n.51, Dec 2, p.6671-7. 2008.

Haga, I. R. e A. G. Bowie. Evasion of innate immunity by vaccinia virus. Parasitology, v.130 Suppl, p.S11-25. 2005.

Hanahan, D., J. Jessee e F. R. Bloom. Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria. Methods Enzymol, v.204, p.63-113. 1991.

Harty, J. T., A. R. Tinnereim e D. W. White. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. Annu Rev Immunol, v.18, p.275-308. 2000.

Hayasaka, D., F. A. Ennis e M. Terajima. Pathogenesis of respiratory infections with virulent and attenuated vaccinia viruses. Virol J, v.4, p.22. 2007.

Heller, E. D., A. M. Levy, R. Vaiman e B. Schwartsburd. Chicken-embryo fibroblasts produce two types of interferon upon stimulation with Newcastle disease virus. Vet Immunol Immunopathol, v.57, n.3-4, Jul, p.289-303. 1997.

Hornemann, S., O. Harlin, C. Staib, S. Kisling, V. Erfle, B. Kaspers, G. Hacker e G. Sutter. Replication of modified vaccinia virus Ankara in primary chicken embryo fibroblasts requires expression of the interferon resistance gene E3L. J Virol, v.77, n.15, Aug, p.8394-407. 2003.

Howard, J. e S. Bechstet. Hypothesis: a helix of ankyrin repeats of the NOMPC-TRP ion channel is the gating spring of mechanoreceptors. Curr Biol, v.14, n.6, Mar 23, p.R224-6. 2004.

Hryniewicz-Jankowska, A., A. Czogalla, E. Bok e A. F. Sikorsk. Ankyrins, multifunctional proteins involved in many cellular pathways. Folia Histochem Cytobiol, v.40, n.3, p.239-49. 2002.

Huang, X. e A. Madan. CAP3: A DNA sequence assembly program. Genome Res., v.9, n.9, Sep, p.868-77. 1999.

Hughes, A. L. e R. Friedman. Poxvirus genome evolution by gene gain and loss. Mol Phylogenet Evol., v.35, n.1, Apr, p.186-95. 2005.

Inaba, K., S. Turley, T. Iyoda, F. Yamaide, S. Shimoyama, C. Reis E Sousa, R. N. Germain, I. Mellman e R. M. Steinman. The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. J Exp Med., v.191, n.6, Mar 20, p.927-36. 2000.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2014. Disponível em <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2014>

Jacobs, N., R. A. Chen, C. Gubser, P. Najarro e G. L. Smith. Intradermal immune response after infection with Vaccinia virus. J Gen Virol., v.87, n.Pt 5, May, p.1157-61. 2006.

Johnston, J. B. e G. Mcfadden. Poxvirus immunomodulatory strategies: current perspectives. J Virol., v.77, n.11, Jun, p.6093-100. 2003.

Joklik, W. K. The purification fo four strains of poxvirus. Virology., v.18, Sep, p.9-18. 1962.

Karem, K. L., M. Reynolds, Z. Braden, G. Lou, N. Bernard, J. Patton e I. K. Damon. 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. Clin Diagn Lab Immunol., v.12, n.7, Jul, p.867-72. 2005.

Kawai, T. e S. Akira. Innate immune recognition of viral infection. Nat Immunol., v.7, n.2, Feb, p.131-7. 2006.

Kong, W. P., G. D. Ghadge e R. P. Roos. Involvement of cardiovirus leader in host cell-restricted virus expression. Proc Natl Acad Sci U S A., v.91, n.5, Mar 1, p.1796-800. 1994.

Kotwal, G. J. Poxviral mimicry of complement and chemokine system components: what's the end game? Immunol Today., v.21, n.5, May, p.242-8. 2000.

Koyama, S., K. J. Ishii, C. Coban e S. Akira. Innate immune response to viral infection. Cytokine., v.43, n.3, Sep, p.336-41. 2008.

Lanzavecchia, A. e F. Sallusto. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. Cell., v.106, n.3, Aug 10, p.263-6. 2001.

Lefkowitz, E. J., C. Wang e C. Upton. Poxviruses: past, present and future. Virus Res., v.117, n.1, Apr, p.105-18. 2006.



- Lehmann, M. H., W. Kastenmuller, J. D. Kandemir, F. Brandt, Y. Suezer e G. Sutter. Modified vaccinia virus ankara triggers chemotaxis of monocytes and early respiratory immigration of leukocytes by induction of CCL2 expression. J Virol, v.83, n.6, Mar, p.2540-52. 2009.
- Levine, M. M. e M. B. Sztein. Vaccine development strategies for improving immunization: the role of modern immunology. Nat Immunol, v.5, n.5, May, p.460-4. 2004.
- Liptakova, H., E. Kontsekova, A. Alcamì, G. L. Smith e P. Kontsek. Analysis of an interaction between the soluble vaccinia virus-coded type I interferon (IFN)-receptor and human IFN-alpha 1 and IFN-alpha2. Virology, v.232, n.1, May 26, p.86-90. 1997.
- Liu, L., Z. Xu, R. C. Fuhlbrigge, V. Pena-Cruz, J. Lieberman e T. S. Kupper. Vaccinia virus induces strong immunoregulatory cytokine production in healthy human epidermal keratinocytes: a novel strategy for immune evasion. J Virol, v.79, n.12, Jun, p.7363-70. 2005.
- Liu, S. W., G. C. Katsafanas, R. Liu, L. S. Wyatt e B. Moss. Poxvirus decapping enzymes enhance virulence by preventing the accumulation of dsRNA and the induction of innate antiviral responses. Cell Host Microbe, v.17, n.3, Mar 11, p.320-31. 2015.
- Liu, S. W., L. S. Wyatt, M. S. Orandle, M. Minai e B. Moss. The D10 decapping enzyme of vaccinia virus contributes to decay of cellular and viral mRNAs and to virulence in mice. J Virol, v.88, n.1, Jan, p.202-11. 2014.
- Mastrangelo, M. J., L. C. Eisenlohr, L. Gomella e E. C. Lattime. Poxvirus vectors: orphaned and underappreciated. J Clin Invest, v.105, n.8, Apr, p.1031-4. 2000.
- Mayr, A., V. Hochstein-Mintzel e H. Stickl. Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA. Infection 3, 6–14. 1975.
- Mayr, A. Smallpox vaccination and bioterrorism with pox viruses. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, v.26, n.5-6, Oct, p.423-30. 2003.
- McCurdy, L. H., B. D. Larkin, J. E. Martin e B. S. Graham. Modified vaccinia Ankara: potential as an alternative smallpox vaccine. Clin Infect Dis, v.38, n.12, Jun 15, p.1749-53. 2004.
- McFadden, G. Poxvirus tropism. Nat Rev Microbiol, v.3, n.3, Mar, p.201-13. 2005.
- McLysaght, A., P. F. Baldi e B. S. Gaut. Extensive gene gain associated with adaptive evolution of poxviruses. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.26, Dec 23, p.15655-60. 2003.
- McNeill WH. *Plagues and People*. Garden City, NY, Anchor Press/Doubleday, 1976.
- Meisinger-Henschel, C., M. Schmidt, S. Lukassen, B. Linke, L. Krause, S. Konietzny, A. Goesmann, P. Howley, P. Chaplin, M. Suter e J. Hausmann. Genomic sequence of chorioallantois vaccinia virus Ankara, the ancestor of modified vaccinia virus Ankara. J Gen Virol, v.88, n.Pt 12, Dec, p.3249-59. 2007.

Meng, X., J. Chao e Y. Xiang. Identification from diverse mammalian poxviruses of host-range regulatory genes functioning equivalently to vaccinia virus C7L. Virology, v.372, n.2, Mar 15, p.372-83. 2008.

Mercer, J. e A. Helenius. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. Science, v.320, n.5875, Apr 25, p.531-5. 2008.

Meseda, C. A., A. D. Garcia, A. Kumar, A. E. Mayer, J. Manischewitz, L. R. King, H. Golding, M. Merchlinsky e J. P. Weir. Enhanced immunogenicity and protective effect conferred by vaccination with combinations of modified vaccinia virus Ankara and licensed smallpox vaccine Dryvax in a mouse model. Virology, v.339, n.2, Sep 1, p.164-75. 2005.

Meyer, H., G. Sutter e A. Mayr. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. J Gen Virol, v.72 ( Pt 5), May, p.1031-8. 1991.

Meyer, R. G., C. M. Britten, U. Siepmann, B. Petzold, T. A. Sagban, H. A. Lehr, B. Weigle, M. Schmitz, L. Mateo, B. Schmidt, H. Bernhard, T. Jakob, R. Hein, G. Schuler, B. Schuler-Thurner, S. N. Wagner, I. Drexler, G. Sutter, N. Arndtz, P. Chaplin, J. Metz, A. Enk, C. Huber e T. Wolfel. A phase I vaccination study with tyrosinase in patients with stage II melanoma using recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA-hTyr). Cancer Immunol Immunother, v.54, n.5, May, p.453-67. 2005.

Miller, G. Putting Lady Mary in her place: a discussion of historical causation. Bull Hist Med, v.55, n.1, Spring, p.2-16. 1981.

Minnigan, H. e R. W. Moyer. Intracellular location of rabbit poxvirus nucleic acid within infected cells as determined by in situ hybridization. J Virol, v.55, n.3, Sep, p.634-43. 1985.

Montanuy, I., A. Alejo e A. Alcami. Glycosaminoglycans mediate retention of the poxvirus type I interferon binding protein at the cell surface to locally block interferon antiviral responses. FASEB J, v.25, n.6, Jun, p.1960-71. 2011.

Montoya, M., G. Schiavoni, F. Mattei, I. Gresser, F. Belardelli, P. Borrow e D. F. Tough. Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. Blood, v.99, n.9, May 1, p.3263-71. 2002.

Morikawa, S. e Y. Ueda. Characterization of vaccinia surface antigen expressed by recombinant baculovirus. Virology, v.193, n.2, Apr, p.753-61. 1993.

Mosavi, L. K., T. J. Cammett, D. C. Desrosiers e Z. Y. Peng. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. Protein Sci, v.13, n.6, Jun, p.1435-48. 2004.

Moss, B. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.21, Oct 15, p.11341-8. 1996.

Moss, B. e J. L. Shisler. Immunology 101 at poxvirus U: immune evasion genes. Semin Immunol, v.13, n.1, Feb, p.59-66. 2001.

Moss, B. Poxvirus entry and membrane fusion. Virology, v.344, n.1, Jan 5, p.48-54. 2006.

Moss, B. Poxviridae: The viruses and their replication. IN: Fields, B .N.; Knipe, D. M.; *et al.* (Ed.). Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers p. 2905-2945, 2007.

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

Moss, B. Poxvirus cell entry: how many proteins does it take? Viruses, v.4, n.5, May, p.688-707. 2012.

Moss, B. Poxvirus DNA replication. Cold Spring Harb Perspect Biol, v.5, n.9, Sep. 2013.

Nakano, H., M. Yanagita e M. D. Gunn. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. J Exp Med, v.194, n.8, Oct 15, p.1171-8. 2001.

Norbury, C. C., D. Malide, J. S. Gibbs, J. R. Bennink e J. W. Yewdell. Visualizing priming of virus-specific CD8+ T cells by infected dendritic cells in vivo. Nat Immunol, v.3, n.3, Mar, p.265-71. 2002.

Panicali, D. e E. Paoletti. Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. Proc Natl Acad Sci U S A, v.79, n.16, Aug, p.4927-31. 1982.

Parrino, J., L. H. Mccurdy, B. D. Larkin, I. J. Gordon, S. E. Rucker, M. E. Enama, R. A. Koup, M. Roederer, R. T. Bailer, Z. Moodie, L. Gu, L. Yan e B. S. Graham. Safety, immunogenicity and efficacy of modified vaccinia Ankara (MVA) against Dryvax challenge in vaccinia-naive and vaccinia-immune individuals. Vaccine, v.25, n.8, Feb 9, p.1513-25. 2007.

Parrish, S. e B. Moss. Characterization of a vaccinia virus mutant with a deletion of the D10R gene encoding a putative negative regulator of gene expression. J Virol, v.80, n.2, Jan, p.553-61. 2006.

Parrish, S. e B. Moss. Characterization of a second vaccinia virus mRNA-decapping enzyme conserved in poxviruses. J Virol, v.81, n.23, Dec, p.12973-8. 2007.

Parrish, S., W. Resch e B. Moss. Vaccinia virus D10 protein has mRNA decapping activity, providing a mechanism for control of host and viral gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.7, Feb 13, p.2139-44. 2007.

Perkus, M. E., S. J. Goebel, S. W. Davis, G. P. Johnson, K. Limbach, E. K. Norton e E. Paoletti. Vaccinia virus host range genes. Virology, v.179, n.1, Nov, p.276-86. 1990.

Precopio, M. L., M. R. Betts, J. Parrino, D. A. Price, E. Gostick, D. R. Ambrozak, T. E. Asher, D. C. Douek, A. Harari, G. Pantaleo, R. Bailer, B. S. Graham, M. Roederer e R. A. Koup. Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. J Exp Med, v.204, n.6, Jun 11, p.1405-16. 2007.

Putz, M. M., C. M. Midgley, M. Law e G. L. Smith. Quantification of antibody responses against multiple antigens of the two infectious forms of Vaccinia virus provides a benchmark for smallpox vaccination. Nat Med, v.12, n.11, Nov, p.1310-5. 2006.

Ramirez, J. C., M. M. Gherardi, D. Rodriguez e M. Esteban. Attenuated modified vaccinia virus Ankara can be used as an immunizing agent under conditions of preexisting immunity to the vector. J Virol, v.74, n.16, Aug, p.7651-5. 2000a.

Ramirez, J. C., M. M. Gherardi e M. Esteban. Biology of attenuated modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and activation of B- and T-cell immune responses in comparison with the Western Reserve strain and advantages as a vaccine. J Virol, v.74, n.2, Jan, p.923-33. 2000b.

Ramshaw, I. A., A. J. Ramsay, G. Karupiah, M. S. Rolph, S. Mahalingam e J. C. Ruby. Cytokines and immunity to viral infections. Immunol Rev, v.159, Oct, p.119-35. 1997.

Reading, P. C. e G. L. Smith. A kinetic analysis of immune mediators in the lungs of mice infected with vaccinia virus and comparison with intradermal infection. J Gen Virol, v.84, n.Pt 8, Aug, p.1973-83. 2003.

Riedel, S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. Proc (Bayl Univ Med Cent), v.18, n.1, Jan, p.21-5. 2005.

Rivas, C., J. Gil, Z. Melkova, M. Esteban e M. Diaz-Guerra. Vaccinia virus E3L protein is an inhibitor of the interferon (i.f.n.)-induced 2-5A synthetase enzyme. Virology, v.243, n.2, Apr 10, p.406-14. 1998.

Rocha, C. D., B. C. Caetano, A. V. Machado e O. Bruna-Romero. Recombinant viruses as tools to induce protective cellular immunity against infectious diseases. Int Microbiol, v.7, n.2, Jun, p.83-94. 2004.

Rubtsov, A. M. e O. D. Lopina. Ankyrins. FEBS Lett, v.482, n.1-2, Sep 29, p.1-5. 2000.

Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura e M. Ono. Regulatory T cells and immune tolerance. Cell, v.133, n.5, May 30, p.775-87. 2008.

Sallusto, F., J. Geginat e A. Lanzavecchia. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. Annu Rev Immunol, v.22, p.745-63. 2004.

Sambrook, J., E.F., Fritsch e T. Maniatis. Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.3, 1989.

Sandstrom, E., C. Nilsson, B. Hejdeman, A. Brave, G. Bratt, M. Robb, J. Cox, T. Vancott, M. Marovich, R. Stout, S. Aboud, M. Bakari, K. Pallangyo, K. Ljungberg, B. Moss, P. Earl, N. Michael, D. Birx, F. Mhalu, B. Wahren e G. Biberfeld. Broad immunogenicity of a multigene, multiclade HIV-1 DNA vaccine boosted with heterologous HIV-1 recombinant modified vaccinia virus Ankara. J Infect Dis, v.198, n.10, Nov 15, p.1482-90. 2008.

Sanger, F., S. Nicklen e A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A, v.74, n.12, Dec, p.5463-7. 1977.

Santoli, D., G. Trinchieri e H. Koprowski. Cell-mediated cytotoxicity against virus-infected target cells in humans. II. Interferon induction and activation of natural killer cells. J Immunol, v.121, n.2, Aug, p.532-8. 1978.

Schmidt, F. I., C. K. Bleck, A. Helenius e J. Mercer. Vaccinia extracellular virions enter cells by macropinocytosis and acid-activated membrane rupture. EMBO J, v.30, n.17, Aug 31, p.3647-61. 2011.

Schmidt, F. I., C. K. Bleck e J. Mercer. Poxvirus host cell entry. Curr Opin Virol, v.2, n.1, Feb, p.20-7. 2012.

Schmidt, F. I., C. K. Bleck, L. Reh, K. Novy, B. Wollscheid, A. Helenius, H. Stahlberg e J. Mercer. Vaccinia virus entry is followed by core activation and proteasome-mediated release of the immunomodulatory effector VH1 from lateral bodies. Cell Rep, v.4, n.3, Aug 15, p.464-76. 2013.

Seet, B. T., J. B. Johnston, C. R. Brunetti, J. W. Barrett, H. Everett, C. Cameron, J. Sypula, S. H. Nazarian, A. Lucas e G. Mcfadden. Poxviruses and immune evasion. Annu Rev Immunol, v.21, p.377-423. 2003.

Sejvar, J. J., Y. Chowdary, M. Schomogyi, J. Stevens, J. Patel, K. Karem, M. Fischer, M. J. Kuehnert, S. R. Zaki, C. D. Paddock, J. Guarner, W. J. Shieh, J. L. Patton, N. Bernard, Y. Li, V. A. Olson, R. L. Kline, V. N. Loparev, D. S. Schmid, B. Beard, R. R. Regnery e I. K. Damon. Human monkeypox infection: a family cluster in the midwestern United States. J Infect Dis, v.190, n.10, Nov 15, p.1833-40. 2004.

Senkevich, T. G., L. S. Wyatt, A. S. Weisberg, E. V. Koonin e B. Moss. A conserved poxvirus N1pC/P60 superfamily protein contributes to vaccinia virus virulence in mice but not to replication in cell culture. Virology, v.374, n.2, May 10, p.506-14. 2008.

Shchelkunov, S. N. Emergence and reemergence of smallpox: the need for development of a new generation smallpox vaccine. Vaccine, v.29 Suppl 4, Dec 30, p.D49-53. 2011.

Shchelkunov, S. N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. PLoS Pathog, v.9, n.12, p.e1003756. 2013.

Shisler, J. L. e X. L. Jin. The vaccinia virus K1L gene product inhibits host NF-kappaB activation by preventing IkappaBalpha degradation. J Virol, v.78, n.7, Apr, p.3553-60. 2004.

Shors, T., J. G. Keck e B. Moss. Down regulation of gene expression by the vaccinia virus D10 protein. J Virol, v.73, n.1, Jan, p.791-6. 1999.

Shortman, K. e Y. J. Liu. Mouse and human dendritic cell subtypes. Nat Rev Immunol, v.2, n.3, Mar, p.151-61. 2002.

Silva Gomes, J. A., F. F. De Araujo, G. De Souza Trindade, B. R. Quinan, B. P. Drumond, J. M. Ferreira, B. E. Mota, M. L. Nogueira, E. G. Kroon, J. Santos Abrahao, R. Correa-Oliveira e F. G. Da Fonseca. Immune modulation in primary vaccinia virus zoonotic human infections. Clin Dev Immunol, v.2012, p.974067. 2012.

Smee, D. F., K. W. Bailey e R. W. Sidwell. Treatment of lethal vaccinia virus respiratory infections in mice with cidofovir. Antivir Chem Chemother, v.12, n.1, Jan, p.71-6. 2001.

Smith, G. L. e G. Mcfadden. Smallpox: anything to declare? Nat Rev Immunol, v.2, n.7, Jul, p.521-7. 2002.

Smith, G. L., C. T. Benfield, C. Maluquer De Motes, M. Mazzon, S. W. Ember, B. J. Ferguson e R. P. Sumner. Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. J Gen Virol, v.94, n.Pt 11, Nov, p.2367-92. 2013.

Smith, P. L., G. Lombardi e G. R. Foster. Type I interferons and the innate immune response--more than just antiviral cytokines. Mol Immunol, v.42, n.8, May, p.869-77. 2005.

Smith, S. A. e G. J. Kotwal. Immune response to poxvirus infections in various animals. Crit Rev Microbiol, v.28, n.3, p.149-85. 2002.

Smithson, C., A. Purdy, A. J. Verster e C. Upton. Prediction of steps in the evolution of variola virus host range. PLoS One, v.9, n.3, p.e91520. 2014.

Souza, A. P., L. Haut, A. Reyes-Sandoval e A. R. Pinto. Recombinant viruses as vaccines against viral diseases. Braz J Med Biol Res, v.38, n.4, Apr, p.509-22. 2005.

Sperling, K. M., A. Schwantes, C. Staib, B. S. Schnierle e G. Sutter. The orthopoxvirus 68-kilodalton ankyrin-like protein is essential for DNA replication and complete gene expression of modified vaccinia virus Ankara in nonpermissive human and murine cells. J Virol, v.83, n.12, Jun, p.6029-38. 2009.

Sutter, G. e B. Moss. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.22, Nov 15, p.10847-51. 1992.

Symons, J. A., A. Alcamí e G. L. Smith. Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity. Cell, v.81, n.4, May 19, p.551-60. 1995.

Tartaglia, J., M. E. Perkus, J. Taylor, E. K. Norton, J. C. Audonnet, W. I. Cox, S. W. Davis, J. Van Der Hoeven, B. Meignier, M. Riviere e Et Al. NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. Virology, v.188, n.1, May, p.217-32. 1992.

Theves, C., P. Biagini e E. Crubezy. The rediscovery of smallpox. Clin Microbiol Infect, v.20, n.3, Mar, p.210-8. 2014.

Trindade, G. S., M. I. Guedes, B. P. Drumond, B. E. Mota, J. S. Abrahao, Z. I. Lobato, J. A. Gomes, R. Correa-Oliveira, M. L. Nogueira, E. G. Kroon e F. G. Da Fonseca. Zoonotic vaccinia virus: clinical and immunological characteristics in a naturally infected patient. Clin Infect Dis, v.48, n.3, Feb 1, p.e37-40. 2009.

Trindade, G. S., G. L. Emerson, D. S. Carroll, E. G. Kroon e I. K. Damon. Brazilian vaccinia viruses and their origins. Emerg Infect Dis, v.13, n.7, Jul, p.965-72. 2007.

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.

Turner, G. S. Respiratory infection of mice with vaccinia virus. J Gen Virol, v.1, n.3, Jul, p.399-402. 1967.

Ueda, Y., M. Ito e I. Tagaya. A specific surface antigen induced by poxvirus. Virology, v.38, n.1, May, p.180-2. 1969.

Ueda, Y., S. Morikawa e Y. Matsuura. Identification and nucleotide sequence of the gene encoding a surface antigen induced by vaccinia virus. Virology, v.177, n.2, Aug, p.588-94. 1990.

Ueda, Y., I. Tagaya, H. Amano e M. Ito. Studies on the early antigens induced by vaccinia virus. Virology, v.49, n.3, Sep, p.794-800. 1972.

Van Den Broek, M. F., U. Muller, S. Huang, M. Aguet e R. M. Zinkernagel. Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta and gamma interferon receptors. J Virol, v.69, n.8, Aug, p.4792-6. 1995.

Vancova, I., C. La Bonnardiere e P. Kontsek. Vaccinia virus protein B18R inhibits the activity and cellular binding of the novel type interferon-delta. J Gen Virol, v.79 ( Pt 7), Jul, p.1647-9. 1998.

Voronin, D. A. e E. V. Kiseleva. [Functional role of proteins containing ankyrin repeats]. Tsitologiya, v.49, n.12, p.989-99. 2007.

Waibler, Z., M. Anzaghe, T. Frenz, A. Schwantes, C. Pohlmann, H. Ludwig, M. Palomo-Otero, A. Alcamí, G. Sutter e U. Kalinke. Vaccinia virus-mediated inhibition of type I interferon responses is a multifactorial process involving the soluble type I interferon receptor B18 and intracellular components. J Virol, v.83, n.4, Feb, p.1563-71. 2009.

Webster, D. P., S. Dunachie, J. M. Vuola, T. Berthoud, S. Keating, S. M. Laidlaw, S. J. Mcconkey, I. Poulton, L. Andrews, R. F. Andersen, P. Bejon, G. Butcher, R. Sinden, M. A. Skinner, S. C. Gilbert e A. V. Hill. Enhanced T cell-mediated protection against malaria in human challenges by using the recombinant poxviruses FP9 and modified vaccinia virus Ankara. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.13, Mar 29, p.4836-41. 2005.

Whitley, R. J. Smallpox: a potential agent of bioterrorism. Antiviral Res, v.57, n.1-2, Jan, p.7-12. 2003.

Whitmire, J. K. Induction and function of virus-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses. Virology, v.411, n.2, Mar 15, p.216-28. 2011.

Wilkins, C. e M. Gale, Jr. Recognition of viruses by cytoplasmic sensors. Curr Opin Immunol, v.22, n.1, Feb, p.41-7. 2010.

Willis, K. L., J. O. Langland e J. L. Shisler. Viral double-stranded RNAs from vaccinia virus early or intermediate gene transcripts possess PKR activating function, resulting in NF-kappaB activation, when the K1 protein is absent or mutated. J Biol Chem, v.286, n.10, Mar 11, p.7765-78. 2011.

Xu, R., A. J. Johnson, D. Liggitt e M. J. Bevan. Cellular and humoral immunity against vaccinia virus infection of mice. J Immunol, v.172, n.10, May 15, p.6265-71. 2004.

Xu, R. H., M. Cohen, Y. Tang, E. Lazear, J. C. Whitbeck, R. J. Eisenberg, G. H. Cohen e L. J. Sigal. The orthopoxvirus type I IFN binding protein is essential for virulence and an effective target for vaccination. J Exp Med, v.205, n.4, Apr 14, p.981-92. 2008.

Yang, Z., S. E. Reynolds, C. A. Martens, D. P. Bruno, S. F. Porcella e B. Moss. Expression profiling of the intermediate and late stages of poxvirus replication. J Virol, v.85, n.19, Oct, p.9899-908. 2011.

Yao, Y., P. Li, P. Singh, A. T. Thiele, D. S. Wilkes, G. J. Renukaradhya, R. R. Brutkiewicz, J. B. Travers, G. D. Luker, S. C. Hong, J. S. Blum e C. H. Chang. Vaccinia virus infection induces dendritic cell maturation but inhibits antigen presentation by MHC class II. Cell Immunol, v.246, n.2, Apr, p.92-102. 2007.

Yokoyama, N., K. Maeda e T. Mikami. Recombinant viral vector vaccines for the veterinary use. J Vet Med Sci, v.59, n.5, May, p.311-22. 1997.

Zuniga, E. I., D. B. McGavern, J. L. Pruneda-Paz, C. Teng e M. B. Oldstone. Bone marrow plasmacytoid dendritic cells can differentiate into myeloid dendritic cells upon virus infection. Nat Immunol, v.5, n.12, Dec, p.1227-34. 2004.



**Anexos**

---

MVAΔD9ΔD10

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
MVAΔD9ΔD10	-----											
Clone	ACCTTACTAGGCAGCAAAATTTGTCTAGATAAARACTGARTCAACCGGTGCAGACGATTTGGTGGATCTAATGGAAATCCAAATGATTACTATCTTTTGAARATATACATT											
Consensus	ACCTTACTAGGCAGCAAAATTTGTCTAGATAAARACTGARTCAACCGGTGCAGACGATTTGGTGGATCTAATGGAAATCCAAATGATTACTATCTTTTGAARATATACATT											
	111	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
MVAΔD9ΔD10	-----											
Clone	TTTATGATCCGATCTTGTAAAGAAATAGAARATATGATAGTCCATCATCTGTTTTCCTTTCATAGAACTATATTTTCTTATCCAAATGAACAGATTAA											
Consensus	TTTATGATCCGATCTTGTAAAGAAATAGAARATATGATAGTCCATCATCTGTTTTCCTTTCATAGAACTATATTTTCTTATCCAAATGAACAGATTAA											
	221	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
MVAΔD9ΔD10	-----											
Clone	TCTCTCCAGAGTATTTGTACACATCTATCAAGTATTGGATCCATATCGCTTCCCTTCCCAATATATACGTAGTGTATGATACACATATTCATTGGGGAGAACCT											
Consensus	TCTCTCCAGAGTATTTGTACACATCTATCAAGTATTGGATCCATATCGCTTCCCTTCCCAATATATACGTAGTGTATGATACACATATTCATTGGGGAGAACCT											
	331	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440
MVAΔD9ΔD10	-----											
Clone	CCACTATATATCTCCCTTAAARATTAATCCTTACTAGTTTTCAGTGTTCGGATAGTGGTGGTTCGACTCATTATATATGATGTACAGCCCTCAATCGCGGTT											
Consensus	CCACTATATATCTCCCTTAAARATTAATCCTTACTAGTTTTCAGTGTTCGGATAGTGGTGGTTCGACTCATTATATATGATGTACAGCCCTCAATCGCGGTT											
	441	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550
MVAΔD9ΔD10	-----											
Clone	AGAAATGCTTTTTAGTTTCTATATTAATAGGAGATAGTTGTCGGCATAGTAAARATGAATGATACGTTTAAARATAGCTCTTAGTATGGGAATACCGGGCCG											
Consensus	AGAAATGCTTTTTAGTTTCTATATTAATAGGAGATAGTTGTCGGCATAGTAAARATGAATGATACGTTTAAARATAGCTCTTAGTATGGGAATACCGGGCCG											
	551	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	660
MVAΔD9ΔD10	-----											
Clone	CTTTACTTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGTATCCGGCGGGGTACAGACTCCAGCAGGACCATGTGATCGCGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGCTACAGGGCGACTG											
Consensus	CTTTACTTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGTATCCGGCGGGGTACAGACTCCAGCAGGACCATGTGATCGCGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGCTACAGGGCGACTG											
	661	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770
MVAΔD9ΔD10	-----											
Clone	GGTGTCCAGGTAGTGGTGTCCGGCAGCAGCAGGGCCGTCGCCATG6666GTTCTGCTGGTAGTGGTCCGAGCTGCACGCTGCCCTCCGATGTTGTGGCGGA											
Consensus	GGTGTCCAGGTAGTGGTGTCCGGCAGCAGCAGGGCCGTCGCCATG6666GTTCTGCTGGTAGTGGTCCGAGCTGCACGCTGCCCTCCGATGTTGTGGCGGA											
	771	780	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880
MVAΔD9ΔD10	-----											
Clone	TCTTGAGGTTCACTTGTATGCCGTTCTTCTGCTTGTCCGCGATGATATAGACGTTG66GCTGTTGTAGTGTACTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGCTCCTTG											
Consensus	TCTTGAGGTTCACTTGTATGCCGTTCTTCTGCTTGTCCGCGATGATATAGACGTTG66GCTGTTGTAGTGTACTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGCTCCTTG											
	881	890	900	910	920	930	940	950	960	970	980	990
MVAΔD9ΔD10	-----											
Clone	AGTGTATGCTTCCAGCTCGATCGGTTCCACAGGGGTGTCGCCCTCGACTCCACTCCGGCGGGTCTGTAGTGGCTCGCTTGAAGAGATGTTGGCTCCTG											
Consensus	AGTGTATGCTTCCAGCTCGATCGGTTCCACAGGGGTGTCGCCCTCGACTCCACTCCGGCGGGTCTGTAGTGGCTCGCTTGAAGAGATGTTGGCTCCTG											
	991	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
MVAΔD9ΔD10	-----											
Clone	GACGTAGCTTCCGGCATG66CGACTTGAAGAGTCTGCTGCTTATGTTGGTCCGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGATAGGTCA666TGGTCA666G66G66CC											
Consensus	GACGTAGCTTCCGGCATG66CGACTTGAAGAGTCTGCTGCTTATGTTGGTCCGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGATAGGTCA666TGGTCA666G66G66CC											
	1101	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200	1210
MVAΔD9ΔD10	-----											
Clone	AGGGCAGGGCAGCTTCCG66TGGTGCAGATGAACTTACGGGTCA66TGGCGTAGG66CATCGCCCTCGCCCTCGCCG66ACAGCTGAACCTTGTGGCGTTTACGTCG											
Consensus	AGGGCAGGGCAGCTTCCG66TGGTGCAGATGAACTTACGGGTCA66TGGCGTAGG66CATCGCCCTCGCCCTCGCCG66ACAGCTGAACCTTGTGGCGTTTACGTCG											
	1211	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310	1320
MVAΔD9ΔD10	-----											
Clone	CCGTCCAGCTGCACAGGATGGGACACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGTCTACCATTTATAGCATAGAAAARAAACAAATGAATTCGGTGGCAGCCGTTACCA											
Consensus	CCGTCCAGCTGCACAGGATGGGACACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGTCTACCATTTATAGCATAGAAAARAAACAAATGAATTCGGTGGCAGCCGTTACCA											
	1321	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430
MVAΔD9ΔD10	-----											
Clone	AAATTAACCTGAGGATGATTGATTAGAAAATATAAATTAATTTACCATCTGTTATTTTATACGGGATTTGCCGATATCATGTAGATAGTACCCTTACATCGTATA											
Consensus	AAATTAACCTGAGGATGATTGATTAGAAAATATAAATTAATTTACCATCTGTTATTTTATACGGGATTTGCCGATATCATGTAGATAGTACCCTTACATCGTATA											
	1431	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540
MVAΔD9ΔD10	-----											
Clone	CTCGACCATCTACGCTTTAATCCTCTATTTATTGACATTAATCTATTAGAAATGGAAATACCAATATTAGTACCTCAATAGTTTATTGGTAAATTTTTTTTAGAC											
Consensus	CTCGACCATCTACGCTTTAATCCTCTATTTATTGACATTAATCTATTAGAAATGGAAATACCAATATTAGTACCTCAATAGTTTATTGGTAAATTTTTTTTAGAC											
	1541	1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650
MVAΔD9ΔD10	-----											
Clone	GATAGATCGATGGCTTGAARCCAGGTTTTCCAAACCGGACTCATTGTCGATCGGTGAGAGTCTTTTCATAGCATGATCCATCTAATGATGATGTTTAAACAC											
Consensus	GATAGATCGATGGCTTGAARCCAGGTTTTCCAAACCGGACTCATTGTCGATCGGTGAGAGTCTTTTCATAGCATGATCCATCTAATGATGATGTTTAAACAC											
	1651	1660	1670	1680	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760
MVAΔD9ΔD10	-----											
Clone	TCTAARCAATGGACAATTTCTTTGATTGCTTGAATGATTTCAATAGGCTTCGCTACAGTAGGCAATACCATAGATATCTAGCCATTATAAGTGCACGTTTA											
Consensus	TCTAARCAATGGACAATTTCTTTGATTGCTTGAATGATTTCAATAGGCTTCGCTACAGTAGGCAATACCATAGATATCTAGCCATTATAAGTGCACGTTTA											
	1761	1770	1780	1790	1800	1810	1820	-----				
MVAΔD9ΔD10	-----											
Clone	CATATCTACGTTCTGGAGGAGTAGAAGCTGACTATTGAGACGAATGGCTTCTCTACTA											
Consensus	CATATCTACGTTCTGGAGGAGTAGAAGCTGACTATTGAGACGAATGGCTTCTCTACTA											

MVAD9muD10mu

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
MVAD9muD10mu Clone	AACCTTACTAGGCAGCAAAATGCTCTAGATAAATCTGAACTCAACCGGTGCAGACGATTTGGTGGATCTATGGAAATCCAAATGATTAACCTATCTTTGAAATATACATTTTTATGATCCGATCTGTAGAAATATAGAAATATGATAGTCCATCATCGTGTTTTTGGCTCTCATAGAACTATATTTTTCTT																					
Consensus	AACCTTACTAGGCAGCAAAATGCTCTAGATAAATCTGAACTCAACCGGTGCAGACGATTTGGTGGATCTATGGAAATCCAAATGATTAACCTATCTTTGAAATATACATTTTTATGATCCGATCTGTAGAAATATAGAAATATGATAGTCCATCATCGTGTTTTTGGCTCTCATAGAACTATATTTTTCTT																					
MVAD9muD10mu Clone	201	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	
Consensus	ATCCCAATGAAACAGATTAATCTCCAGAGTATTTGACACATCTATCAAGTGTGGATCCATATCTCTCCCAATATACGTAGTGTATGACACATATTCATTTGGGGGAAACCCACCTATATATCTCCCTTAAATATATCTTACTAGTTTCCAGTGTCTGGATAGTGGTGGTTCCG																					
MVAD9muD10mu Clone	401	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	
Consensus	ACTCATATATATGATGCTCAACCGCTTCATCGCGCTTAGAAATGCTTTTTAGTTCTATATTAATAGGAGATGTTGTCGGCATAGTAAATGAAATGATACCTGTTTAAATAGCTCTTAGTATGGGATACATGGATGAGGAGTATTTGAACCTCAGAGATTAATATCTATTAACGAT																					
MVAD9muD10mu Clone	601	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800	
Consensus	AAAGATATCCCAAGTCAAAAGACCGCATGTTTGTGCGGTATACACAGTGAACGGATCCGTTAATAGGAGCTAGAGAACTCATCCGATCCAGCGATATATCTCAACAAATCAGATTCATCTTTAGAGTATCCCAACATTAACGGTTATGATCAACATGAACTAGAGAACTTTAGAC																					
MVAD9muD10mu Clone	801	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	
Consensus	GGTTGAAAGAAAGTCTATCAACGATATCGATCCACCTTAGAGGTTAATATTTGGTGGTAACTAGATAAAGGAACTATTAAGATGTTTAGAGAGAAATTAACAGGAAAGCTAGTACGATATACAGTAAAGAAATTTGGAATGATATTTAAACCTACACACGGGAAATATTTAATAAA																					
MVAD9muD10mu Clone	1001	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200	
Consensus	GTATATATAGTATTGCAATGGCGTGTATTAATCAATCGTTGGAGGATTTATCGCATCTAGTATTTACATGTAGAAATAGAAATTAACATTAATGATGTTATACGACGATAAATACGATATCTGTCTATATTTAATATGCTAGTTAATAGTAAATGAACTTTACAGATCTAGTAAATAGT																					
MVAD9muD10mu Clone	1201	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	
Consensus	CAGATATTAAATATAGTATAGCAGCTAGCTAAGCTTATTTGCGAGGATGACTCAAAATTTACACTCAGCGCATCTGTTAAACAAATGCTATGGTGTCAAAAGCAGATTCGGTCTGCTATTTAATACTGATACAAATATAGTATGTAACAGCAGATAGTTTCTCTATTCTGAATTAATAG																					
MVAD9muD10mu Clone	1401	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600	
Consensus	AACTAGAAACATGCTAGAAAGAAACGATTTTCTGAATATTTCCAAATTTGTCCTAAACAGGAAAGGATATCTATCTGATTTTTTCTAGATCCAGCTACTACTGATATGATAGAAATGATGCTTTTTATCCGGGTGGCATACCAAAAGGGGTGAGAAATGTCAGAGGTTTATCCAGGAAATTAAG																					
MVAD9muD10mu Clone	1601	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800	
Consensus	AAGAGGTTTATATAGCAATCTTTGATTCATAGACACTCGGTTTTTATCATGGCATTATAGAAATACCAATATTAATAAATTTTTGAGGATCTCTTTGTCGGAGAAATCTTTAAGAGTATCAATCATGAAATCAGGATCTAATATTTTAGATCCGAATCA																					
MVAD9muD10mu Clone	1801	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000	
Consensus	GGTAATGGACTCCAAATACGAATTCGAAATATGCTCTAGATCTGCAAACTCAAAATGTTATGGCCATAGAGGATGTTATACGAATCATTAATAAATTAACCTGAGGATGATGATAGAAATATAAATTAATTTACCATCGTGTATTTTTATACGGGATGTCGGCATATCATGATAGTATCCGCTACAT																					
MVAD9muD10mu Clone	2001	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080	2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200	
Consensus	CGTATCTGACCATCTACGCTTTAAATCTCTATTTATGACATTAATCTAGAAATGGAAATACCAATATAGTACCCTCAATAGTTTTATGGTAAATTTTTTATAGCAATAGATCATGGCTTGAACACAGGTTTCCAAACGGGATGTCGATCGGTTGAGAGTCTTTTCAATAGCATGATC																					
MVAD9muD10mu Clone	2201	2210	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310	2320	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390	2400	
Consensus	CATCTAATGATGATGTTTAAACACTCAAACTATGGCAAACTCTTTGATTTGCTTTGAATGATTTCAATAGGCTCTCGCTACAGTAGGCATACCAATAGATATCTAGCCATTAATAAGTGACGTTTACATATCTACGTTGGAGGATGAGACGTTGACTATTGAGCAATGGCTCTCCACTATCTG																					
MVAD9muD10mu Clone	2401	2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480	2490	2500	2510	2520	2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600	
Consensus	ACGAGAGACGCTCGTCCATGTCATATCAAAATGAGATATCATTAATGAGAAAACTAATACCTCGCTCCACTAGAGAGAAATACGATGTTTAAATGATCTCCGTTAGTGTGTTGATCTGGTAAACTCAGCCACCGCTTGAATCTAGTATCTTTGTTCTAGATGAGAACTCATATAGAGATAC																					
MVAD9muD10mu Clone	2602607  -----																					
Consensus	CAAGAC CAAGAC CAAGAC																					



MVAΔB18

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
MVAΔB18 Clone	CGTTGGTGGATCAACTCCATCTTACCTATCTTCGATATAAATCATTTGAGAARTTCATATCCTACTGTATACCTTTAGATGACACATTTTACATAGACACGTTAGG											
Consensus	CGTTGGTGGATCAACTCCATCTTACCTATCTTCGATATAAATCATTTGAGAARTTCATATCCTACTGTATACCTTTAGATGACACATTTTACATAGACACGTTAGG											
	111	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
MVAΔB18 Clone	AATCGCAATTC TAAACGATATCGATACGCATTTTC A A A A T A C A T G T C G T T G A T A A A T A C G A T G G T A T A A T A A C T A A A A A A A A A A T T G C T C A A A C T A T C											
Consensus	AATCGCAATTC TAAACGATATCGATACGCATTTTC A A A A T A C A T G T C G T T G A T A A A T A C G A T G G T A T A A T A A C T A A A A A A A A A A T T G C T C A A A C T A T C											
	221	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
MVAΔB18 Clone	C A C T G T T C T A G A C A C T A C A C T A T A T G C A G T T T A A G A T G C C A T A A T C G A A A A A G T T A G A G A G A T A C C T C A C G A G T T A A A A A A T A T A A T A A C G A T A A G C C T T T A A A A											
Consensus	C A C T G T T C T A G A C A C T A C A C T A T A T G C A G T T T A A G A T G C C A T A A T C G A A A A A G T T A G A G A G A T A C C T C A C G A G T T A A A A A A T A T A A T A A C G A T A A G C C T T T A A A A											
	331	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440
MVAΔB18 Clone	T A T A T T C T A A T A T A T G A A T G A G A G A T A C C T T A A T G T A T A T A T A A A G A T A T G A C G T G C A A A G G T A T A T G A T A A A C T A T T C C T G T T T C A C A G A T A A A A T T G T C T A											
Consensus	T A T A T T C T A A T A T A T G A A T G A G A G A T A C C T T A A T G T A T A T A T A A A G A T A T G A C G T G C A A A G G T A T A T G A T A A A C T A T T C C T G T T T C A C A G A T A A A A T T G T C T A											
	441	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550
MVAΔB18 Clone	C T A C A T T A C T A C C T C A G A A A T T A T A C G A A A T T A T A C A T G T G A C A A A T A A C G A T C T T A T A A T A T A T C G T A T C C A C C T A C C A A A G T A T A G T G T A T T T T C T C A											
Consensus	C T A C A T T A C T A C C T C A G A A A T T A T A C G A A A T T A T A C A T G T G A C A A A T A A C G A T C T T A T A A T A T A T C G T A T C C A C C T A C C A A A G T A T A G T G T A T T T T C T C A											
	551	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	660
MVAΔB18 Clone	T G C G A T G T G T A A A A A A A C T G A T A T T A T A A A T A T T T A G T G C C G T A T A A T G A G A T G A C G A T G A A A A T G A T G G T A C A T A T A T T C G T A C A T A T T G T A T T G C T											
Consensus	T G C G A T G T G T A A A A A A A C T G A T A T T A T A A A T A T T T A G T G C C G T A T A A T G A G A T G A C G A T G A A A A T G A T G G T A C A T A T A T T C G T A C A T A T T G T A T T G C T											
	661	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770
MVAΔB18 Clone	A T T C C A C A G T T A C C C A T A G A C A T C G A A A T G A A T C A C A G A A T T C T C A A T A A A T G A G A G A T A C T T A C C A G C T A A A G A C T C T A A A T G G T G A A T C C A G C A T G T A T G T											
Consensus	A T T C C A C A G T T A C C C A T A G A C A T C G A A A T G A A T C A C A G A A T T C T C A A T A A A T G A G A G A T A C T T A C C A G C T A A A G A C T C T A A A T G G T G A A T C C A G C A T G T A T G T											
	771	780	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880
MVAΔB18 Clone	T C G G A G G C A C A A T G A A T G A T A T A G C C G C T A G G A G A G C C A T C A G C G C A A A G T G C T C C T A T T A G A G A C A G C T T T A T C G C A C A G A T A T A A G A C T A T G T G G T A A A											
Consensus	T C G G A G G C A C A A T G A A T G A T A T A G C C G C T A G G A G A G C C A T C A G C G C A A A G T G C T C C T A T T A G A G A C A G C T T T A T C G C A C A G A T A T A A G A C T A T G T G G T A A A											
	881	890	900	910	920	930	940	950	960	970	980	990
MVAΔB18 Clone	T G G G A G A G G C T A G A A A A A A T A G A C G G C A C A G G T T C T A A T A A A C G T T A A A C A T G G T A T T A T G G A T A G C C A C T A T A C A T C A A A T T C A G T A A C C G T A G G T A T T T											
Consensus	T G G G A G A G G C T A G A A A A A A T A G A C G G C A C A G G T T C T A A T A A A C G T T A A A C A T G G T A T T A T G G A T A G C C A C T A T A C A T C A A A T T C A G T A A C C G T A G G T A T T T											
	991	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
MVAΔB18 Clone	G T G T A C C G T A A C T A C A A A A A T G G T G A C T G T G T T C A G G G T A T A G T T A G A T C T A T T A A A A A A C C T C C T C A T G C A T T C C A A A A A C A T A T G A A C T A G G T A C T C A T G A T A											
Consensus	G T G T A C C G T A A C T A C A A A A A T G G T G A C T G T G T T C A G G G T A T A G T T A G A T C T A T T A A A A A A C C T C C T C A T G C A T T C C A A A A A C A T A T G A A C T A G G T A C T C A T G A T A											
	1101	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200	1210
MVAΔB18 Clone	A G T A T G G C A T A G A C T T A C T G T G G A A T C T T A C C G A A A C A T T A T A A T A A T A A C T T G G T A A A A G A T A A A G G A A T T A A T A T C G A C G A T A T A A G T A T T C A C A A											
Consensus	A G T A T G G C A T A G A C T T A C T G T G G A A T C T T A C C G A A A C A T T A T A A T A A T A A C T T G G T A A A A G A T A A A G G A A T T A A T A T C G A C G A T A T A A G T A T T C A C A A											
	1211	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310	1320
MVAΔB18 Clone	A C G G A A A A A A A A T A A T T A T C A T A A T C C A G A G T T A G A G A T A G T G G A G A T A C A C T G T T A C G T T C A T T A C G A C G A C G T A G A A T C A A A A T A C T T A C G G T T A											
Consensus	A C G G A A A A A A A A T A A T T A T C A T A A T C C A G A G T T A G A G A T A G T G G A G A T A C A C T G T T A C G T T C A T T A C G A C G A C G T A G A A T C A A A A T A C T T A C G G T T A											
	1321	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430
MVAΔB18 Clone	T A C C G T C G A A G A C C A C A G G T T A A A C T A A T A C T A G A T C C A A A A T C A A C G T A A C G A T A G G A G A C C T G C C A A T A T A A C A T G C A C T G C T G T G C A A C G T A T T T G A T T											
Consensus	T A C C G T C G A A G A C C A C A G G T T A A A C T A A T A C T A G A T C C A A A A T C A A C G T A A C G A T A G G A G A C C T G C C A A T A T A A C A T G C A C T G C T G T G C A A C G T A T T T G A T T											
	1431	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540
MVAΔB18 Clone	G A C G A T G A C T G A T T G A A T G G G A A A A T C C A T C C G G A T G C T T A T A G G A T T C G A T T T G A T G T A C T C T G T T T A A C T A G T A G A G G C G G T A C C G A G G C G A C C T T G T A											
Consensus	G A C G A T G A C T G A T T G A A T G G G A A A A T C C A T C C G G A T G C T T A T A G G A T T C G A T T T G A T G T A C T C T G T T T A A C T A G T A G A G G C G G T A C C G A G G C G A C C T T G T A											
	1541	1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650
MVAΔB18 Clone	C T T T G A A A A T G T T A C T G A G A A T A T A T A G G T A A T A C A T A A A T G T C G T G G A C A C A C T A T T A T T T G A A A A A A C C T T A C A C T A C A G T A G T A T T G G A G T A A A T A C A C A											
Consensus	C T T T G A A A A T G T T A C T G A G A A T A T A T A G G T A A T A C A T A A A T G T C G T G G A C A C A C T A T T A T T T G A A A A A A C C T T A C A C T A C A G T A G T A T T G G A G T A A A T A C A C A											
	1651	1660	1670	1680	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760
MVAΔB18 Clone	A T G C A T T T T A T A T A C A T T A C T G A A T A A T T A T A T T A T T A T A T C G T A T T G T G C T A A A C G C G A C T A T C A G G T A T T G T A T C T A C C G A T A G A A C A T A T A A A T											
Consensus	A T G C A T T T T A T A T A C A T T A C T G A A T A A T T A T A T T A T T A T A T C G T A T T G T G C T A A A C G C G A C T A T C A G G T A T T G T A T C T A C C G A T A G A A C A T A T A A A T											
	1761	1770	1780	1790	1800	1810	1820	1831				
MVAΔB18 Clone	G T A G A C T T A T T A A C A G T T G T G A A A A T A C A G A T C C A A T A G A T G G A T G A C G G C T T A G A A A T G A G											
Consensus	G T A G A C T T A T T A A C A G T T G T G A A A A T A C A G A T C C A A T A G A T G G A T G A C G G C T T A G A A A T G A G											

MVAB18

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180  
 MVAB18 C.1one CGTTGGTGGATCAACTCCATCTACCTATCTTCGATATAAATCATTGGAGAAATTCATCTACTGTATACCTTTACARTAGACACGTTAGGAATCGCAATCTAAACGATCGATACGCATTTCAAAATACATGTCGTTGATARAATACGATGGTATA  
 Consensus CGTTGGTGGATCAACTCCATCTACCTATCTTCGATATAAATCATTGGAGAAATTCATCTACTGTATACCTTTAGATGACACATTTACARTAGACACGTTAGGAATCGCAATCTAAACGATCGATACGCATTTCAAAATACATGTCGTTGATARAATACGATGGTATA

181 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360  
 MVAB18 C.1one TAACTAARTGTCTAARAAGAACAAATATGCTCAAACTATCCACTGTTCTAGACACTACACTATATGCGAGTTTAAAGATGCCAATTCGAAARAAGTTAGAGAGATACCTCAACGAGTTAARAARAATATAATACGATAGTCCCTTAAATATATTTAATATATGATGAGAGATACC  
 Consensus TAACTAARTGTCTAARAAGAACAAATATGCTCAAACTATCCACTGTTCTAGACACTACACTATATGCGAGTTTAAAGATGCCAATTCGAAARAAGTTAGAGAGATACCTCAACGAGTTAARAARAATATAATACGATAGTCCCTTAAATATATTTAATATATGATGAGAGATACC

361 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540  
 MVAB18 C.1one TTAATGTATATATAAAGATATGACGTGTCAAAAGGTATATGATAAATATTTCCCTGTTTTACAGATAAAAATTTGCTACTAATCACTACTCCAGAAATATATACGAAATATATACATGCTGACAAATTAACGATCTTATATATATCGTATCCACCACCAAGATAGTGT  
 Consensus TTAATGTATATATAAAGATATGACGTGTCAAAAGGTATATGATAAATATTTCCCTGTTTTACAGATAAAAATTTGCTACTAATCACTACTCCAGAAATATATACGAAATATATACATGCTGACAAATTAACGATCTTATATATATCGTATCCACCACCAAGATAGTGT

541 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720  
 MVAB18 C.1one ATTTTTCTCATGCGATGTGTAAAAAARCTGATATATATAAATATTTAGTCCCGTATATAAAGATGACGATGAAATGATGGTACATATATTTCTGTATCATTTATTTGCTATTCCACAGTTACGCCATAGACATCGAAATGAATCAAGAAATCTTCAATAAATGAG  
 Consensus ATTTTTCTCATGCGATGTGTAAAAAARCTGATATATATAAATATTTAGTCCCGTATATAAAGATGACGATGAAATGATGGTACATATATTTCTGTATCATTTATTTGCTATTCCACAGTTACGCCATAGACATCGAAATGAATCAAGAAATCTTCAATAAATGAG

721 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900  
 MVAB18 C.1one AGATACTTACCAGCTAAGACCTAATGTTGAAATCCAGCATGATGTTCCGAGGACAACTGATGATATAGCCGCTTAGGAGAGCCATTCAGCGCAAGGTGCTCCCTATTGAGACAGCTTTTATCGCACAGATARAAGACTATGTTGTTAATGGGAAAGGGTAGAAAAAA  
 Consensus AGATACTTACCAGCTAAGACCTAATGTTGAAATCCAGCATGATGTTCCGAGGACAACTGATGATATAGCCGCTTAGGAGAGCCATTCAGCGCAAGGTGCTCCCTATTGAGACAGCTTTTATCGCACAGATARAAGACTATGTTGTTAATGGGAAAGGGTAGAAAAAA

901 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080  
 MVAB18 C.1one TAGACGGCGACAGGTTCTAATAAACGTTTAAACATGGTGATTTATGGATAGCCAACTATACATCTAATTCAGTAAACCGTAGGATTTGTCACCGTAACTACAAGAAATGGTGACTGTGTCAGGGTATAGTATAGTCTCATATAGAAAACCTCCCTCATGCATTCCAAACATA  
 Consensus TAGACGGCGACAGGTTCTAATAAACGTTTAAACATGGTGATTTATGGATAGCCAACTATACATCTAATTCAGTAAACCGTAGGATTTGTCACCGTAACTACAAGAAATGGTGACTGTGTCAGGGTATAGTATAGTCTCATATAGAAAACCTCCCTCATGCATTCCAAACATA

1081 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260  
 MVAB18 C.1one TGAACATAGGTACTCATGATAGTATGGCATAGACTTATACGTGGAAATCTTTACGCAAAACATTATATAATATACTTGGTATAAAGATATAAAGAAATTAATATCGACGACATTAGTATTACAAACGGGAAGGAAATTAATATTCATARTCCAGAGTTAGAGATAGCGGAG  
 Consensus TGAACATAGGTACTCATGATAGTATGGCATAGACTTATACGTGGAAATCTTTACGCAAAACATTATATAATATACTTGGTATAAAGATATAAAGAAATTAATATCGACGACATTAGTATTACAAACGGGAAGGAAATTAATATTCATARTCCAGAGTTAGAGATAGCGGAG

1261 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440  
 MVAB18 C.1one ATACGACTGTTACGTTCCATACGACGAGCTTAGAATCAGAAATGATATCGTAGTATCAGATGTAAATACTTACGGTATACCGTCACAGACCCAGGTTAACTATATCTAGTCCAAAATCAACGTACGATAGGAGAACCTGCCAATATACATGCATGCTGTGCACGCT  
 Consensus ATACGACTGTTACGTTCCATACGACGAGCTTAGAATCAGAAATGATATCGTAGTATCAGATGTAAATACTTACGGTATACCGTCACAGACCCAGGTTAACTATATCTAGTCCAAAATCAACGTACGATAGGAGAACCTGCCAATATACATGCATGCTGTGCACGCT

1441 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610 1620  
 MVAB18 C.1one ATTATTGATGACGATGACTGATTGAATGGGAAATCCATCCGGATGGCTTAGAGGATCGATTTGATGTATACCTGTTTTAACTAGTAGAGGCGGTTACCAGGGCGACCTTGACTTTGAAATGTTACTGAGAAATATATAGGTAATACATATAATGCTGGACACACTA  
 Consensus ATTATTGATGACGATGACTGATTGAATGGGAAATCCATCCGGATGGCTTAGAGGATCGATTTGATGTATACCTGTTTTAACTAGTAGAGGCGGTTACCAGGGCGACCTTGACTTTGAAATGTTACTGAGAAATATATAGGTAATACATATAATGCTGGACACACTA

1621 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800  
 MVAB18 C.1one TTTATTTGAAAAACCTTACACACTACAGTAGTATGGAGGATATAAGGATGACGATGACAAATAAATACAAACACTTTTATATACATACAGTAATATATATATTTATATATATCGTATTTGCTATAACCGGACTATAGGTATTTGATCTACCAGATAGAGAACATAT  
 Consensus TTTATTTGAAAAACCTTACACACTACAGTAGTATGGAGGATATAAGGATGACGATGACAAATAAATACAAACACTTTTATATACATACAGTAATATATATATTTATATATATCGTATTTGCTATAACCGGACTATAGGTATTTGATCTACCAGATAGAGAACATAT

1801 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980  
 MVAB18 C.1one AAATGTAGACTCTATTAACAGTTGTTGAAATATCAGATCTTAATAGATGTTGATGATCCGCTTTAGAAATGAGTTCATTAATAATGATGATACACGGAACTATTTATATAATATACATTTGCTGTTAGTATAATTTGATCCACGGAGAACACCAACAGTTACTCCAAAT  
 Consensus AAATGTAGACTCTATTAACAGTTGTTGAAATATCAGATCTTAATAGATGTTGATGATCCGCTTTAGAAATGAGTTCATTAATAATGATGATACACGGAACTATTTATATAATATACATTTGCTGTTAGTATAATTTGATCCACGGAGAACACCAACAGTTACTCCAAAT

1981 1990 2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160  
 MVAB18 C.1one ACACACATATAATATATATCGATGATAGCACTACTGAAGAACTACAGTGACTCCTCATATGGATCCCATCGATGATACATGATTAATAACTTTCCGAATAGCTTTTAAATTTGATTAATATGAAAAACTATGCTATGCCGATGATGATACGATCTAGATTTATCTC  
 Consensus ACACACATATAATATATATCGATGATAGCACTACTGAAGAACTACAGTGACTCCTCATATGGATCCCATCGATGATACATGATTAATAACTTTCCGAATAGCTTTTAAATTTGATTAATATGAAAAACTATGCTATGCCGATGATGATACGATCTAGATTTATCTC

2161 2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2248243  
 MVAB18 C.1one TAGCGAGAGATGTCGTTAGAACTTTATCAACGAAATATCGATAACATGTCATTTATACGTTAAAGTCTGTCGGCTTCTC  
 Consensus TAGCGAGAGATGTCGTTAGAACTTTATCAACGAAATATCGATAACATGTCATTTATACGTTAAAGTCTGTCGGCTTCTC

MVAB18rev

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
MVAB18rev Clone	CGTTGGTGGATCAACTCCATCTCTACCTATCTTCGATATAAATCATTGAGAAATTCATATCCTACTGTATACCTTTAGATGACACATTTTACATAGACACGTTAGG											
Consensus	CGTTGGTGGATCAACTCCATCTCTACCTATCTTCGATATAAATCATTGAGAAATTCATATCCTACTGTATACCTTTAGATGACACATTTTACATAGACACGTTAGG											
MVAB18rev Clone	111	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
Consensus	AATCGCAATTTCAAACGATCGATACGCATTTCAAATACATGTCGTTGATAAATACGATGGTATATAACTAATGTCATARAAGAACATATTTGCTCAAACTATC											
MVAB18rev Clone	221	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
Consensus	CACTGTTCTAGACACTACACTATATGCAGTTTAAAGATGCCAATTCGAAAAGTTAAGAAGATACCTCAACGAGTTAAAAAATATAAATACGATAAGTCCCTTAAAA											
MVAB18rev Clone	331	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440
Consensus	TATATCTAATATATGAATGAGAGATACCTTAATGTATATATAAGATATGTACGTGTCARAGGTATATGATAAATCTTTCCGTGTTTCACAGATAAAATTTGCTA											
MVAB18rev Clone	441	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550
Consensus	CTACATTTACTACCTTCAGAAATATATACGAAATATATACATGCTGCAATTAACGATCCTTATAATATATCGATCCACCTACCAAAAGTATAGTTGATTTTCTCA											
MVAB18rev Clone	551	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	660
Consensus	TGCATGTGTGTAARAAACATGATATATATAAATTTTAAAGTATGATGAAATGATGGTACATATATATTCGTATCATTTGTTATTGCT											
MVAB18rev Clone	661	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770
Consensus	ATTCCACAGTTACGCCATAGACATCGAAATGAATCACAGATCTTCAATAAATGAGAGATCTACCAGCTAAGACTCTAATGGTGAATCCAGCATGTATGT											
MVAB18rev Clone	771	780	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880
Consensus	TCGGAGGCACATGATGATATAGCCGCTCAGGAGAGCCATTACGCGAAGTGTCTCTATTGAAGACAGTCTTTATCGCACAGATARAAGACTATGTTGTTAAA											
MVAB18rev Clone	881	890	900	910	920	930	940	950	960	970	980	990
Consensus	TGGGAGGGCTGAAAAAATAGACGGCCACAGGTTCTAATAACGCTGTTAAACATGGTGATTTATGGATAGCCACTATACATCTAATTCAGTACCCGTAGGTATTT											
MVAB18rev Clone	991	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
Consensus	GTGACCGTACACAAAGATGGTACTGTGTTCAAGGATAGTGTAGATCTCATATTAARAACTCCTTCATGCAATCCAAAAACATATGACTAGGTACTCATGATA											
MVAB18rev Clone	1101	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200	1210
Consensus	AGTATGGCATAGACTTATACGTGGAAATCTTACGCAAAACATTATATATATACCTGGTATAAAGATATAAGGAATTAATATCGCGATATTAAGTATTCACAA											
MVAB18rev Clone	1211	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310	1320
Consensus	ACGGGAAGAAATTAATTTATCATATCCAGAGTTAGAGATAGTGGAGATACACTGTACGTTTATTACGACGCGTTAGAAATCAAGATGTAARACTTACGGTTA											
MVAB18rev Clone	1321	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430
Consensus	TACCGTCGACAGCCACAGGTTAAACTAATACTAGTCCAAAATCACGTAACGATAGGAGAACCTGCCAATATACATGCACTGCTGTGTCACAGCTATTATTGATT											
MVAB18rev Clone	1431	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540
Consensus	GACGATGACTGATTGAATGGGAATCCATCCGGATGGCTTATAGGATTCGATTTGATGTACTCTGTTTAACTAGTAGAGGGCGGTATACCCGAGGCGACCTTGT											
MVAB18rev Clone	1541	1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650
Consensus	CTTTGAAATGTTACTGAGAAATATAGGTAAATACATTAATGTCGTTGACACCACTATTATTTGAAAAACCCCTTCAACTACAGTATGATGGAGTAATACACA											
MVAB18rev Clone	1651	1660	1670	1680	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760
Consensus	ATGCATTTTATATACATTAAGTAAATTAATTTATTTAT											
MVAB18rev Clone	1761	1770	1780	1790	1800	1810	1820	1831				
Consensus	GTAGACTCTATTAACAGTTGTGTAARATACGATCCTAATAGATGGATGACGGCTTAAAGATGAG											

WRΔB18

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90  
 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|  
 CONTIG CGCGCARGCTTCGATACGCATTTTCAAATACATGTCGTTTGATAAATACGATGGTATAAATAAATAAATGTCATAAAGAAACAATATTGC  
 FLANCO1 CGTATARGCTTCGATACGCATTTTCAAATACATGTCGTTTGATAAATACGATGGTATAAATAAATAAATGTCATAAAGAAACAATATTGC  
 Consensus CGcacAARGCTTCGATACGCATTTTCAAATACATGTCGTTTGATAAATACGATGGTATAAATAAATAAATGTCATAAAGAAACAATATTGC

91 100 110 120 130 140 150 160 170 180  
 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|  
 CONTIG TCAAACTATCCACTGTTCTAGACACTACACTATATGCGAGTTTAAAGATGCCATAATTCGAAAAGTTAAGAGATACCTCACCGAGTTAA  
 FLANCO1 TCAAACTATCCACTGTTCTAGACACTACACTATATGCGAGTTTAAAGATGCCATAATTCGAAAAGTTAAGAGATACCTCACCGAGTTAA  
 Consensus TCAAACTATCCACTGTTCTAGACACTACACTATATGCGAGTTTAAAGATGCCATAATTCGAAAAGTTAAGAGATACCTCACCGAGTTAA

181 190 200 210 220 230 240 250 260 270  
 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|  
 CONTIG AAAAATATAAATACGATARGTCCTTTAAATATATTTCTAATATTATGATGAGAGATACCTTAATGTATATTATAAAGATATGTACGTGT  
 FLANCO1 AAAAATATAAATACGATARGTCCTTTAAATATATTTCTAATATTATGATGAGAGATACCTTAATGTATATTATAAAGATATGTACGTGT  
 Consensus AAAAATATAAATACGATARGTCCTTTAAATATATTTCTAATATTATGATGAGAGATACCTTAATGTATATTATAAAGATATGTACGTGT

271 280 290 300 310 320 330 340 350 360  
 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|  
 CONTIG CAARGGTATATGATAAATATTTCTGTTTTACAGATAAAATTTGCTACTAACATTACTACCTTCAGAAATTATATACGAATATTAT  
 FLANCO1 CAARGGTATATGATAAATATTTCTGTTTTACAGATAAAATTTGCTACTAACATTACTACCTTCAGAAATTATATACGAATATTAT  
 Consensus CAARGGTATATGATAAATATTTCTGTTTTACAGATAAAATTTGCTACTAACATTACTACCTTCAGAAATTATATACGAATATTAT

361 370 380 390 400 410 420 430 440 443  
 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|  
 CONTIG ACATGCTGACAAATTAACGATCTTTATAATATATCGTATCCACCTACCAAGTATAGTTGTATTTTTCTCATGCGGTCGACATC  
 FLANCO1 ACATGCTGACAAATTAACGATCTTTATAATATATCGTATCCACCTACCAAGTATAGTTGTATTTTTCTCATGCGGTCGACATC  
 Consensus ACATGCTGACAAATTAACGATCTTTATAATATATCGTATCCACCTACCAAGTATAGTTGTATTTTTCTCATGCGGTCGACATC

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90  
 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|  
 CONTIG CTCGAAT-TCGCGGCCGCCAATGCATTTTATATACATTACTGAATAATTATTATTATTATTATTATATCGTATTTGTGCTATAACGCGACT  
 FLANCO-2 GCAAAATATAGCGGCCGCCAATGCATTTTATATACATTACTGAATAATTATTATTATTATTATTATATCGTATTTGTGCTATAACGCGACT  
 Consensus .gCaAAT.TaGCGGCCGCCAATGCATTTTATATACATTACTGAATAATTATTATTATTATTATTATATCGTATTTGTGCTATAACGCGACT

91 100 110 120 130 140 150 160 170 180  
 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|  
 CONTIG ATCTAGGTATTTGTATCTCACCGATAGAGAACATATAAATGTAGACTCTATTAACAGTTGTGTAARAATATCAGATCCTAATGCATGTTA  
 FLANCO-2 ATCTAGGTATTTGTATCTCACCGATAGAGAACATATAAATGTAGACTCTATTAACAGTTGTGTAARAATATCAGATCCTAATGCATGTTA  
 Consensus ATCTAGGTATTTGTATCTCACCGATAGAGAACATATAAATGTAGACTCTATTAACAGTTGTGTAARAATATCAGATCCTAATGCATGTTA

181 190 200 210 220 230 240 250 260 270  
 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|  
 CONTIG TAGATGTGGATGTACGGCTTTACATGAGTACTTTTATAATTATAGATCAGTCARCGGAAATACAAGTATAGATACAACGGTTACTATCA  
 FLANCO-2 TAGATGTGGATGTACGGCTTTACATGAGTACTTTTATAATTATAGATCAGTCARCGGAAATACAAGTATAGATACAACGGTTACTATCA  
 Consensus TAGATGTGGATGTACGGCTTTACATGAGTACTTTTATAATTATAGATCAGTCARCGGAAATACAAGTATAGATACAACGGTTACTATCA

271 280 290 300 310 320 330 340 350 360  
 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|  
 CONTIG ATATTATTTATCTAGCGATTATGAAATATAAATGAATATTATTATGATGATTATGATAGAACTGGTATGAACAGTGAGAGTGATAATAT  
 FLANCO-2 ATATTATTTATCTAGCGATTATGAAATATAAATGAATATTATTATGATGATTATGATAGAACTGGTATGAACAGTGAGAGTGATAATAT  
 Consensus ATATTATTTATCTAGCGATTATGAAATATAAATGAATATTATTATGATGATTATGATAGAACTGGTATGAACAGTGAGAGTGATAATAT

361 370 380 390 400 410 420 430 434  
 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|  
 CONTIG ATCAATCAAAACAGATATGAATTCATGATGAACACAAGATCAAGTACACACTAGTAGGAGATCTGCCGG  
 FLANCO-2 ATCAATCAAAACAGATATGAATTCATGATGAACACAAGATCAAGTACACACTAGTAGGAGATCTTTACG  
 Consensus ATCAATCAAAACAGATATGAATTCATGATGAACACAAGATCAAGTACACACTAGTAGGAGATCTGCCGG