

MICHELLE PAULA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANÁLISE COMPARATIVA DA PRODUÇÃO DO *Vaccinia virus*
ANKARA MODIFICADO (MVA) EM DOIS SISTEMAS: CULTIVO
PRIMÁRIO DE FIBROBLASTOS DE EMBRIÃO DE GALINHA
VERSUS MEMBRANA CORIOALANTÓIDE DE OVOS
EMBRIONADOS DE GALINHA**

Belo Horizonte, Fevereiro de 2012

**Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG
Instituto de Ciências Biológicas- ICB
Departamento de Microbiologia
Laboratório de Virologia Básica e Aplicada- LVBA**

**ANÁLISE COMPARATIVA DA PRODUÇÃO DO *Vaccinia virus*
ANKARA MODIFICADO (MVA) EM DOIS SISTEMAS: CULTIVO
PRIMÁRIO DE FIBROBLASTOS DE EMBRIÃO DE GALINHA
VERSUS MEMBRANA CORIOALANTÓIDE DE OVOS
EMBRIONADOS DE GALINHA**

Michelle Paula Silva

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós- Graduação
do Departamento de
Microbiologia do Instituto de
Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas
Gerais para obtenção do título
de Mestre .

Orientador: Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

Belo Horizonte, Fevereiro de 2012



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

ALUNA: MICHELLE PAULA SILVA N° matrícula: 2010668353

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia – NÍVEL MESTRADO

Defesa de dissertação: 29 de fevereiro de 2012

Título: “Análise comparativa da produção do *Vaccinia virus* Ankara Modificado (MVA) em dois sistemas: cultivo primário de fibroblastos de embrião de galinha versus membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha”.

A Dissertação foi submetida à apreciação do Dr. André Tavares da Silva Fernandes

Prof. Jônatas Santos Abrahão
Examinador

Aprovado:

Profª. Giliane de Souza Trindade
Examinador

Aprovado:

Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca
Orientador

Aprovado:

Prof. Cláudio Antônio Bonjardim
Coordenador

Agradecimentos

Foi um privilégio desenvolver o meu projeto, aprender entre as várias tentativas de erros e ter tantos parceiros.

Como é bom agradecer e compartilhar a minha alegria com todos vocês!!!!

Agradeço ao meu orientador, pela confiança, pela paciência com os meus erros, por ser fonte criativa perante as dificuldades. A procura da sua orientação não foi ao acaso, e sim em resposta ao excelente professor da especialização. Depois da convivência no laboratório, vi que você ensina pesquisa com toda a sua simplicidade e humildade. Obrigada por ter feito parte do laboratório!!

Sou agradecida à professora Erna, pela atenção e apoio na avaliação do meu projeto. Valeu muito a pena ter recebido os seus conselhos.

Professor Gustavo Menezes, Departamento de Morfologia, obrigada pelas dicas valiosas! Enriqueceram meu trabalho.

Professores Bira e Ana Maria, Departamento de Física, obrigada por abraçar o meu projeto. Aninha, adorei as minhas imagens...

Professora Edel, sempre a admirei. Pelo pouco tempo de convivência no laboratório pude ver que além de excelente professora, é dedicada e mãezona de todos!! Obrigada pelos artigos, pelas pesquisas inerentes ao meu projeto.

Jônatas e Iara, laboratório de vírus, obrigada pela disponibilidade em me ajudar com meus experimentos!

Recordo-me da Tânia Mara a me ensinar o cultivo de células. Eu não sabia nada. Que desespero, que medo de errar. Começar nunca é fácil

Leandro Vida, sempre muito prestativo! Me ensinou até que eu pudesse caminhar sozinha com meu projeto.

Leandro Chinália e Luis, companheiros de disciplinas, seminários, das angústias e alegrias. Convivi com vocês por estes 2 anos e tenho a plena certeza de que vocês irão brilhar por onde passar. Recebi uma lição de dedicação, competência e, sobretudo, amizade. Infelizmente cada um começa a trilhar um novo caminho. E Leandro, obrigada por ter abusado tanto da sua câmera fotográfica. Amigo é pra essas coisas.

Fabis, obrigada pela disposição em sempre me ajudar.


Tiago, sempre atencioso. Obrigada pelas dicas. Te acompanhar nas disciplinas valeu muito a pena. O meu projeto ganhou imagens lindas!!!

Jaque, obrigada por me ensinar os gráficos!

Em especial, agradeço a minha família, fonte de todas as minhas forças. Os meus pais são o meu exemplo de vida. Dedico este trabalho a vocês: pai, mãe, Denner e Kleber.

Á todos do laboratório, agradeço pela companhia, amizade e apoio!

Dedicatória



Dedico este trabalho aos meus
pais, Ireny e Francisco, e aos meus
irmãos, Kleber e Denner!!!!
Amo vocês!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Família <i>Poxviridae</i>	2
1.1.1. Classificação	2
1.2. Gênero <i>Orthopoxvirus</i>	2
1.3. Aspectos gerais da biologia dos poxvírus	6
1.3.1. Morfologia	6
1.3.2. Genoma	8
1.3.3. Ciclo de multiplicação.....	9
1.3.4. Mecanismo de evasão dos Poxvírus	13
1.4. <i>Vaccinia virus</i>	15
1.4.1. Histórico da vacinação	16
1.4.2. Amostras vacinais	18
1.5. MVA	20
1.5.1. Origem	20
1.5.2. Ciclo de multiplicação em células não permissivas	21
1.5.3. Uso do MVA como vacina	23
1.6. Ovos embrionados	25
1.6.1. Estrutura do ovo embrionado	25
1.6.2. Anexos embrionários, vias de inoculação viral e produção de vacinas	26
1.7. Anexo embrionário suscetível à multiplicação dos <i>Orthopoxvirus</i> : MCA	29

1.7.1. Origem, função e constituição	29
1.7.2. Aplicações na pesquisa	30
1.7.3. Isolamento e identificação de poxvírus	30
1.7.4. Característica dos pocks	31
1.8. Sistemas de cultivo: CEFs x MCA	33
1.8.1. Cultivo primário de CEFs	33
1.8.2. Inoculação na MCA	34
II. JUSTIFICATIVA	35
III. OBJETIVOS	38
3.1- Geral	39
3.2- Específicos	39
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1. Fluxograma de trabalho	41
4.2. Células e Vírus	42
4.2.1. Células Fibroblásticas de Embriões de Galinha (CEFs)	42
4.2.2. Amostra de vírus	43
4.3. Ovos embrionados	43
4.4. Multiplicação viral	43
4.5. Purificação Viral	44
4.6. Titulação viral.....	45
4.7. Sistemas de Cultivo	45
4.7.1. Infectividade viral em cultivo primário de CEFs	45
4.7.2. Infectividade viral na MCA	46
4.7.3. Construção de curvas ciclo único do vírus MVA multiplicado em CEFs e MCA	49
4.8. Infecção na MCA para determinar o modo de maceração	49
4.9. Titulação das amostras MCA	50
4.10. Ensaio de produtividade viral e detecção de pocks na MCA após diferentes títulos de infecção	50

4.11. Infectividade viral na MCA para detecção de pocks por três amostras de VACV..	50
4.12. Aquisição, processamento e análise das imagens	50
4.12.1. Microscopia confocal	51
4.12.2. Quantificação de fluorescência	51
4.13. Análises estatísticas	51
4.14. Processamento das amostras para análise histopatológica	53
V. RESULTADOS	54
5.1. Infecção na MCA para determinar do modo de maceração	55
5.2. Produtividade viral em cultivo primário de CEFs	55
5.3. Produtividade viral na MCA	58
5.4. Análise comparativa da multiplicação viral entre os sistemas de cultivo CEFs x MCA após infecção com 10^6 e 10^8 PFU	58
5.5. Correlação entre os títulos de inóculo de 10^1 a 10^8 PFU com a produtividade viral, desenvolvimento embrionário e detecção de pocks na MCA	60
5.5.1. Produtividade viral	60
5.5.2. Desenvolvimento embrionário	61
5.5.3. Detecção de pocks	61
5.6. Análise qualitativa da expressão de GFP em MCAs infectadas com mesmo título e tempo de infecção	62
5.7. Análise quantitativa da expressão de GFP do vírus MVA multiplicado na MCA	64
5.7.1. MCA infectada com 10^6 PFU	64
5.7.2. MCA infectada com 10^8 PFU	71
5.8. Infecção na MCA para detecção de pocks por três amostras de <i>Vaccinia virus</i>	77
5.9. Análises histopatológicas da MCA após infecção com 10^6 e 10^8 PFU	79
VI. DISCUSSÃO	79
VII. CONCLUSÃO	82
VIII. PERSPECTIVAS	84
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Lesões pustulares típicas da varíola	4
FIGURA 2: Lesões ulcerativas causadas por VACV	6
FIGURA 3: Morfologia e estrutura dos poxvírus	7
FIGURA 4: Representação esquemática da morfogênese do VACV	8
FIGURA 5: Representação esquemática das características estruturais e funcionais do genoma VACV, vírus protótipo da família <i>Poxviridae</i>	9
FIGURA 6: Modelos de penetração das partículas IMV e EEV	11
FIGURA 7: Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos poxvírus	13
FIGURA 8: Mecanismo de evasão dos poxvírus à resposta imune	15
FIGURA 9: Origem do MVA	21
FIGURA 10: Representação esquemática do ciclo de multiplicação do MVA em células não permissivas	22
FIGURA 11: Microscopia eletrônica do vírus MVA multiplicado em células HeLa e CEFs	22
FIGURA 12: Estrutura do ovo embrionado de galinha	26
FIGURA 13: Anexos embrionários e vias de inoculação	28
FIGURA 14: Membrana corioalantóide	29
FIGURA 15: Histologia da MCA	29
FIGURA 16: Perfil fenotípico de pocks produzidos por isolados de VACV	31
FIGURA 17: Pocks produzidos por diferentes espécies de <i>Orthopoxvirus</i>	31
FIGURA 18: Atividade dos heterófilos detectada apenas em pocks brancos	32
FIGURA 19: MCA aos 9 dias de desenvolvimento embrionário	34

FIGURA 20: Cultura de células fibroblásticas de embrião de galinha	43
FIGURA 21: Procedimentos de inoculação na MCA	48
FIGURA 22: Títulos virais obtidos por dois modos de maceração: nitrogênio líquido e areia autoclavada	55
FIGURA 23: Curvas de crescimento ciclo único do vírus multiplicado em CEFs após infecção com 10^6 e 10^8 PFU	56
FIGURA 24: Titulação viral obtida pela contagem de clones verdes fluorescentes do vírus multiplicado em cultivo de CEFs	57
FIGURA 25: Curvas de crescimento ciclo único do vírus multiplicado na MCA, após infecção com 10^6 e 10^8 PFU	58
FIGURA 26: Análise comparativa da multiplicação viral entre os sistemas de cultivo CEFs x MCA, após infecção com 10^6 e 10^8 PFU.....	59
FIGURA 27: Relação entre os títulos de inóculo de 10^1 a 10^8 PFU e produtividade viral na MCA	60
FIGURA 28: Aspecto de MCAs infectadas, acompanhadas com o desenvolvimento embrionário	61
FIGURA 29: Detecção de pocks na MCA	62
FIGURA 30: Análise qualitativa da expressão de GFP evidencia multiplicação viral restrita ao local da infecção	63
FIGURA 31: MCAs infectadas com 10^6 PFU	65
FIGURA 32: Análise qualitativa da expressão de GFP em MCAs infectadas com 10^6 PFU	67
FIGURA 33: MCAs infectadas com 10^8 PFU	72
FIGURA 34: Análise qualitativa da expressão de GFP em MCAs infectadas com 10^8 PFU.	73
FIGURA 35: Análise fenotípica de pocks produzidos por três amostras de VACV.....	78
FIGURA 36: Fotomicrografias de secções da membrana corioalantóica, H&E	80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Espécies de vírus do gênero <i>Orthopoxvirus</i> , hospedeiros naturais e distribuição geográfica	3
TABELA 2: Descrição de vacinas com <i>Vaccinia virus</i>	20
TABELA 3: Aplicações do MVA como vetor de vacina	24
TABELA 4: Propriedades biológicas dos pocks	33
TABELA 5: Quantificação da expressão de fluorescência de GFP/ área total, em infecção com 10^6 PFU	70
TABELA 6: Quantificação da expressão de fluorescência GFP/ área, em infecção com 10^8 PFU	77
TABELA 7: Alterações histopatológicas identificadas na MCA	79

LISTA DE ABREVIATURAS

- °C – Grau *Celsius*
- APCs – Células apresentadoras de antígenos
- CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças
- CEFs – Fibroblastos de embrião de galinha
- CEV – Vírus envelopados célula-associado
- CMLV – *Camelpox virus*
- CO₂ – Dióxido de carbono
- CPXV – *Cowpox virus*
- CVA – *Vaccinia virus* Ankara Corioalantóide
- DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- ECMV – *Ectromelia virus*
- ECP – Efeito citopático
- EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
- EEV – Vírus envelopado extracelular
- GFP – Proteína verde fluorescente
- H₀ – Hipótese nula
- HIV – Vírus da imunodeficiência humana
- ICB – Instituto de Ciências Biológicas
- ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
- IEV – Vírus envelopados intracelulares
- IFN – Interferon
- IMV – Vírus maduros intracelulares
- MHC – Complexo de histocompatibilidade principal
- ITRs - Regiões terminais invertidas
- M.O.I – Multiplicidade de infecção
- MCA – Membrana corioalantóide
- mL – Mililitro
- mM – Milimol

MPXV – *Monkeypox virus*
mRNA – RNA mensageiro
MVA – *Vaccinia virus* Ankara Modificado
nm– Nanômetro
NYCBH – New York City Board of Health
NYVAC – *Vaccinia virus* New York atenuado
OMS– Organização Mundial de Saúde
OPXV – *Orthopoxvirus*
ORF – Janela de leitura aberta
PBS – Tampão salina fosfato
PFU– Unidade formadora de placa
pH – Potencial de hidrogênio
RCNV – *Raccoonpox virus*
RNA – Ácido ribonucléico
SFB – Soro fetal bovino
TATV- *Taterapox virus*
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
VACV – *Vaccinia virus*
VARV – *Variola virus*
VPXV – *Volepox virus*
 γ – Gama
 μg – Micrograma
 μl – microlitro

Resumo

O *Vaccinia virus* Ankara Modificado (MVA), pertencente à família *Poxviridae*, foi obtido após 570 passagens em cultivo primário de células fibroblásticas de embrião de galinha (CEFs) para ser usado como vacina na campanha mundial de erradicação da varíola. Vacinas baseadas em poxvírus constituem um solo histórico de total sucesso alcançado em relação ao controle da varíola, a qual foi oficialmente declarada erradicada em 1980, após o uso de *Vaccinia virus* em vacinas. Atualmente há uma extensa verificação experimental que explora a possibilidade de inserção do MVA em plataformas vacinais devido a sua avirulência e segurança vacinal. Por esta razão, o objetivo deste trabalho foi determinar um sistema apropriado à multiplicação do vírus para produção de vacinas. A perspectiva foi comparar a eficiência multiplicativa do MVA em dois sistemas: cultivo primário de células fibroblásticas de embrião de galinha versus membrana corioalantóica (MCA) de ovos embrionados de galinha. Considerando ser extremamente vantajoso, do ponto de vista econômico, a multiplicação viral na MCA. Os resultados de titulação mostraram que o vírus se multiplica de maneira eficiente em ambos os sistemas de cultivo e que a obtenção de altos títulos virais é inversamente proporcional ao título de infecção. E além dos dados de titulação, a multiplicação viral na MCA foi determinada por quantificação de fluorescência através das imagens obtidas por microscopia confocal. Os resultados mostraram decréscimo na intensidade de fluorescência na medida em que ocorre aumento no tempo de infecção. Foi definido também a produtividade viral e observado a presença de pocks (lesões) entre infecções de 10^1 a 10^8 PFU na MCA. Tanto a presença de pocks quanto a obtenção de altos títulos virais foram demonstrados em infecções em até 10^4 PFU. Os pocks produzidos pela amostra MVA foram comparados com a produção de pocks por duas outras amostras de *Vaccinia virus* (VACV): Western Reserve (protótipo da família *Poxviridae*) e Lister (amostra mais usada em todo o mundo para produção de vacina durante o programa mundial de erradicação da varíola). A amostra VACV-WR produziu pocks grandes, enquanto que a amostra Lister produziu lesões intermediárias entre VACV-WR e MVA.

ABSTRACT

The Modified *Vaccinia virus* Ankara (MVA), which belongs to the family *Poxviridae*, was obtained after 570 passages in primary culture of cells chicken embryo fibroblast (CEFs) to be used as a vaccine in the global campaign to eradicate smallpox. Poxvirus based vaccines are a solo historical total success in the control of smallpox, which was officially declared eradicated in 1980 after the use of vaccinia virus in vaccines. Currently there is extensive experimental verification that explores the possibility of inserting the MVA vaccine platforms due to its virulence and vaccine safety. For this reason, the aim of this study was to determine an appropriate system for propagation of the virus for vaccine production. The prospect was to compare the efficiency of multiplicative MVA in two systems: primary culture of fibroblast cells versus chicken embryo chorioallantoic membrane (CAM) of embryonated chicken eggs. Whereas it is extremely advantageous from an economic standpoint, viral multiplication in MCA. The titration results showed that the virus multiplies efficiently in both culture systems and obtaining high virus titers is inversely proportional to the title infection. And in addition to the titration data, viral multiplication in MCA was determined by quantification of fluorescence through images obtained by confocal microscopy. The results showed a decrease in fluorescence intensity which occurs as increased time of infection. It was also defined viral productivity and observed the presence of pocks (injuries) infections between 10^1 - 10^8 PFU in MCA. Both the presence of pocks as obtaining high virus titers were demonstrated in infections in up to 10^4 PFU. The sample pocks produced by MVA were compared with the production of pocks on two other samples of *Vaccinia virus*: Western Reserve (prototype of the *Poxviridae* family) and Lister (comp most used worldwide for vaccine production during the program worldwide eradication of smallpox). The sample produced pocks large VACV-WR, Lister, whereas the sample produced lesions intermediate between MVA and VACV-VACV-WR.

Introdução

1.1. Família *Poxviridae*

1.1.1. Classificação

A família *Poxviridae* compreende vírus envelopados, de simetria complexa, com genoma de DNA fita dupla linear e multiplicação citoplasmática (MOSS & WARD, 2001). De acordo com o tipo de hospedeiro, os membros da família *Poxviridae* são divididos em duas subfamílias: *Entomopoxvirinae* e *Chordopoxvirinae* que infectam invertebrados e vertebrados, respectivamente. A subfamília *Entomopoxvirinae* é composta por três gêneros: *Alphaentomopoxvirus*, *Betaentomopoxvirus*, *Gammaentomopoxvirus* e apresenta como espectro de hospedeiro os membros da classe Insecta. A subfamília *Chordopoxvirinae* é dividida em nove gêneros: *Avipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Orthopoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Yatapoxvirus*, *Parapoxvirus* e *Cervidpoxvirus* (ICTV, 2012).

Espécies da subfamília *Chordopoxvirinae* possuem uma ampla distribuição geográfica, sendo capazes de infectar uma variedade de espécies de aves, répteis e mamíferos. Quatro gêneros (*Parapoxvirus*, *Orthopoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Yatapoxvirus*) incluem agentes etiológicos de infecções humanas. Enquanto alguns vírus infectam exclusivamente o homem, por exemplo o *Molluscum contagiosum virus* e o *Variola virus*, pertencentes respectivamente aos gêneros *Molluscipoxvirus* e *Orthopoxvirus*, outros infectam várias espécies animais, podendo causar graves infecções em ovinos, caprinos, bovinos, crocodilos, jacarés, galinhas, perus e avestruzes. Os poxvírus podem, portanto, ter efeitos devastadores sobre a produção pecuária, resultando em substanciais perdas econômicas (EMERSON et al., 2009).

1.2. Gênero *Orthopoxvirus*

O gênero *Orthopoxvirus* (OPXV) é composto de nove espécies antigenicamente relacionadas: *Camelpox virus* (CMLV), *Cowpox virus* (CPXV), *Ectromelia virus* (ECMV), *Monkeypox virus* (MPXV), *Raccoonpox virus* (RCNV), *Taterapox virus* (TATV), *Vaccinia virus* (VACV), *Variola virus* (VARV) e *Volepox virus* (VPXV) (ICTV, 2012). A **tabela 1** relaciona as espécies do gênero *Orthopoxvirus* com o espectro de hospedeiros e distribuição geográfica.

TABELA 1 - Espécies de vírus do gênero *Orthopoxvirus*, hospedeiros naturais e distribuição geográfica (FENNER, 2000 - modificado).

^a = Hospedeiro natural desconhecido.

Espécies	Espectro de hospedeiros	Seres vivos infectados naturalmente	Distribuição geográfica das infecções naturais
CMLV	Restrito	Camelos	África e Ásia
CPXV	Amplo	Vários: carnívoros, bovinos, elefantes, seres humanos, ratos; hospedeiros naturais: ratos do deserto, outros roedores.	Europa
ECMV	Restrito	Camundongos, hospedeiro natural desconhecido, possivelmente pequenos roedores	Europa
MPXV	Amplo	Chimpanzés, macacos, esquilos, seres humanos	África central e ocidental
RCNV	Amplo	Guaxinins	Estados Unidos
TATV	Restrito	<i>Tatera kemp</i> (rato do deserto)	África ocidental
VACV	Amplo	Bovinos, Seres humanos ^a	Índia, Brasil
VARV	Restrito	Seres humanos	Mundial
VPXV	Amplo	Pequenos roedores	Estados Unidos

As espécies de OPXVs que são capazes de infectar os seres humanos correspondem ao VARV, CPXV, MPXV e VACV. Destas espécies, as três últimas são zoonóticas, circulam na natureza e ocasionalmente infectam o homem. As manifestações clínicas resultantes da infecção por estas espécies estão associadas a um estado febril e lesões cutâneas (MAHALINGAM et al., 2004; EMERSON et al, 2009).

O VARV é o agente etiológico da varíola, doença contagiosa que se caracteriza pelo aparecimento de pequenas manchas por toda a superfície do corpo, as quais evoluem para vesículas, pústulas, crostas e terminam por cicatrizar (**figura 1A e 1B**). A sua origem é desconhecida e o homem é o seu único reservatório natural. O vírus foi um dos patógenos mais importantes da humanidade, sendo responsável por mais de 50 milhões de mortes nos anos 1900 e por centenas de milhões de mortes entre o primeiro surto registrado no antigo Egito até a sua erradicação em 1979 (MAHALINGAM et al., 2004; KENNEDY et al., 2009a). O caso mais antigo documentado ocorreu no ano de 1157 AC, quando o faraó Ramsés V possivelmente faleceu acometido pela doença. A múmia está em um museu do Cairo e carrega cicatrizes sugestivas da varíola (MAHALINGAM et al., 2004, GEDDES, 2006). Nos dias atuais, o VARV permanece no ápice de potenciais agentes patogênicos que podem ser usados para causar a morte em massa de uma população em um ataque bioterrorista (MERKEL et al., 2010).



FIGURA 1: Lesões pustulares típicas da varíola. (A) Uma criança com varíola em Bangladesh. **(B)** Lesões na perna de um paciente. Fontes: GEDDES, 2006; McFADDEN, 2010.

O CPXV, apesar do nome, a infecção bovina é rara, sendo mais freqüente infecções localizadas ou disseminadas na pele de animais domésticos e seres humanos. Os prováveis reservatórios do CPXV são os roedores, mas gatos podem ser infectados por contato com roedores e ser a fonte mais importante de infecções humanas. Esta espécie é endêmica e restrita a Europa (BOMHARD et al., 2010).

O MPXV, agente etiológico do monkeypox, foi descoberto em 1958, no entanto as infecções em seres humanos somente foram registradas no início dos anos de 1970 (PARKER et al., 2007). Monkeypox é uma doença endêmica da África central e ocidental, no entanto, em 2003, houve um surto nos Estados Unidos, representando os primeiros casos de macacos infectados no hemisfério ocidental. Foi registrado também trinta e sete pessoas infectadas e isto esteve intimamente relacionado com a importação de roedores de origem africana (MAHALINGAM et al., 2004; WEAVER et al., 2008). O MPXV é conhecido como o vírus da varíola dos macacos, por ter sido a causa de morte dos macacos Monkeypox. Roedores e primatas não-humanos correspondem à hospedeiros naturais do vírus, podendo ser transmitido aos seres humanos e mais raramente a transmissão pode ocorrer de uma pessoa para outra. Isto tem sido motivo de preocupação, pois a doença causa manifestações clínicas semelhantes ao VARV. Monkeypox é considerada, portanto, uma doença zoonótica emergente (PARKER et al., 2007; AMERICO et al., 2010; CDC, 2010).

O VACV é outro agente zoonótico emergente, acomete principalmente gado leiteiro e a transmissão ocorre entre os seus contatos mais próximos como fazendeiros e ordenhadores. As lesões surgem normalmente nas mãos por contato direto com bovinos que apresentam lesões semelhantes no úbere e tetas, podendo se espalhar para outras partes do corpo (**figuras 2 A, B e C**). No Brasil, nestes últimos anos, vários surtos de vaccínia bovina já foram registrados. Esta zoonose causa impactos na economia, além de ser um importante problema de saúde pública. Estes fatos têm sido motivo para várias investigações em decorrência de surtos em diferentes áreas do Brasil (TRINDADE et al., 2007, ABRAHÃO et al., 2010). É um vírus que apresenta menor virulência que o VARV e por oferecer proteção cruzada contra o VARV foi utilizado como vacina para erradicar a varíola (ESPOSITO & FENNER, 2001; GEDDES, 2006).



FIGURA 2: Lesões ulcerativas causadas por VACV. (A e B) Lesões presentes nas mãos de ordenhadores após contato com bovinos apresentando lesões semelhantes. **(C)** Lesões ulcerativas presentes nas tetas da vaca. Fontes: TRINDADE et al., 2003; TRINDADE et al., 2007.

1.3. Aspectos gerais da biologia dos poxvírus

1.3.1. Morfologia

Os poxvírus apresentam morfologia em forma ovóide, de tijolo ou pleomórfica, medindo cerca de 140-260 nm de diâmetro por 220-450 nm de comprimento (**figura 3A**). Devido ao seu tamanho, os poxvírus se situam próximos ao limite de detecção do microscópio óptico convencional, contudo, não podem ser visualizados desta forma (FENNER, 2000).

A partícula viral é formada por quatro estruturas distintas: cerne, corpúsculos laterais, membrana externa e envelope. O cerne é a estrutura mais interna, apresenta a forma de um disco bicôncavo e dentro dele está presente o material genético, enzimas e fatores de transcrição de genes precoces. O DNA e várias proteínas são organizados dentro do cerne viral formando o nucleocapsídeo. Nas concavidades do cerne, encontram-se os dois corpúsculos laterais, cuja função ainda não é bem definida. A membrana externa circunda todo o cerne e é composta por uma bicamada lipoprotéica com túbulos de superfície arranjados irregularmente (MOSS & WARD, 2001). A estrutura da partícula viral está representada na **figura 3B**.

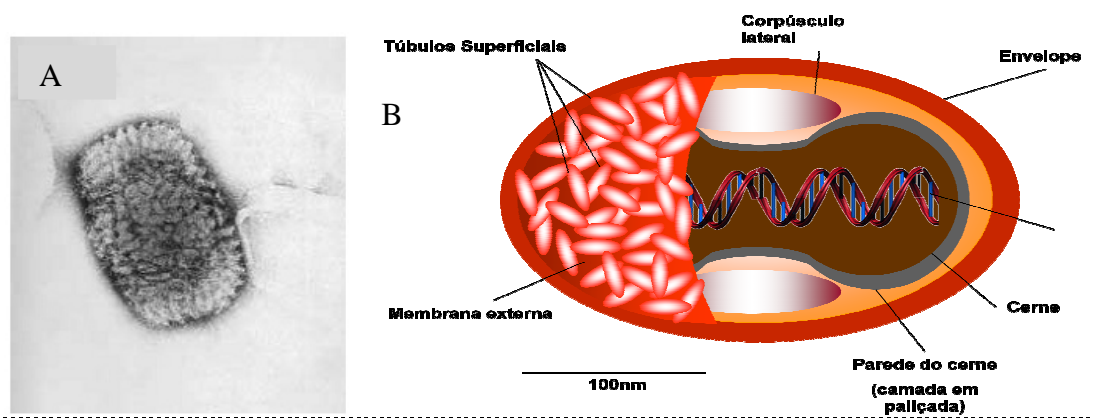


FIGURA 3: Morfologia e estrutura dos poxvírus. (A) Microscopia eletrônica do VACV revela a forma de tijolo. (B) Representação esquemática da estrutura de uma partícula viral poxvírus. Fontes: DUBOCHET et al., 1994. - modificado por Luciana Garcia Andrade; McFADDEN, 2005.

A morfogênese dos poxvírus é um processo complexo a qual envolve múltiplas formas, compreendendo o vírus imaturo (IV), vírus maduro intracelular (IMV), vírus envelopado intracelular (IEV), vírus envelopado extracelular (EEV) e vírus envelopado célula-associado (CEV). A **figura 4** ilustra a ordem de formação de cada vírus, a começar pelas primeiras estruturas da partícula viral (IV) que são formadas dentro de regiões do citoplasma da célula chamadas de fábricas virais. A estas estruturas são associadas membranas lipoprotéicas que determinarão a formação do IMV, constituído por uma única bicamada lipídica. O IEV corresponde ao IMV após aquisição de uma segunda membrana no complexo de Golgi. A partir deste momento, o IEV será conduzido através de microtúbulos até a membrana da célula e então duas situações poderão ocorrer: os vírus mantidos na superfície da célula induzirão a formação de uma cauda de actina que irá dirigir as partículas para fora da célula ou então mediar a disseminação do vírus célula a célula. A produção de diferentes partículas representa uma estratégia que promove a disseminação do vírus, além de contribuir com a evasão do sistema imune. Duas partículas infecciosas distintas são produzidas, compreendendo as formas IMV e EEV. O IMV é liberado apenas com a morte da célula, enquanto que o EEV é liberado da célula durante a infecção. Estas partículas diferem em suas proteínas de superfície, no número de membranas e entram na célula por diferentes mecanismos (SMITH et al., 2002; McFADDEN, 2005; MOSS, 2006).

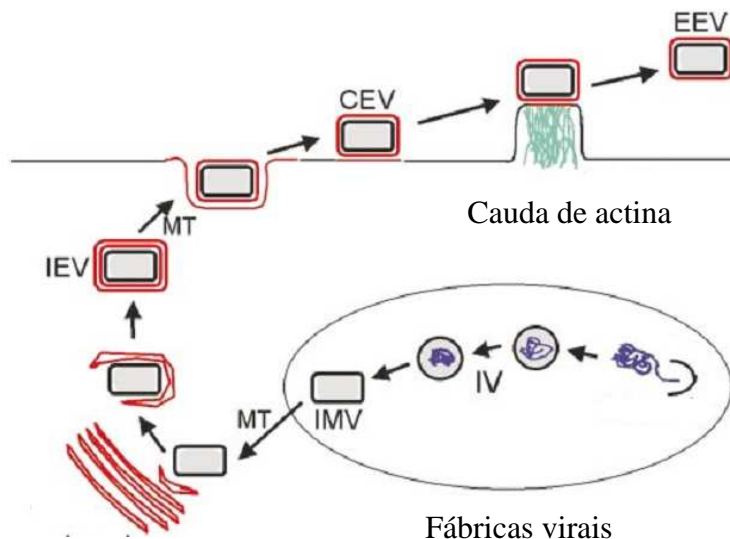


FIGURA 4: Representação esquemática da morfogênese do VACV. O IMV produzido dentro das fábricas virais será conduzido através dos microtúbulos (MT) para as membranas do complexo de Golgi. No complexo de Golgi, o IMV é envolvido por uma dupla membrana passando para a forma de IEV. O IEV será conduzido até a superfície celular, onde irá se fundir à membrana citoplasmática, perder uma membrana do envelope após a fusão, passando a condição de CEV. O CEV induz a formação da cauda de actina que conduzirá o vírion para fora da célula, passando a ser denominado EEV. Fonte: SMITH et al., 2002.

1.3.2. Genoma

O genoma dos poxvírus consiste em uma grande molécula de DNA fita dupla linear ligada covalentemente nas duas extremidades, variando entre 130 e 300 Kb, com aproximadamente 200 genes. O conteúdo de guanina + citosina varia entre 35-64% na subfamília *Chordopoxvirinae* e em *Entomopoxvirinae* representa cerca de 20 % do genoma (ICTV, 2012). Os poxvírus codificam proteínas não-essenciais que regulam a interação com a célula hospedeira, sendo capazes de criar de um ambiente favorável para sua multiplicação (McCRAITH et al., 2000; McFADDEN, 2005; SPERLING et al., 2009).

A parte central do genoma poxvírus, constituída por cerca de noventa genes, é altamente conservada e codifica principalmente proteínas estruturais e enzimas envolvidas com replicação, transcrição do ácido nucléico e morfogênese (HANSEN et al., 2004; GUBSER et al., 2004). Nas extremidades do genoma se encontram as regiões terminais invertidas (ITRs), sequências idênticas dispostas em orientações contrárias. As ITRs são regiões genômicas variáveis e as variações nestas regiões permitem a diferenciação

entre os gêneros, espécies e até mesmo entre linhagens da mesma espécie. Os genes presentes nesta região codificam proteínas não-essenciais envolvidas com o espectro de hospedeiro, virulência ou interação do vírus com o sistema imune, o que confere a cada poxvírus características únicas à imunomodulação e patogênese. As duas fitas de DNA são ligadas nas extremidades através das alças terminais. Essas regiões são conservadas, constituídas por sequências nucleotídicas de fita simples, contendo aproximadamente 100 bases (**figura 5**) (GUBSER et al., 2004).

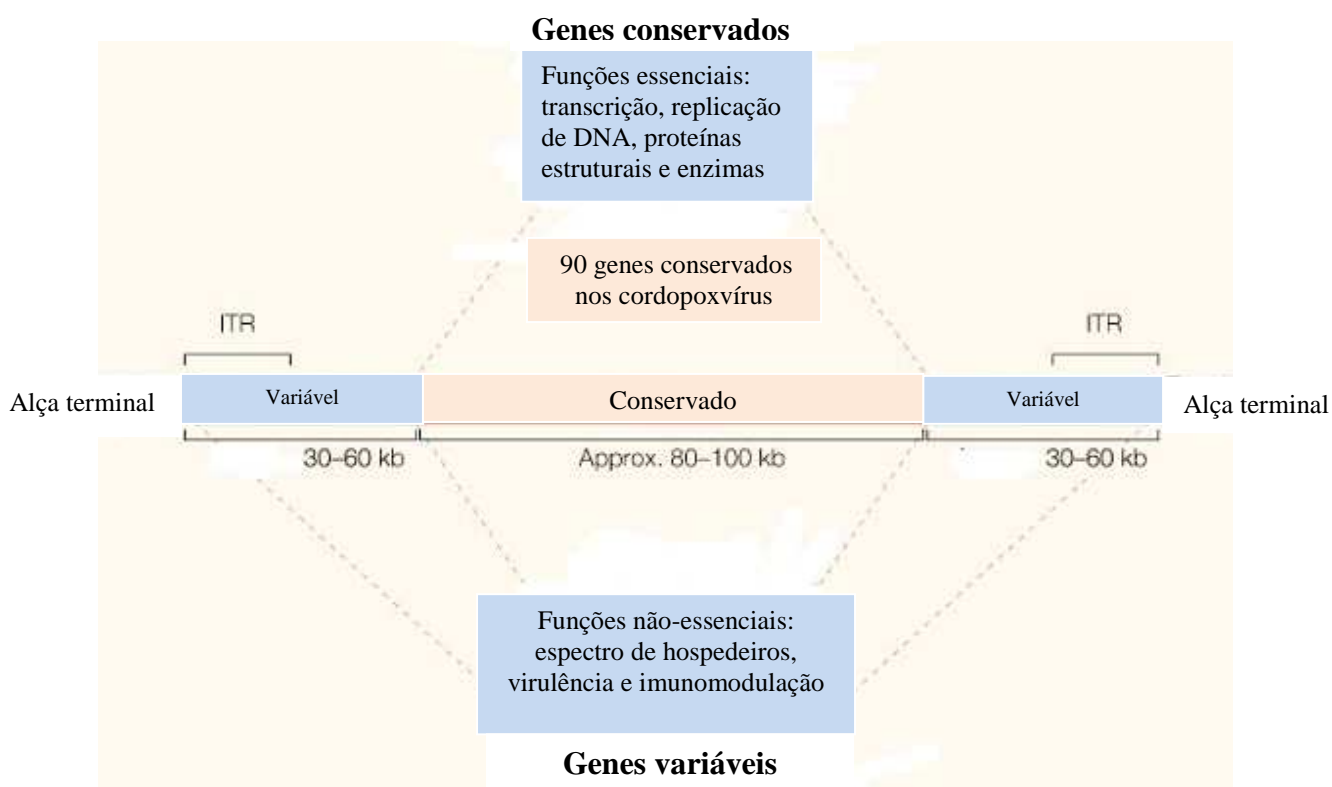


FIGURA 5: Representação esquemática das características estruturais e funcionais do genoma VACV, vírus protótipo da família *Poxviridae*. A região central apresenta genes altamente conservados, que codificam proteínas envolvidas em funções essenciais. As regiões terminais invertidas (ITRs) codificam proteínas não-essenciais, e se apresentam duplicadas no genoma. Nas extremidades são observadas as alças terminais. Fonte: SMITH & McFADDEN, 2002.

1.3.3. Ciclo de multiplicação

O ciclo de multiplicação dos poxvírus ocorre no citoplasma da célula hospedeira, o que não é característico de um vírus de DNA. Portanto, é necessário que a partícula viral possua quase todos os elementos para a sua multiplicação, incluindo enzimas tais como

a RNA polimerase dependente de DNA, topoisomerase I, DNA ligase, helicase, enzima de metilação, poli A polimerase (enzimas envolvidas na replicação e polimerização do DNA) e fatores de transcrição de genes precoces (McCRAITH et al , 2000; CONDIT & NILES, 2002).

O ciclo de multiplicação pode ter início com a adsorção do vírus sob a forma de IMV ou EEV na membrana da célula hospedeira. A adsorção viral ocorre pela interação entre proteínas virais com proteínas da superfície celular. Os possíveis receptores celulares são os glicosaminoglicanos, a condroidina sulfato e o heparano sulfato, que são moléculas de caráter ubíquo (McFADDEN, 2005).

A penetração ocorre normalmente por fusão entre envelope viral e a membrana celular, orientada pelas proteínas de fusão presentes no envelope viral, ou então através de vesículas endocíticas. A fusão do IMV tanto com a membrana plasmática como com a membrana endossomal é mediada por um complexo de pelo menos nove proteínas (A16, A21, A28, F9, G3, G9, H2, J5 e L5). Estas proteínas são conservadas entre os poxvírus, o que indica um mecanismo de penetração comum entre estes vírus (**figura 6**). Diferente dos outros vírus, em que este mecanismo é geralmente mediado por uma única proteína (MOSS, 2006; ROBERTS & SMITH, 2008). Após a fusão, há a liberação do cerne no citoplasma (desnudamento primário) e a transcrição de genes precoces. Há três classes de genes: precoces, intermediários e tardios. Com exceção dos genes precoces, em que os fatores de transcrição estão presentes no interior do cerne, a expressão gênica de cada classe de genes depende de fatores de transcrição produzidos por genes da classe anterior. Por isso, a expressão gênica pode ser descrita como uma transcrição em cascata (CONDIT & NILES , 2002). Os genes precoces são traduzidos em fatores de transcrição para genes intermediários, proteínas imunomoduladoras e proteínas que irão promover o desnudamento do cerne, chamado de desnudamento secundário (McFADDEN, 2005).

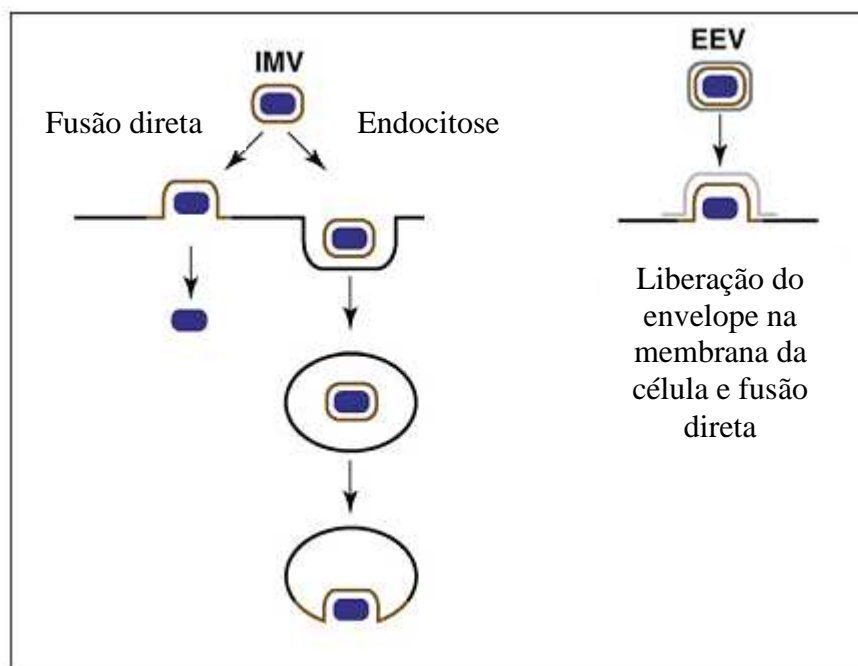


FIGURA 6: Modelos de penetração das partículas IMV e EEV. Na forma IMV o cerne viral pode ser liberado no citoplasma da célula por fusão direta entre a membrana do IMV com a membrana citoplasmática ou através da formação de vesículas endocíticas. A forma EEV libera o envelope na membrana da célula e posteriormente penetra por fusão direta entre a forma IMV com a membrana citoplasmática. Fonte: ROBERTS & SMITH, 2008.

No desnudamento secundário a membrana do cerne é removida liberando, desse modo, o DNA viral dentro do citoplasma da célula. O DNA viral replica-se em inclusões elétron-densas no citoplasma (inclusões de Guarniere ou fábricas virais). Posteriormente, há a transcrição dos genes intermediários que codificam fatores de transcrição para genes tardios. Os genes tardios, por sua vez, são transcritos e traduzidos em proteínas estruturais e outros componentes que se associam às partículas em formação (McFADDEN, 2005).

Após o acúmulo de produtos gênicos virais ocorre a morfogênese. A estruturação inicial das primeiras partículas virais ocorre a partir da associação de estruturas lipoproteicas às fábricas virais, denominadas crescentes, dando origem à partículas uniformes e esféricas e que posteriormente sofrerão maturação formando o IV. Após clivagens proteolíticas de elementos do capsídeo e condensação do cerne viral o IV dá origem ao IMV, representando a maioria das partículas virais infecciosas produzidas. Estas partículas trafegam através de microtúbulos até chegar ao complexo de Golgi, ganham dupla

membrana e passam a condição de partículas não- infecciosas denominadas IEV. Ao contrário do que ocorre com outros vírus envelopados, os poxvírus adquirem o envelope no complexo de Golgi e não no momento em que são exportados da célula , através da fusão à membrana citoplasmática (MOSS & WARD, 2001; McFADDEN, 2005; MOSS, 2006).

A liberação dos vírus pode ocorrer com a fusão da forma IEV à membrana da célula, havendo a perda de uma membrana do IEV. A partícula viral com apenas um envelope é liberada para o meio extracelular, se torna infecciosa e passa a ser denominada EEV. Ou então, a partícula viral pode permanecer associada a membrana da célula junto as microvilosidades que irão mediar a disseminação do vírus célula a célula, sendo denominado CEV (McFADDEN, 2005; MOSS & WARD, 2001). As primeiras partículas produzidas são secretadas dentro de oito horas e as células infectadas são destruídas de 48 a 72 horas (KIRN & THORNE, 2009). O ciclo de multiplicação está esquematizado na **figura 7**.

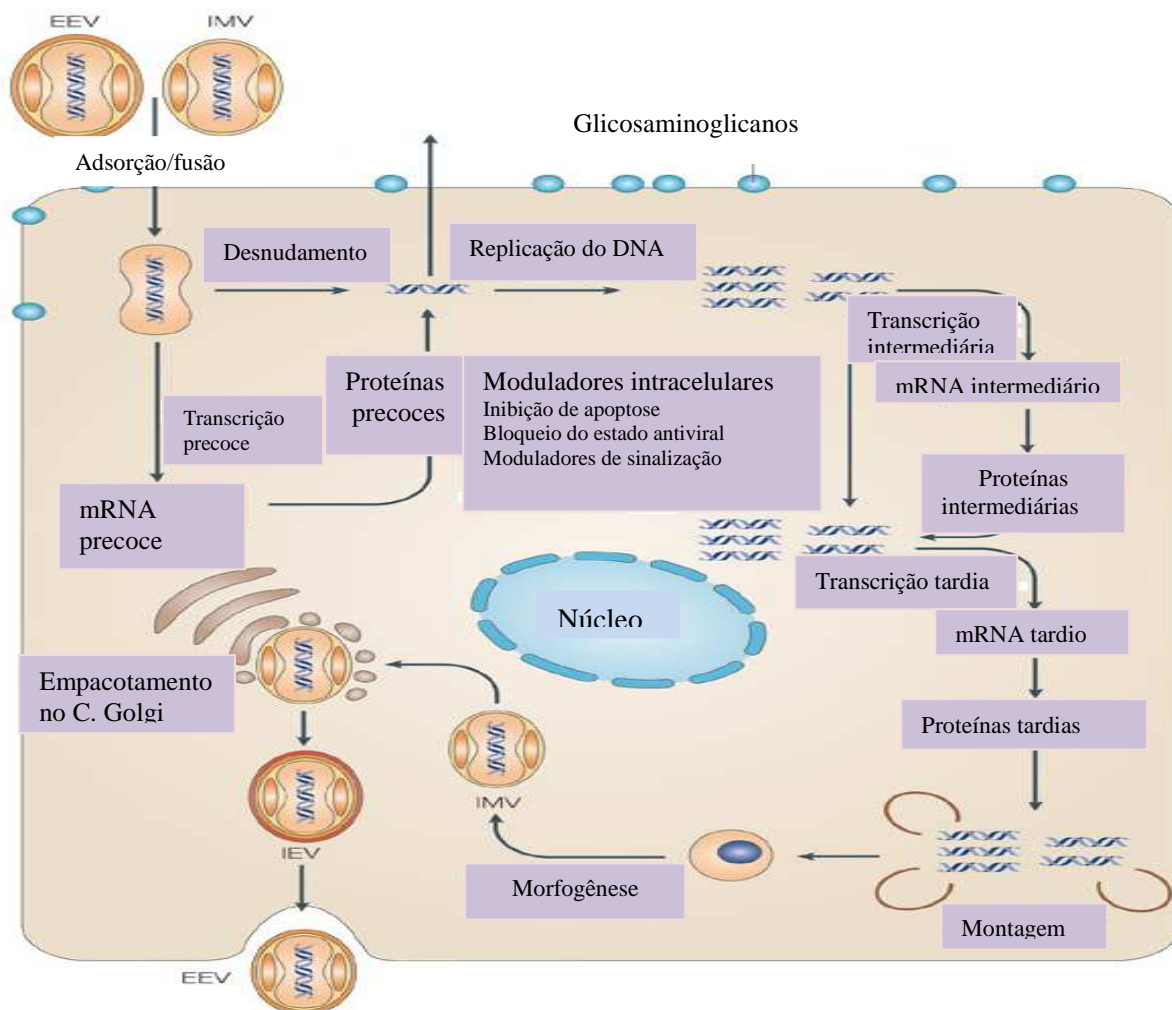


FIGURA 7: Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos poxvírus. A penetração ocorre por fusão entre envelope viral e a membrana citoplasmática. Após a penetração inicia-se a transcrição de genes precoces que são traduzidos em fatores de transcrição para genes intermediários, proteínas imunomoduladoras e proteínas que irão promover o desnudamento do cerne. No desnudamento secundário, a membrana do cerne é removida liberando o DNA viral dentro do citoplasma da célula. O DNA viral replica-se em inclusões elétrons-densas no citoplasma. Posteriormente, há a transcrição dos genes intermediários que expressam fatores de transcrição de genes tardios. Os genes tardios são transcritos e traduzidos em proteínas estruturais, culminando com a montagem das partículas virais. A liberação da forma EEV ocorre por fusão à membrana da célula. Fonte: McFADDEN, 2005- modificado.

1.3.4. Mecanismo de evasão dos Poxvírus

Os vírus dependem das funções celulares de seus hospedeiros para completarem seu ciclo de multiplicação, e para que isso ocorra da melhor maneira possível, os vírus modificam o meio intracelular de modo a otimizar sua multiplicação. Os poxvírus

conseguem penetrar em uma ampla gama de células de mamíferos e se multiplicam de forma eficiente devido à capacidade do vírus em manipular com sucesso as defesas antivirais da célula (WERDEN et al., 2007; WERDEN et al., 2008). Logo após a penetração do vírus na célula, ocorre a expressão de proteínas imunomoduladoras que bloqueiam as defesas antivirais, começando pela via da imunidade inata que envolve interferon tipo I (IFN-I), receptores *toll-like*, quimiocinas e citocinas. E na subsequente resposta adaptativa altera o processamento de peptídeos pelo complexo de histocompatibilidade principal (MHC) (JACOBS et al., 2009; SIMON et al., 2010). Os poxvírus codificam proteínas anti-apoptóticas (serpinas) e também conseguem bloquear vias apoptóticas através da inibição de atividade das caspases. E ainda, dentre outros mecanismos, codificam viroreceptores de ligação à citocinas e quimioquinas. Por competição, os viroreceptores impedem a ligação aos receptores celulares e esta estratégia representa a mais comum para escapar dos efeitos antivirais (JOHNSTON & McFADDEN, 2003) (**figura 8**).

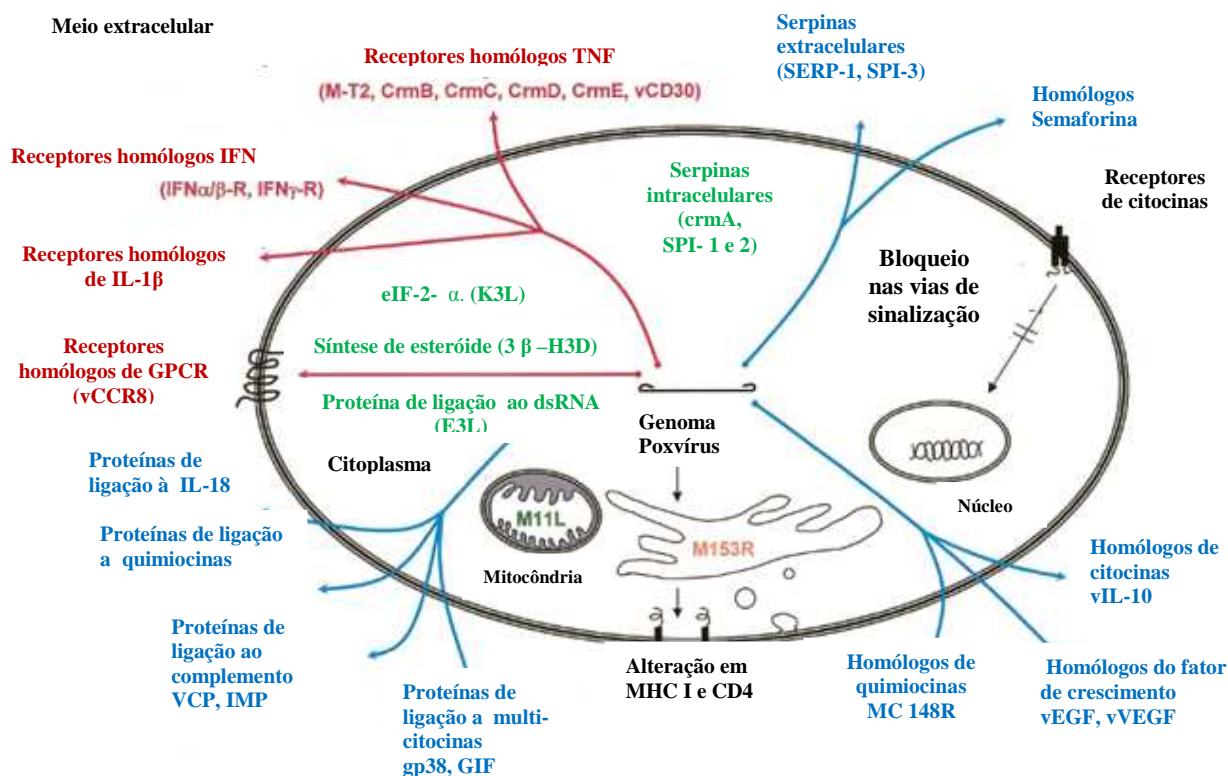


FIGURA 8: Mecanismo de evasão dos poxvírus à resposta imune. Os Poxvirus codificam proteínas imunomoduladoras que alteram o processamento e apresentação de antígeno (laranja), bloqueiam a transdução de sinal (verde), codificam ainda viroreceptores de ligação à citocinas e quimiocinas (vermelho) e virocinas que são proteínas homólogas à citocinas, quimiocinas e à componentes do sistema complemento (azul). GPCR, receptor acoplado a proteína G; GIF, fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos; IMP, proteína moduladora da inflamação; VEGF, fator de crescimento epidérmico viral; vVEGF, fator de crescimento endotelial vascular viral. Fonte: JOHNSTON & McFADDEN, 2003.

1.4. *Vaccinia virus*

O VACV é o protótipo do gênero OPXV, apresenta um genoma com cerca de 195 Kb e um amplo espectro de hospedeiros (MOSS et al., 2001). O reservatório natural do VACV permanece indeterminado e a sua origem desconhecida. Entretanto, algumas teorias tentam explicar a sua origem e uma delas justifica a sua origem a partir de outro OPXV após passagens em um hospedeiro alternativo (ROBERTS & SMITH, 2008; MACNEIL et al., 2009).

Ao oferecer proteção cruzada contra uma variedade de OPXVs devido à natureza altamente conservada das proteínas estruturais e por apresentar menor virulência que o

VARV, estas características o levaram a ser utilizado como amostra vacinal contra o VARV, contribuindo com o programa mundial de erradicação da varíola (ESPOSITO & FENNER, 2001; CONDIT & NILES, 2002; JACOBS et al., 2009; MACNEIL et al., 2009). A varíola foi a primeira doença a ser controlada por imunização e a única erradicada (SMITH & McFADDEN, 2002).

1.4.1. Histórico da vacinação

Historicamente os primeiros esforços para imunização foram praticados contra a varíola, em um processo conhecido como variolização, inicialmente praticado na Índia e China. A variolização foi introduzida na Europa em 1723 e este método de imunização consistia na inoculação do VARV, obtido de pústulas de pessoas infectadas. A infecção normalmente resultava em uma reação localizada, com erupção cutânea, podendo evoluir para reações mais graves ou mesmo levar o indivíduo a morte em casos de pessoas com sistema imunológico comprometido. Embora a variolização tivesse uma taxa de mortalidade de 0,5-2%, a estratégia garantiu sucesso comparado ao índice de morte da população que era entre 20-30% nas infecções naturais. Apesar da alta incidência de complicações, a variolização foi praticada como único meio de proteção contra a varíola até a produção da primeira vacina (SMITH & McFADDEN, 2002; JACOBS et al., 2009).

A vacinação foi introduzida em 1796, pelo médico inglês Edward Jenner, ao investigar o fato de que ordenhadores infectados em suas mãos com o CPXV, por contato com lesões de pele e úbere de bovinos, posteriormente eram protegidos contra a varíola humana. Ao fazer esta correlação abriu-se uma nova perspectiva de controle da varíola. Jenner coletou material de uma lesão pustular das mãos de uma ordenhadeira e logo após escarificou a pele de uma criança para introduzir o CPXV, a qual apresentou febre e pústula no local da inoculação. Posteriormente, a criança foi desafiada com o VARV. O resultado mostrou que a criança estava protegida por não adquirir a doença. Jenner ao correlacionar, portanto, os dados de observação, ele ofereceu a base de uma intervenção preventiva. Os aspectos éticos não foram considerados neste estudo. O termo vacina foi usado por Jenner para descrever o uso da inoculação do CPXV, agente etiológico da varíola bovina, para obtenção de imunidade contra a varíola humana. Entretanto, como e quando o VACV passou a ser usado na vacinação é desconhecido. Mas pelo fato de

serem antigenicamente relacionados a imunização continuou contribuindo com a mesma eficácia na proteção. Vírus vacinais Jennerianos representam, portanto, a primeira geração de vacinas contra OPXV (KAPLAN, 1989; SMITH & McFADDEN, 2002).

Devido a eficácia da primeira vacina, a Organização Mundial de Saúde (OMS) lançou na década de 70, uma campanha mundial de erradicação da varíola. O VARV causou uma grande pandemia e o controle desta doença dependia fortemente da disponibilidade de um método extremamente eficaz. Para isso, as vacinas continham VACV vivos e eram administradas após lesão superficial na pele provocada pelo uso de uma agulha bifurcada. No local da vacinação eram desenvolvidas pústulas, seguidas de uma posterior cicatrização (KENNEDY et al., 2009a; KENNEDY et al., 2010). Porém, em indivíduos imunocomprometidos a vacina apresentava um elevado índice de efeitos adversos provocados pela disseminação local ou sistêmica do vírus. Neste caso, eram registrados casos de eczema, dermatite e raramente encefalite e miocardite. Apesar dos efeitos colaterais, a vacinação levou à erradicação mundial da varíola através de uma robusta proteção duradoura promovida por uma resposta imune celular e humoral (MAHALINGAM et al., 2004; OSTROUT et al., 2007; KENNEDY et al., 2010). O último caso de aquisição natural de varíola ocorreu na Somália, em 1977, e em maio de 1980, a varíola foi oficialmente declarada erradicada. Em 1982, o único país produtor de vacina VACV era os Estados Unidos, mas sua distribuição para a população foi interrompida em 1983. (JACOBS et al., 2009). Fatores que contribuíram para a erradicação da varíola: o VARV ter como único hospedeiro natural o homem, não recorrência de infectividade, compromisso político universal, objetivos técnicos definidos, cronograma preciso e disponibilidade de uma vacina termoestável (MAHALINGAM et al., 2004).

Três décadas após a erradicação da varíola, a ameaça de re-introdução da varíola através do bioterrorismo e de surtos de doenças emergentes, tal como o monkeypox, conduz um renomado interesse em novas gerações de vacinas anti-poxvírus efetivamente mais seguras (KENNEDY et al., 2010). Atualmente, amostras atenuadas do VACV são de interesse não apenas como vacina contra a varíola, mas também como vetores de expressão contra várias doenças infecciosas (TERAJIMA et al., 2006).

1.4.2. Amostras vacinais

Na tentativa de reduzir a incidência de complicações da vacinação contra a varíola, diferentes amostras de VACV, com níveis variados de virulência, foram introduzidas na vacinação durante a campanha de erradicação da varíola, tais como a Copenhagen (COP-VACV), Ankara (VACV-MVA), Tian Tan (VACV-TIA), Lister (VACV-LO) e New York Board of Health (NYCBH) (KAPLAN, 1989; KENNEDY et al., 2009a).

E para melhor definição destas vacinas, elas foram classificadas de acordo com o modo de produção. As vacinas produzidas na pele de animais correspondem à vacinas de primeira geração. E embora fosse um método econômico para multiplicação viral, o uso de animais para a produção de vacinas foi interrompido devido aos riscos de contaminação microbiana. Isto levou a produção de vacinas de segunda e terceira gerações usando sistemas de cultura de células ou ovos embrionados, respectivamente. Já a quarta geração de vacinas VACV foi desenvolvida por engenharia genética através da exclusão de genes envolvidos na virulência para obtenção de vacinas atenuadas (JACOBS et al., 2009).

Na campanha mundial de erradicação da varíola, diferentes amostras foram usadas em todo o mundo e as vacinas produzidas na pele de animais incluem: Dryvax, EM-63, Temple of Heaven e Lancy-Vaxina (KENNEDY et al., 2009a, JACOBS et al., 2009). A vacina Dryvax foi fabricada a partir do líquido linfático extraído da pele de vitelos infectados com a amostra NYCBH e usada nos Estados Unidos. A EM-63 foi usada na Rússia e derivada da amostra NYCBH. A Temple of Heaven, usada na China, foi produzida com VACV-TIA e a Lancy-Vaxina com VACV-LO (GARCEL, 2007; JACOBS et al., 2009). As amostras COP-VACV, VACV-MVA foram usadas na Dinamarca e Turquia, respectivamente. Em geral, todas as amostras foram eficientes na imunogenicidade, embora apresentasse efeitos adversos. A amostra NYCBH foi a que apresentou menor taxa de efeitos adversos, entretanto, a VACV-LO, com taxa intermediária de efeitos adversos, tornou-se a vacina mais usada em todo o mundo (JACOBS et al., 2009; KIRN & THORNE, 2009).

As vacinas de segunda geração foram produzidas em culturas de células à partir da amostra NYCBH, representando a versão mais segura da vacina Dryvax. A vacina ACAM2000 foi produzida em cultivo de células Vero e aprovada como reforço de dose contra a varíola. Esta vacina foi licenciada em 2008, nos Estados Unidos, porém, não

teve muito sucesso por também causar efeitos colaterais em pessoas com sistema imunológico debilitado (JACOBS et al., 2009).

Amostras VACV de terceira geração foram obtidas após passagens seriadas em culturas de células de hospedeiros alternativos ou em ovos embrionados. Durante as passagens, o genoma viral é alterado e em consequência a virulência, replicação e espectro de hospedeiro são afetados (JACOBS et al., 2009). Estas passagens viabilizam a atenuação viral, processo tradicionalmente utilizado para obtenção de vacinas atenuadas (KENNEDY et al., 2009b). Três novas amostras atenuadas foram obtidas a partir de VACV pela passagem em hospedeiros alternativos: LC16m8, MVA e a Dairen I (DI). A LC16m8 foi produzida a partir da amostra VACV-LO após várias passagens em cultura de células de rim de coelho. A vacina LC16m8 foi usada principalmente em crianças no Japão durante o programa mundial de erradicação da varíola (JACOBS et al., 2009; SAITO et al., 2009). O *Vaccinia virus* Ankara Modificado (MVA) foi obtido após 570 passagens em cultivo primário de fibroblastos de embrião de galinha (CEFs) e usado também para vacinar mais de 120.000 pessoas na Alemanha durante o programa de erradicação da varíola (WYATT et al., 2004, GARCÍA et al., 2007; SUTER et al., 2009). E a amostra Dairen I (DI) foi obtida a partir da amostra Dairen após treze passagens na membrana corioalantóica (MCA) de ovos embrionados (JACOBS et al., 2009).

O NYVAC (*Vaccinia virus* New York atenuado) é uma amostra atenuada que faz parte da quarta geração de vacinas. Esta amostra foi obtida a partir de COP-VACV após a supressão de 18 janelas abertas de leitura (ORFs), incluindo a timidina quinase, ribonucleotídeo redutase, dentre outras. Comparado ao MVA, é um vírus que não possui a mesma capacidade imunoestimulatória. Portanto, este vírus não é um candidato ideal à produção de vacina contra a varíola (KIRN & THORNE, 2009; KENNEDY et al., 2009a). Outra forma para obtenção de vacinas atenuadas foi demonstrada através da deleção do gene de virulência E3L, o qual está relacionado ao mecanismo de evasão à resposta imune inata. O VACV mutante é menos patogênico e induz uma forte resposta imune que é capaz de proteger contra um posterior desafio com o VACV (VIJAYSRI et al., 2007). As gerações de vacinas produzidas com VACV estão descritas na **tabela 2**.

TABELA 2: Descrição de vacinas com *Vaccinia virus*. Fonte: JACOBS et al., 2009. Modificada.

Geração	Produção	Exemplos
Primeira	Na pele de animais	Dryvax, EM-63, Temple of Heaven e Lancy-Vaxina
Segunda	Cultura de tecidos	ACAM2000
Terceira	Por passagem seriada em hospedeiro alternativo	MVA, LC16m8, DI
Quarta	Por engenharia genética	NYVAC, VACV Δ E3L

1.5. MVA

1.5.1. Origem

O *Vaccinia virus* Ankara Corioalantóide (CVA) constituído por um genoma de 208 Kb é o vírus ancestral do MVA. O MVA com apenas 178 Kb apresenta uma perda de 13% do genoma ancestral, com deleções de seis regiões correspondentes a 30 Kb. O MVA foi gerado após 570 passagens em cultivo de CEFs para obtenção de um VACV altamente atenuado. Durante o processo de atenuação muitos genes envolvidos na virulência foram perdidos, afetando principalmente o espectro de hospedeiros e a imunomodulação. O vírus MVA teve uma acentuada redução no espectro de hospedeiros, se restringindo às células de aves e de hamster (MEISINGER et al., 2007; SUTER et al., 2009; JACOBS et al., 2009 VASAN et al., 2010). A **figura 9** esquematiza o genoma do MVA apresentando as deleções e gama de hospedeiros.

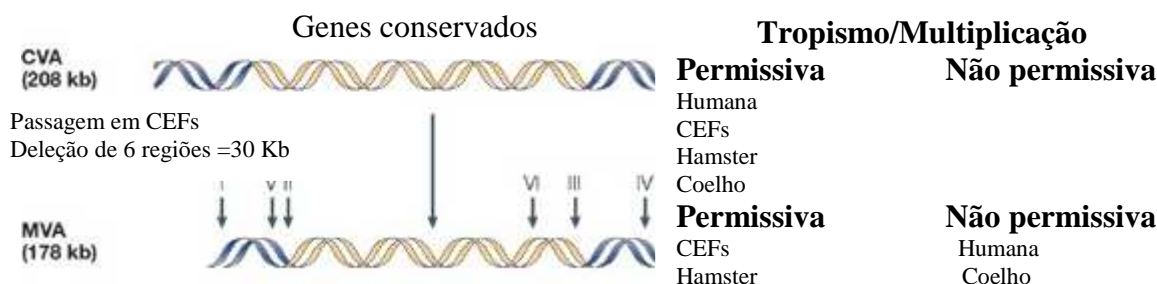


FIGURA 9: Origem do MVA. O MVA foi derivado do CVA após 570 passagens em CEFs. O CVA perdeu 30 Kb e a capacidade de se multiplicar na maioria das células de mamíferos, incluindo células humanas. As células que ainda são permissivas à multiplicação do vírus permanecem as CEFs e de rim de hamster. Fonte: McFADDEN, 2005 - modificado.

O tropismo do VACV é regulado principalmente por três genes: K1L, C7L e E3L, os quais estão associados ao mecanismo de evasão à resposta imune. Estes genes exercem a função de antagonizar as atividades antivirais induzida por IFN I. Dentre esses, foram perdidos durante o processo de atenuação os genes K1L e o C7L (SPERLING et al., 2009). Esta perda permitiu que o MVA estimulasse uma resposta inata melhor que a do VACV ao perder a capacidade de inibição do IFN-I (FRENZ et al., 2010). O estudo de FRENZ (2010) mostra que o MVA induz uma rápida resposta de IFN-I e esta resposta é responsável por promover uma eficiente expansão de células T CD8⁺ e com isso desencadear imunidade protetora contra diversas doenças.

1.5.2. Ciclo de multiplicação em células não permissivas

Embora o MVA seja capaz de infectar as células humanas, é um vírus incapaz de completar seu ciclo de multiplicação e de produzir uma progênie de partículas infecciosas. Entretanto, a replicação do DNA viral ocorre normalmente e tanto as proteínas precoces como tardias são produzidas. O que impede a formação de novas partículas é a ausência de clivagens proteolíticas das proteínas estruturais e, desse modo, apenas os vírus imaturos são produzidos. O alto nível de síntese protéica em células humanas demonstra o potencial do MVA como vetor de expressão (**figura 10**) (SUTTER & MOSS, 1992). A microscopia eletrônica mostra que não ocorre a formação de partículas infecciosas em células não-permissivas (**figura 11**).

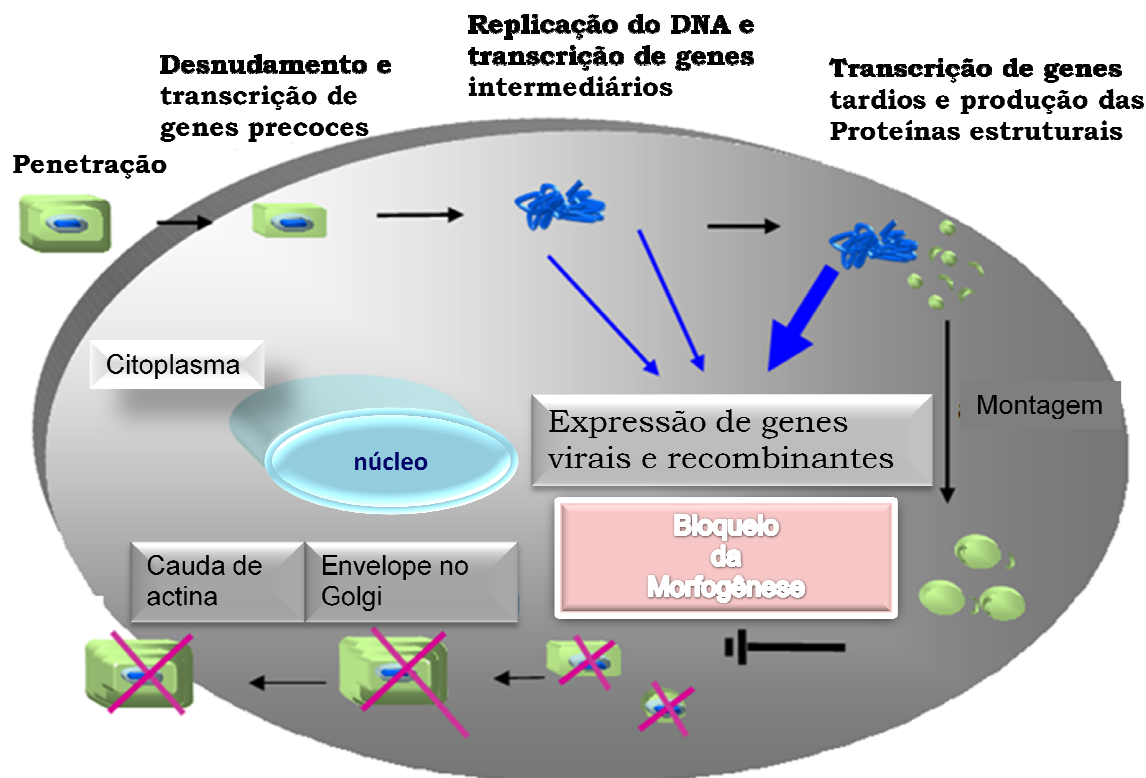


FIGURA 10: Representação esquemática do ciclo de multiplicação do MVA em células não permissivas. O vírus codifica todas as classes de proteínas, porém não ocorre formação de novas partículas devido ao bloqueio na morfogênese. Fonte: <http://www.humane-endpoints.org/images/Suezer.pdf>

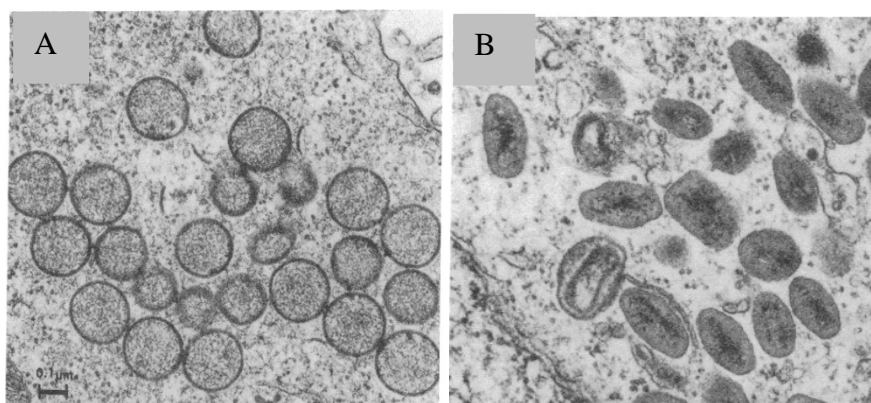


FIGURA 11: Microscopia eletrônica do vírus MVA multiplicado em células HeLa e CEFs. A Microscopia eletrônica de células infectadas com o MVA mostra que não ocorre a formação de partículas infecciosas em células não-permissivas. (A) Células HeLa infectadas com MVA revela apenas o aparecimento de vírus imaturos, sendo apresentada a partícula na forma circular (B) CEFs infectadas com MVA revela, após as clivagens proteolíticas de elementos do capsídeo e condensação do cerne viral, o aparecimento de partículas infecciosas na forma de tijolo. Fonte: SUTTER & MOSS, 1992.

1.5.3. Uso do MVA como vacina

Dentre os vetores virais, os poxvírus têm sido um dos mais promissores para o desenvolvimento de vacina recombinante por apresentar uma série de vantagens necessárias a um bom vetor: são permissivos à incorporação de diversos genes exógenos, tem a capacidade de inserção no genoma de até 25 Kb, são eficientes na expressão destes genes em altos níveis, além de apresentar alta frequência de recombinação homóloga. Estas características são consideradas métodos de escolha para a geração de vacinas recombinantes e que, portanto, marcam o MVA como um vetor altamente atrativo para o desenvolvimento de vacinas (SUTTER et al., 2003; OKEKE et al., 2009; SIMON et al., 2010; DI LULLO et al., 2010). Além de se estabelecer como um potente vetor, outras características asseguram o MVA na produção de vacina recombinante, como a bem estabelecida segurança vacinal devido a sua avirulência e incapacidade de se multiplicar em células humanas. Por isso, o MVA é seguro em indivíduos imunocomprometidos, incluindo pacientes com a síndrome da imunodeficiência humana adquirida (AIDS) e câncer (SUTER et al., 2009). Outra desejável característica foi confirmada através da análise da resposta imune gerada contra o MVA: o vírus é incapaz de modular a resposta imune do hospedeiro. O resultado foi comparado com as amostras VACV-WR e VACV- Lister, entretanto, o perfil de ativação das células imunes foi semelhante ao grupo de camundongos controle (FONSECA et al., 2011).

Além disso, o MVA é altamente imunogênico, sendo capaz de gerar uma resposta protetora e de longa duração através da indução de células T e anticorpos. Tanto a imunidade celular quanto humoral são ativadas pelo vetor viral (LAUTERBACH et al., 2010). Estudos têm demonstrado a eficiência do MVA para gerar uma resposta imune celular, especialmente a resposta de linfócitos T citotóxicos, a qual otimiza a estratégia de controle às infecções e principalmente contra patógenos intracelulares e protozoários (MAEDA et al., 2005).

A versatilidade na produção de proteínas heterólogas para imunização fundamenta o uso do MVA em uma série de pesquisas contra várias doenças infecciosas, incluindo as parasitárias, bacterianas e virais e também contra o câncer. Múltiplos genes podem ser inseridos no genoma do MVA tornando-o favorável para o desenvolvimento de vacinas

polivalentes (SIMON et al., 2010). A **tabela 3** mostra alguns estudos do MVA como vetor de vacina.

Um registro de banco de dados (clinicaltrials.gov) mostra resultados do governo federal e de instituições privadas quanto aos ensaios clínicos realizados nos Estados Unidos e em vários lugares do mundo sobre o desenvolvimento de vacinas baseadas no uso do vírus MVA. Foram registrados 134 ensaios clínicos que avaliam a segurança e imunogenicidade do vetor, último acesso em fevereiro de 2012.

TABELA 3: Aplicações do MVA como vetor de vacina (SIMON et al., 2010; DREXLER et al., 2004).

Patógeno ou doença alvo	Antígeno alvo	Fase clínica
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	85 ^a	Ib
<i>Plasmodium falciparum</i>	ME-TRAP	I/Ia
<i>Influenza A virus</i>	NP e M1	I
HIV-1	Gag, Pol, Nef e Env	Ia
Câncer coloretal, renal e de próstata	ST4	I-III
Câncer cervical	HPV E2	I
Câncer de pulmão	MUC1	Ib
Câncer de cérebro	MUC1	I

O MVA foi desenvolvido como vacina segura contra a varíola e desde então, muitas pesquisas têm sido dedicadas à avaliar a segurança e imunogenicidade do vírus ainda para esta finalidade (DREXLER et al., 2004; JACOBS et al., 2009). A vacina IMVAMUNE está sendo desenvolvida por Bavarian Nordic, e os ensaios clínicos estão nas fases I e II. A avaliação clínica nos indivíduos vacinados demonstra alta imunogenicidade, eficácia e segurança do MVA em populações de alto risco, incluindo pessoas com diagnóstico de dermatite atópica ou infectados com HIV (JONES, 2008).

Embora o MVA tenha vantagens promissoras, é necessário avaliar os riscos. Em primeiro lugar, cuidados devem ser tomados quanto a uma co-infecção e recombinação

homóloga entre o vetor vacinal e outros OPXVs no hospedeiro. Os OPXVs que circulam ativamente na natureza contribuem para o provável cenário de uma infecção mista, sendo capazes de sofrer uma alta frequência de recombinação homóloga no citoplasma de células infectadas. Neste caso, aumenta a probabilidade de recombinação e instabilidade genética do transgene presente no vetor vacinal (OKEKE et al., 2009). Em segundo lugar, uma das principais preocupações consiste também sobre uso do MVA como vetor vacinal, considerando a pré-existência de imunidade anti OPXV, tendo em vista o uso de vacinas contra a varíola na década de 70 (DREXLER et al., 1998) e também porque nestes últimos anos vários surtos de vaccínia bovina têm sido registrados no Brasil (FONSECA et al., 2011). Embora, o número de indivíduos sem histórico de vacinação está em contínuo aumento (GUDMUNSDOTTER et al., 2009). Em terceiro lugar, deve ser avaliado o desenvolvimento da imunidade anti-vetor após a primeira dose de vacinação. Considerando que, a resposta anti-vetor interfere em resultados subsequentes à segunda inoculação, não havendo mais aumento na resposta contra o antígeno exógeno após o reforço (VASAN et al., 2010).

Diante da necessidade em estabelecer uma maneira de burlar a imunidade pré-existente em relação ao vetor, algumas alternativas têm sido consideradas nos protocolos vacinais. Por exemplo, a imunização de dose e reforço a qual emprega diferentes sistemas para a entrega do antígeno, podendo ser feita através de subunidades protéicas, vetores recombinantes ou vacinas de DNA. Está em estudo o regime dose e reforço com o uso do MVA em vacinas contra a malária e tuberculose. O resultado demonstra ser mais imunogênica este sistema de imunização pela capacidade de induzir uma resposta de células T substancialmente maior comparado à vacina de DNA ou MVA usadas sozinha. Este resultado revela que o uso de DNA na primeira vacinação e do MVA na dose de reforço induz principalmente uma resposta de células TCD4+, a qual é capaz de gerar proteção em seres humanos contra estes patógenos (WOODBERRY et al., 2003; GILBERT et al., 2006).

1.6. Ovos embrionados

1.6.1. Estrutura do ovo embrionado

O ovo embrionado de galinha, espécie *Gallus gallus*, é estruturado com a formação da casca, a qual é resistente e porosa. A casca oferece proteção contra a invasão

microbiana, controla a troca de água e gases através dos poros e constitui uma fonte de cálcio para o embrião durante o seu desenvolvimento. Além disso, a casca ameniza as flutuações de temperatura entre os componentes do ovo e seu ambiente externo. Na sequência da formação da casca, as primeiras camadas correspondem às membranas interna e externa, as quais se encontram ligadas exceto na região da câmara de ar. A membrana interna contorna o albume enquanto que a membrana externa permanece ligada à porção calcificada da casca. As membranas são semipermeáveis e permitem a troca de gases e água. A presença destas estruturas age como um filtro contra a penetração de microrganismos. A câmara de ar contribui com a função respiratória, o albume ou clara do ovo tem função de proteção contra choques e quebra do ovo, as chalazas representam uma porção do albume que sustenta a gema (saco vitelino) no centro do ovo e o disco germinativo dá origem ao embrião (**figura 12**). (BARBOSA, 2011).

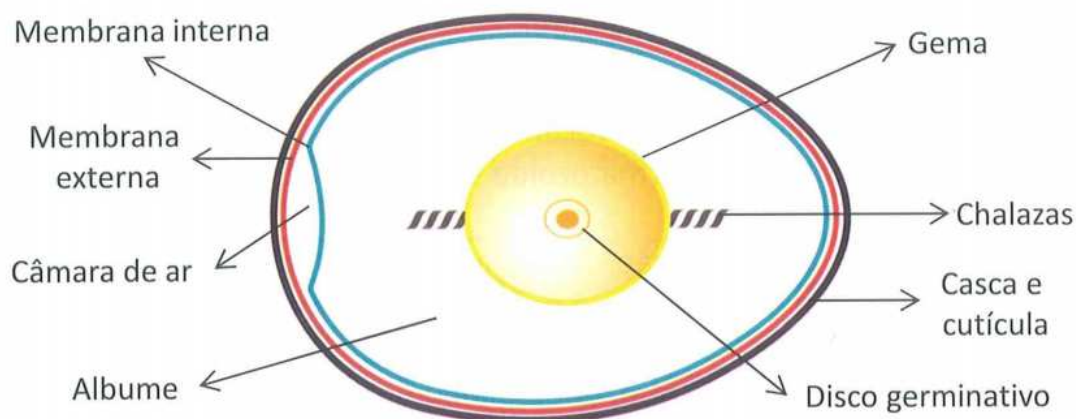


FIGURA 12: Estrutura do ovo embrionado de galinha. A estrutura do ovo compreende a casca, sendo revestida internamente pelas membranas interna e externa, com função de proteção e trocas gasosas. A câmara de ar é responsável pela função respiratória, o albume protege o embrião, as chalazas sustentam a gema no centro do ovo e o disco germinativo dá origem ao embrião. Fonte: BARBOSA, 2011.

1.6.2. Anexos embrionários, vias de inoculação viral e produção de vacinas

Três folhetos germinativos denominados endoderme, mesoderme e ectoderme determinam a formação dos anexos embrionários: saco vitelino, alantóide, âmnio e córion. O saco vitelino é uma estrutura em forma de saco cuja função é armazenar

reservas nutritivas para o desenvolvimento do embrião. E por ser altamente vascularizado, exerce função respiratória até ao quinto dia de incubação. O alantóide é um órgão de armazenamento das substâncias excretadas pelos rins até ao final da incubação, quando os resíduos secos são eliminados juntamente com o alantóide. O âmnio é uma membrana que envolve completamente o embrião com função de protegê-lo e separá-lo do meio circundante. E o córion que é o anexo embrionário mais externo ao corpo do embrião se expande e adere à parte calcária da casca, infiltra nos poros da membrana da casca, sendo responsável pela troca de gases entre o embrião e o meio externo (**figura 13A**) (BARBOSA, 2011).

A via de inoculação viral no hospedeiro e a obtenção de títulos virais dependerão do espectro de células hospedeiras (ROTT et al., 1980). No caso de pelo menos 3 gêneros de vírus: *Ortomixovirus*, *Orthopoxvirus* e *Paramixovirus*, a suscetibilidade viral aos anexos embrionários depende da ativação diferencial da hemaglutinina, por clivagem proteolítica. De acordo com a suscetibilidade viral, portanto, existem 4 vias de inoculação: a cavidade amniótica é suscetível aos ortomixovírus (vírus Influenza humano), enquanto que a cavidade alantóica aos vírus aviários (vírus Influenza e o vírus da doença de Newcastle), sendo usada também para multiplicação de vírus Influenza A humano, para preparo de vacinas. Já a membrana coriolantóica (MCA) é o anexo embrionário suscetível, por exemplo, a multiplicação de orthopoxvírus e herpesvírus simples tipo 1, sendo a multiplicação viral evidenciada através do aparecimento de lesões inflamatórias (pocks). Outra via de inoculação é o saco vitelino, utilizado para produção de vacinas contra a raiva e febre amarela (**figura 13B**) (EDWIN et al., 1979, ROOT et al., 1980).

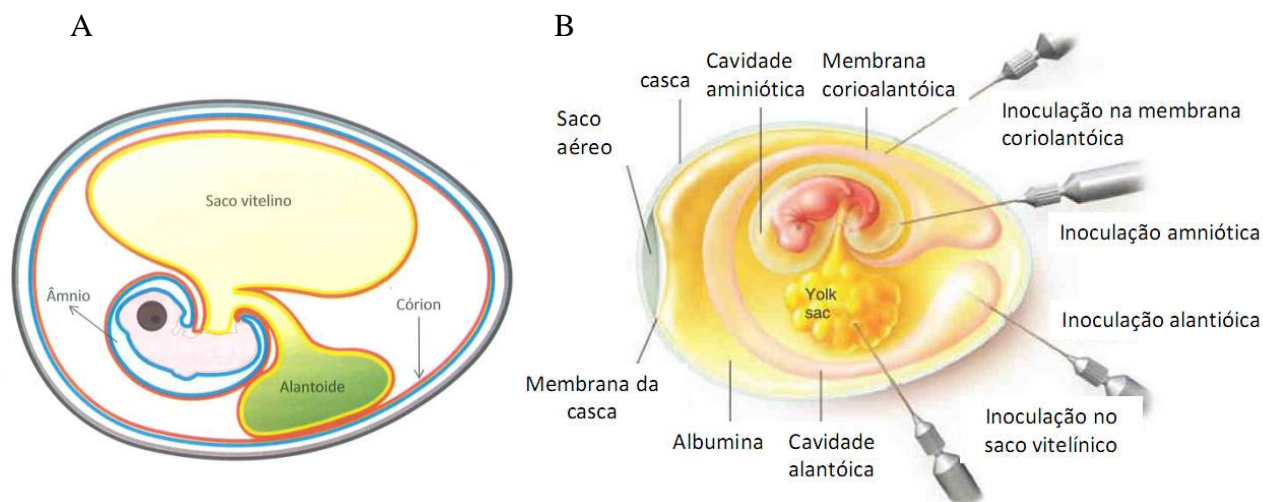


FIGURA 13: Anexos embrionários e vias de inoculação. (A) O saco vitelino acumula e transfere nutrientes ao embrião, o alantóide armazena e elimina as excretadas nitrogenadas, o âmnio protege o embrião e o córion é responsável pelas trocas de gases. **(B)** E de acordo com a suscetibilidade viral existem 4 vias de inoculação: cavidade amniótica (ortomixovírus), cavidade alantóica (vírus aviários), saco vitelino (vírus de febre amarela e da raiva) e a membrana corioalantóica (orthopoxvírus). Fonte: BARBOSA, 2011. Modificado.

A principal razão de ovos embrionados serem utilizados com frequência em pesquisas de laboratório e para produção de vacinas, é a representação de um sistema de multiplicação viral com menor custo de produção. Os vírus Influenza A e da febre amarela são bons exemplos de vírus vacinais multiplicados em ovos embrionados (HERMANN, 2003). No Brasil, desde 1937, a vacina contra a febre amarela é produzida em ovos embrionados com a amostra atenuada 17D, na Fundação Oswaldo Cruz – Bio-Manguinhos. O instituto Bio-Manguinhos é o principal fornecedor de vacinas para o ministério da saúde, e o seu portfólio de imunobiológicos é mundialmente reconhecido e utilizado (www.bio.fiocruz.br/).

1.7. Anexo embrionário suscetível à multiplicação dos *Orthopoxvirus*: MCA

1.7.1. Origem, função e constituição

As membranas extra-embrionárias se formam no quarto dia de incubação. No quinto dia, o córion e alantóide fundem-se para dar origem à membrana corioalantóide (**figura 14**). Aos 9 dias de incubação, a MCA ocupa grande parte do ovo e aos 12 dias envolve todo o conteúdo ovo, revestindo a superfície interna da casca. A MCA é altamente vascularizada e adjacente a casca, o que favorece a transferência de cálcio e outros minerais provenientes da casca para o embrião e, além disso, exerce a função de troca de gases entre o embrião e o meio externo (BARBOSA, 2011).

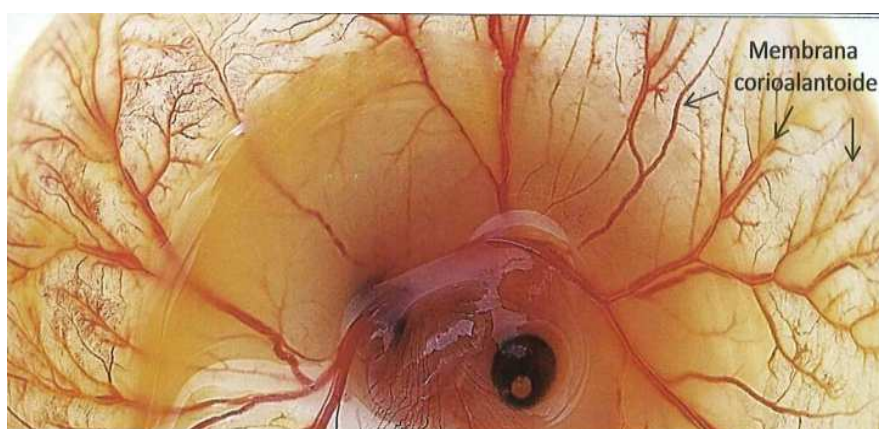


FIGURA 14: Membrana corioalantóide. Embrião aos cinco dias de incubação. Nesta etapa, córion e alantóide se fundem para dar origem à membrana corioalantóide, altamente vascularizada. Fonte: BARBOSA, 2011.

A MCA é constituída por 3 camadas de células germinativas: a ectoderme que se apresenta com duas camadas de células epiteliais (epitélio coriônico), a mesoderme com baixo número de células mesenquimais de aparência estrelada e logo abaixo situa-se endoderme (epitélio alantóico), com uma única camada espessa de células (**figura15**) (ROOT et al., 1980, NATHANIEL et al., 2004).

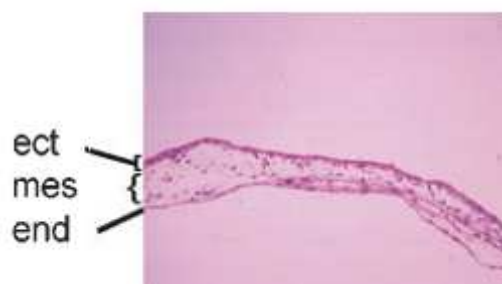


FIGURA 15: Histologia da MCA. A membrana é constituída por três camadas: endoderme (end), mesoderme (mes) e ectoderme (ect). Fonte: NATHANIEL et al., 2004.

1.7.2. Aplicações na pesquisa

A MCA representa um modelo de estudo muito atrativo devido as suas características: altamente vascularizada, localizada na periferia e, portanto, de fácil acesso, e ainda constitui um sistema que reduz e substitui o uso de animais normalmente usados na pesquisa. É um sistema que inclui simplicidade, facilidade devido aos aspectos éticos e legais, rapidez e baixo custo. A MCA tem sido intensivamente utilizada para estudar a angiogênese por se tratar de um tecido completo, incluindo artérias, veias e capilares. Nos últimos anos, este estudo foi utilizado em mais de 500 obras publicadas (RIBATTI, 2008, SAW et al., 2008, DURUPT et al., 2012). Outras aplicações de uso da MCA em pesquisa consistem em avaliar a entrega de drogas (VARGAS et al., 2007), como sistema de cultivo de helmintos (FRIED et al., 1991), representa mais um método para predizer o potencial irritante de produtos cosméticos (MYSTKOWSKA-BACZKOWSKA et al., 1995) e um formidável sistema para caracterização de estudos pré-clínicos de tumores e desenvolvimento de terapias anti-câncer com vírus recombinantes (DURUPT et al., 2012).

1.7.3. Isolamento e identificação de poxvírus

A inoculação na MCA para o cultivo de *Orthopoxvirus* foi introduzido na década de 1930 e até 1950, com o advento da cultura celular, constituiu o sistema hospedeiro de escolha para a multiplicação viral (WOLCOTT, 1940; EDWIN et al., 1979). A inoculação em MCA tornou-se uma importante técnica para isolamento e identificação de *Orthopoxvirus* devido ao fato de que diferentes espécies produzem lesões (pocks) morfológicamente distintas. Este método foi utilizado durante o programa mundial de erradicação da varíola e ainda nos dias de hoje, inclui-se como um método de identificação de *Vaccinia virus* através da caracterização da morfologia dos pocks (**figura 16**) (FENNER et al., 1988, TRINDADE et al., 2008).

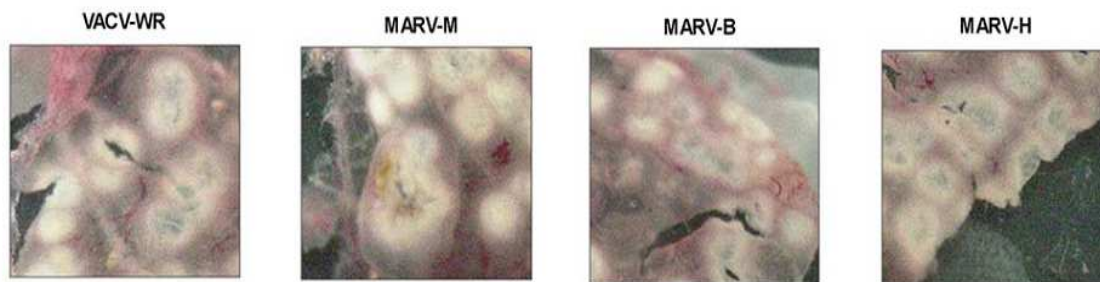


FIGURA 16: Perfil fenotípico de pocks produzidos por isolados de VACV. Amostras de VACV, denominadas Mariana virus (MARV), foram isoladas em um surto na cidade de Mariana, estado de Minas Gerais. Os isolados murino, bovino e humano foram designados por MARV-M, MARV-B e MARV-H, respectivamente. Estes isolados foram inoculados na MCA e após 72 de incubação apresentaram pocks com perfil fenotípico semelhante ao VACV-WR. Fonte: ABRAHÃO et al., 2009.

1.7.4. Característica dos pocks

As lesões produzidas no anexo embrionário pela maioria das espécies de *Orthopoxvirus* correspondem a pocks brancos não ulcerados que variam em diâmetro de 0,2 a 3mm, enquanto que outras espécies tais como o CPXV e MPXV provoca a formação de pocks hemorrágicos (**figura 17**). As variações nas lesões dependem de uma série de fatores: se ocorre ou não a indução de necrose no tecido, a invasão de leucócitos no mesoderma, a liberação de eritrócitos pelos vasos do mesoderma e da temperatura de incubação (**tabela 4**) (EDWIN et al., 1979, FENNER et al., 1988, ALI et al., 2009).

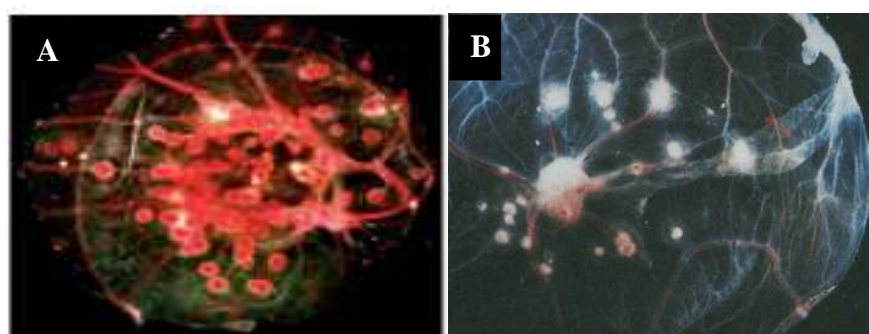


FIGURA 17: Pocks produzidos por diferentes espécies de *Orthopoxvirus*. (A) infecção na MCA por CPXV mostra lesões hemorrágicas e em (B) lesões brancas produzidas pelo CVA. Fonte: NATHANIEL et al., 2004, PALUMBO et al., 1994.

Nos pocks brancos são encontrados grande quantidade de heterófilos (leucócitos de aves), os quais estão correlacionados com a redução do nível de antígenos virais e infectividade. Entretanto, os pocks hemorrágicos apresentam pouca quantidade de células inflamatórias. E em ambas as situações, a infecção é limitada apenas pela imunidade inata, pois durante o desenvolvimento embrionário os linfócitos ainda não passaram pelo processo de maturação. (PALUMBO et al., 1989, FREDRICKSON et al., 1992, PALUMBO et al., 1994, NATHANIEL et al., 2004). Segundo PALUMBO (1994), estas características estão associadas ao mecanismo de evasão dos poxvírus. Infecções na MCA com CPXV, amostra Brighton Red (CPXV-BR) mutante, indica que há no mínimo 3 genes não-essenciais envolvidos na inibição de uma resposta inflamatória. Dentre as proteínas associadas a virulência, o estudo demonstrou a importância da proteína CrmA, a qual é anti-apoptótica, anti-inflamatória e também responsável pelo aparecimento de pocks vermelhos. A deleção deste gene induz a produção de pocks brancos com uma quantidade elevada de células inflamatórias (**figura 18**). Além das bases genéticas, a temperatura também interfere na morfologia dos pocks. Por exemplo, o MPXV induz a formação de pocks hemorrágicos a 35 °C, mas acima desta temperatura de incubação exibe pocks brancos (FENNER et al., 1988).

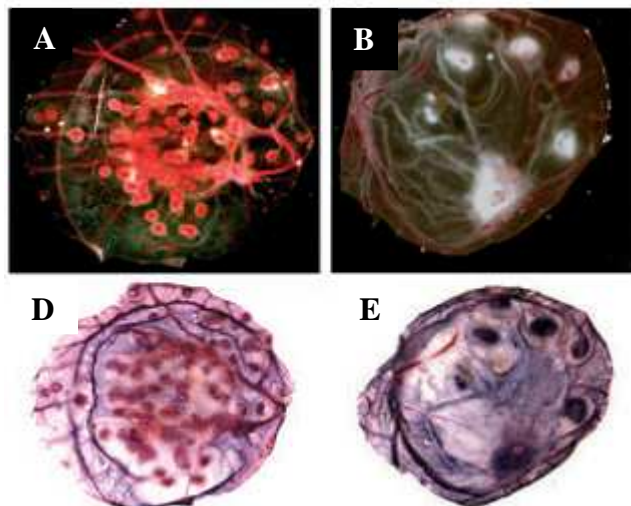


FIGURA 18: Atividade dos heterófilos detectada apenas em pocks brancos. (A) infecção na MCA por CPXV mostra lesões hemorrágicas e em (B) lesões brancas produzidas pelo vírus mutante (deleção do gene CrmA). Em (C, D) as membranas foram incubadas em corante NBT, o qual detecta a atividade dos heterófilos através da reação com os intermediários reativos de oxigênio, liberados pela atividade dos heterófilos. A coloração azul é adquirida apenas em (D) e evidencia a presença de heterófilos no local. Fonte: NATHANIEL et al., 2004.

TABELA 4: Propriedades biológicas dos pocks (KNIPE & HOWLEY, 2007).

Propriedades	Variola	Monkeypox	Vaccinia	Cowpox
Pocks na MCA	Branco pequeno opaco	Hemorrágico branco pequeno opaco	Há variação entre as amostras. Grandes, opacos branco ou hemorrágico	Grande hemorrágico
Temperatura máxima de incubação (°C)	38,5	39	41	40
Letalidade do embrião	Baixa	Média	Muito alta	Alta

1.8. Sistemas de cultivo: CEFs x MCA

Atualmente a maioria das vacinas virais é produzida em ovos embrionados. Como há uma extensa verificação experimental que explora a possibilidade de inserção do MVA em plataformas vacinais, a determinação de um sistema de multiplicação viral com menor custo de produção tornará necessária. O cultivo primário de CEFs representa o sistema hospedeiro utilizado para a multiplicação do vírus MVA e a inoculação na MCA foi colocada como possibilidade para multiplicação do vírus.

1.8.1. Cultivo primário de CEFs

O cultivo de células constitui um sistema *in vitro*, e neste sistema pode-se exercer o controle sobre as condições fisiológicas da célula, de assepsia e físico-químicas do ambiente, como: temperatura, concentração de oxigênio e gás carbônico. Quanto as condições fisiológicas, é necessário atender as exigências nutricionais da célula e isto se faz através da adição do meio de cultura apropriado e de suplementos tal como o soro fetal bovino, dentre outros. E mais, pode-se exercer controle também das condições de assepsia e assim reproduzir um sistema livre da contaminação por bactérias e leveduras.

Isto não significa, porém, que seja um sistema isento de contaminantes, mesmo com a adição de antibióticos e antifúngicos pode ocorrer a contaminação do meio. Por estes cuidados, o custo é um fator que limita o sistema de cultivo, além do tempo que se gasta no preparo de todo o sistema (FRESHNEY, 1988).

O cultivo de CEFs é preparado com fibroblastos de embriões de galinha com 9 dias de desenvolvimento. As células primárias são obtidas a partir da maceração do tecido embrionário e posterior desagregação enzimática. As células são cultivadas em frascos adequados, com meio de cultura apropriado. Portanto, trata-se de uma cultura primária, a qual é obtida diretamente de tecidos do organismo. Ao ser cultivada *in vitro* pela primeira vez, as células de uma cultura primária possui maior identidade com o tecido original, constituindo um sistema eficaz para a multiplicação de vírus (FRESHNEY, 1988).

1.8.2. Inoculação na MCA

Ovos embrionados constituem um sistema *in vivo*, e portanto, o vírus está sujeito aos mecanismos de defesa do embrião. O fluxo de células imunes é facilitado com a extensa rede de vasos sanguíneos. O que difere da cultura de células, em que o vírus está sujeito aos mecanismos de defesa das células (DURUPT et al., 2012). A inoculação é feita na superfície da ectoderme da MCA de ovos embrionados com 9 dias de desenvolvimento (**figura19**).



FIGURA 19: MCA aos 9 dias de desenvolvimento embrionário. Observa-se que a MCA está desenvolvida e ocupa grande parte do ovo. Fonte: BARBOSA, 2011.

II *Justificativa*

A vacinação é uma estratégia tradicional de controle à infecção, sendo uma das mais importantes medidas de prevenção para a saúde pública (LAUTERBACH et al., 2010). Dentre as estratégias clássicas de vacinação, a atenuação viral tem sido considerada uma estratégia promissora para o desenvolvimento de vacinas. Vacinas virais atenuadas são muito eficazes pelo fato de serem capazes de desenvolver uma resposta imune celular e humoral, proporcionando uma imunidade protetora e duradoura. Além de ter uma vantagem adicional importante: apresentam menor custo de produção por requerer apenas a multiplicação do vírus. Ao contrário de vacinas inativadas ou de subunidades proteicas, que embora sejam seguras, resultam em uma menor capacidade imunostimulatória, são de elevado custo, necessitam de doses múltiplas e adjuvantes (SIMON et al., 2010; ROBINSON, 2008).

O MVA foi obtido após uma passagem seriada de 570 vezes em cultivo primário de CEFs. Cerca de 30 Kb foram perdidos ao longo destas passagens, as quais foram responsáveis pela deleção de alguns genes imunomoduladores e por uma acentuada redução no espectro de hospedeiros. Este processo de atenuação garantiu o uso do MVA como vacina atenuada na década de 1970 contra a varíola, conferindo segurança vacinal e imunogenicidade (WYATT et al., 2004; SUTER et al., 2009).

Hoje, o MVA está sendo desenvolvido como um vetor de vacina e está sob investigação clínica por conferir um perfil de segurança dificilmente observado em vacinas vivas. A avirulência e segurança vacinal residem, principalmente, em sua deficiência de se multiplicar em células humanas. Por isso, o MVA é seguro em indivíduos imunocomprometidos. Além de serem considerados vetores poderosos por servirem como um sistema de entrega de genes heterólogos altamente eficaz, por expressar esses genes em altos níveis, pela capacidade de inserção no genoma de até 25 Kb e por gerar um transgene estável (SUTTER et al., 2003; LAUTERBACH et al., 2010). Por estes motivos, muitas pesquisas têm sido dedicadas para o desenvolvimento do MVA como modelo vacinal contra uma ampla gama de patógenos (JACOBS et al., 2009; LAUTERBACH et al., 2010).

Dessa forma, considerando todas as vantagens do MVA como vetor vacinal, o objetivo deste estudo será determinar o sistema apropriado à multiplicação do vírus para

produção de vacinas. Portanto, a perspectiva é comparar a eficiência multiplicativa do MVA em CEFs e MCA, considerando ser extremamente vantajosa a multiplicação viral em MCA do ponto de vista econômico (HERMANN, 2003). Este estudo visa adequação à indústria que requer velocidade de produção, segurança e baixo custo.

III *Objetivos*

3.1- Geral

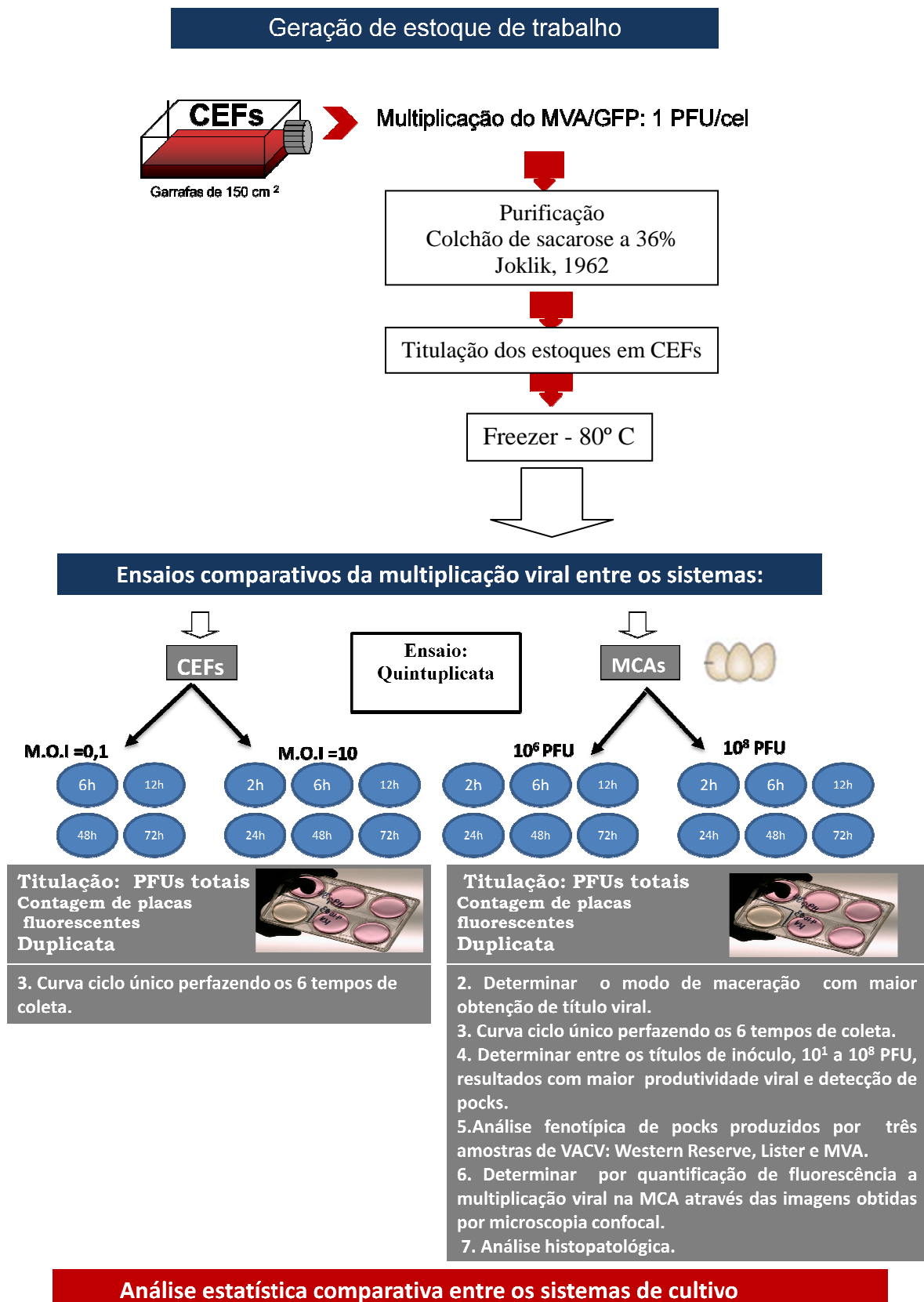
- Comparar a eficiência multiplicativa do vírus MVA em fibroblastos de embrião de galinha (CEFs) e membrana corioalantóica (MCA).

3.2- Específicos

- Gerar curvas de ciclo único, do vírus MVA em CEFs, utilizando inóculos de alta e baixa M.O.I.
- Gerar curvas de ciclo único, do vírus MVA em MCA, utilizando inóculos análogos ao inóculo em CEF, com alta e baixa M.O.I.
- Determinar o modo de maceração das MCAs.
- Determinar o título de inóculo com maior produtividade viral.
- Análise fenotípica de pocks produzidos por três amostras de VACV: VACV-WR, VACV- Lister e MVA.
- Determinar por quantificação de fluorescência a multiplicação viral na MCA através das imagens obtidas por microscopia confocal.
- Análise histopatológica da MCA

IV *Materiais e métodos*

4.1. Fluxograma de trabalho



4.2. Células e Vírus

4.2.1. Células Fibroblásticas de Embriões de Galinha (CEFs)

Células fibroblásticas de embriões de galinha foram obtidas a partir de ovos embrionados (*Gallus domesticus*) com nove dias de desenvolvimento. Após a higienização com álcool 70%, a casca foi removida até a linha da câmara de ar e a membrana da casca retirada, expondo o embrião. Os embriões foram removidos com cuidado para não romper o vitelo e colocados em uma placa de Petri contendo meio mínimo essencial autoclavado (MEM GIBCO™) sem soro fetal bovino (SFB), suplementado com NaHCO_3 a 0,225%, 2 mM L-glutamina, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$). A cabeça e os membros superiores e inferiores dos embriões foram retirados e descartados com o auxílio de uma tesoura e pinça cirúrgicas estéreis. As carcaças foram transferidas para outra placa de petri contendo MEM sem SFB, para remoção do excesso de sangue. Logo após, estas carcaças foram colocadas em uma seringa de 10 mL (sem agulha) e pressionadas fortemente com o êmbolo para o interior de um béquer. Foi adicionado nesse béquer 1 mL de solução de tripsina/EDTA (136 mM NaCl; 5mM KCl; 55 mM glicose; 69 mM NaHCO_3 ; 0,5 g p/v de tripsina 1:250 (Difco); 0,5 mM EDTA; vermelho de fenol a 1%) por carcaça, sob agitação constante, durante 15 minutos. A ação da tripsina foi interrompida com a adição de igual volume de meio Eagle modificado por Dulbeco (DMEM/Sigma), autoclavado, com 10 % de SFB (Cultilab) e acrescido de antibióticos e antimicótico (Anfotericina B 2 $\mu\text{g/mL}$). A suspensão foi posteriormente filtrada em um béquer com gaze para remoção de fragmentos sólidos da carcaça e centrifugada a 3.500g por 5 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 15 mL de meio DMEM com 10 % de SFB. E por mais 3 vezes, a centrifugação foi repetida para que o excesso de sangue fosse retirado. As garrafas foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO_2 para obtenção da confluência da monocamada (**figura 20**).



FIGURA 20: Cultura de células fibroblásticas de embrião de galinha. Imagem obtida no microscópio de fluorescência evidencia a morfologia fusiforme da célula, aumento 40x.

4.2.2. Amostra de vírus

O MVA parental foi cedido pelo Dr. Bernard Moss (Laboratory of Viral Diseases, NIAID, National Institutes of Health – NIH, EUA), na passagem número 581.

O vírus recombinante MVA/GFP é o vetor viral que codifica a proteína verde fluorescente (GFP), o qual foi construído por Danielle Soares de Oliveira Daian (Laboratório de Virologia Básica e Aplicada/Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Minas Gerais - LVBA/ICB/UFMG). Como o MVA não gera efeito citopático (ECP) visível como, por exemplo, produção de placas de lise, a multiplicação viral é evidenciada pelo aparecimento de clones verdes fluorescentes.

4.3. Ovos embrionados

Os ovos embrionados de galinha (*Gallus domesticus*) foram obtidos com 9 dias de desenvolvimento na granja Rivelli (Mateus Leme-MG). Os ovos foram mantidos no LVBA/ICB/UFMG, em estufa, a uma temperatura de 37 °C para induzir a embriogênese, em umidade constante, sem CO₂, até o momento da inoculação.

4.4. Multiplicação viral

O estoque de vírus MVA/GFP foi obtido a partir da multiplicação em monocamadas de CEFs distribuídas em 20 garrafas de 150 cm², contendo cerca de 5,0 x 10⁷

células/garrafa. As monocamadas de células confluídas foram lavadas uma vez com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1X (1,5 mM NaCl; 40 mM Na₂HPO₄; 20 mM KH₂PO₄; pH 7,2) e infectadas com multiplicidade de infecção (MOI) de 1 PFU/célula (uma unidade formadora de placa por célula). Após uma hora de adsorção do vírus diluído em 5 mL de meio DMEM 10% com antibiótico e antimicótico, foram acrescentados 20 mL do mesmo meio. A seguir, as células foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂ por 48 horas. Após as 48 horas de incubação, as monocamadas foram visualizadas no microscópio de fluorescência para certificação da confluência e após coletadas através da raspagem juntamente com o meio. Posteriormente foi feita a centrifugação a 3500g, a 4 °C por 5 minutos. O sedimento obtido foi congelado a – 80 °C para a purificação.

4.5. Purificação Viral (JOKLIK, 1962)

Os vírus inoculados em garrafas de 150 cm² para obtenção de estoques-trabalho foram purificados. O sedimento obtido e anteriormente armazenado a -70 °C, foi inicialmente congelado e descongelado por três vezes (para lise celular e liberação das partículas), suspenso em 8 mL de tris-HCl 10 mM pH 8,0, homogeneizado e centrifugado a 3500g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e reservado em tubo falcon estéril de 50 mL em banho de gelo. O sedimento obtido foi posteriormente suspenso em 10 mL de solução de lise (MgCl₂ 1 Mm, tris-HCl 10 mM pH 7,6, KCl 10mM) e incubado em gelo por 10 minutos. A suspensão foi homogeneizada em Douncer (homogeneizador de vidro) por 80 manipulações e centrifugada a 3500 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e adicionado ao anterior. O mesmo procedimento adotado anteriormente será realizado novamente, entretanto, o sedimento suspenso em apenas 8 mL de solução de lise. A mistura de todos os sobrenadantes resultou em um total de aproximadamente 26 mL de suspensão viral. A um tubo de ultracentrífuga, foi adicionado 10 mL de colchão de sacarose a 36% em Tris-Hcl e o sobrenadante foi acrescentado pela parede do tubo com o auxílio de uma pipeta Pasteur para que houvesse cuidado em não misturá-lo com a solução do colchão de sacarose. A seguir, a centrifugação foi feita a 14.000 g, 4 °C por 2 horas em uma ultracentrífuga Sorvall WX. Com o auxílio de uma pipeta p1000, a interface contendo os restos celulares foi desprezada e por último o sobrenadante e a sacarose. O sedimento, contendo as

partículas virais, foi suspenso em 700 μL de tris-HCl 10mM, pH 8,0 e distribuídos em alíquotas de 20 μL /eppendorf. O título obtido foi de $8,0 \times 10^{10}$ PFU/mL. As alíquotas foram armazenadas a -80°C para subsequente titulação e uso.

4.6. Titulação viral

A suspensão viral foi submetida a sonicação por três ciclos de 30 segundos entre sonicador, vortex e gelo. Após a sonicação o vírus é diluído em meio DMEM a 2,5 % de SFB, em um sistema de diluições seriadas na base 10. O ensaio foi realizado em duplicata, utilizando-se placas de 6 wells com aproximadamente 10^6 células/well. O meio foi desprezado das placas, a monocamada com cerca de 90% de confluência foi lavada com 1000 μL de PBS 1X e por fim, 450 μL das diluições seriadas de 10^{-5} a 10^{-9} foram adicionadas nas 5 câmaras de cada placa. Uma das seis câmaras da placa foi reservada para o controle de célula (controle negativo), na qual foi acrescentado 450 μL de DMEM com 2,5 % de SFB. A adsorção foi realizada por 1 hora, a 37°C em atmosfera de 5 % de CO_2 e as placas homogeneizadas a cada dez minutos. Após uma hora de adsorção, é acrescentado meio DMEM com 2,5% de SFB, completando o volume para 2 mL/ câmara.. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5 % de CO_2 por 48 horas. Após as 48 horas, o título viral foi expresso pela contagem de placas fluorescentes verdes (clones), passíveis de contagem ao microscópio de fluorescência sob a excitação de luz ultravioleta. A câmara cuja diluição apresentou entre 30 e 300 clones foi usada para expressar o título viral. O ensaio foi feito em duplicata, a média de clones foi multiplicada pelo inverso da diluição e pelo fator de correção. Como o título viral é dado em PFU/mL e se o volume da adsorção foi de 450 μL , o fator de correção é de 2,2.

4.7. Sistemas de Cultivo

4.7.1. Infectividade viral em cultivo primário de CEFs

Para as análises comparativas da multiplicação viral, todo o ensaio foi feito em quintuplicata. Monocamadas de CEFs em garrafas de 25cm^2 , contendo cerca de 1×10^7 células, foram infectadas com M.O.I de 0,1 e 10. As monocamadas de células

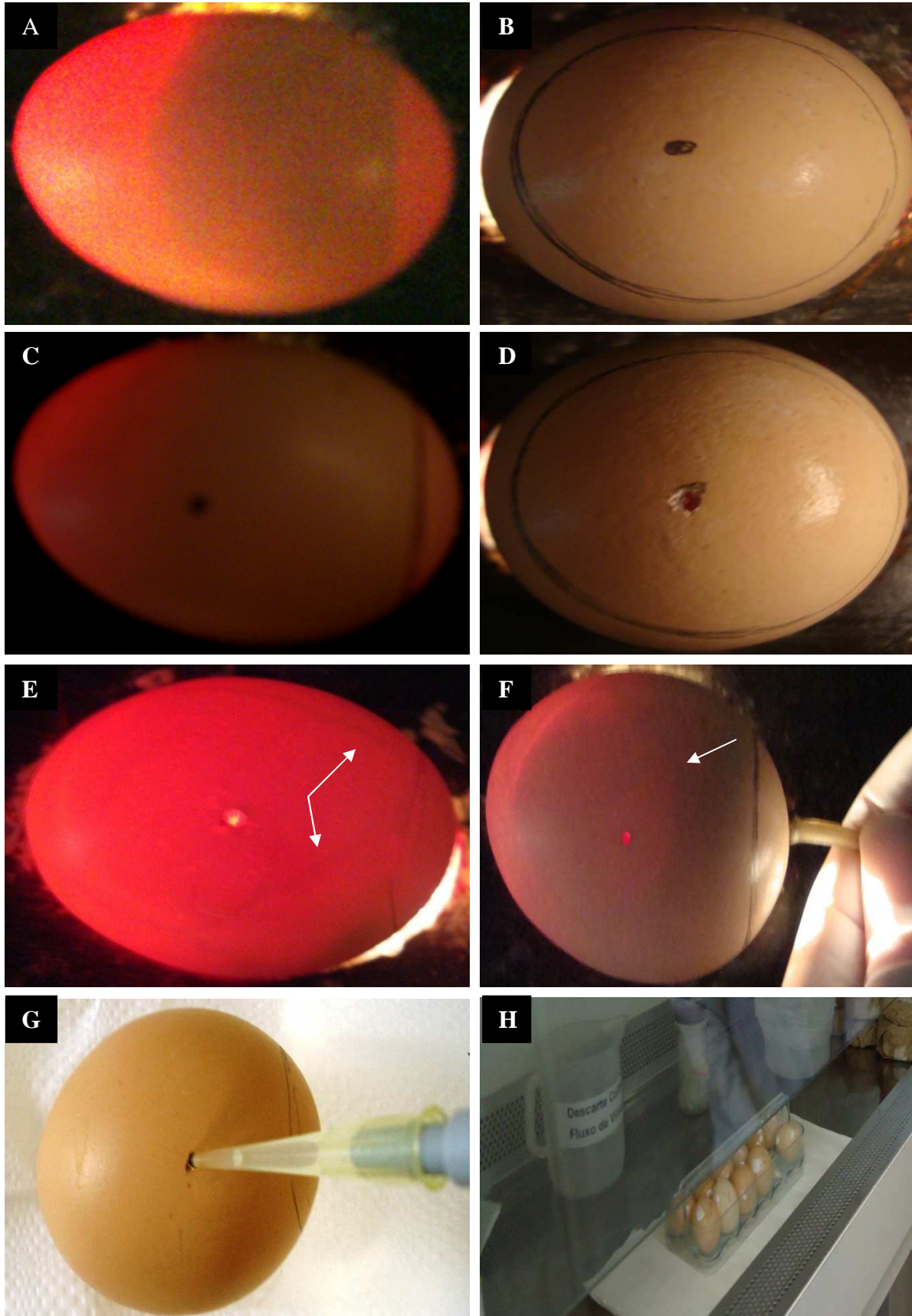
confluídas foram lavadas uma vez com PBS 1X. A adsorção foi realizada em volume de 1 mL de meio DMEM 2,5 % de SFB com antibiótico e antimicótico, sob agitação a cada 10 minutos durante 1 hora. Após uma hora de adsorção, foram acrescentados 4 mL de meio. A seguir, as células foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂ e as monocamadas foram coletadas após 2, 6, 12, 24, 48 e 72 horas de infecção. Com o auxílio de raspadores de silicone estéreis e descartáveis as monocamadas foram raspadas junto ao meio da garrafa e posteriormente foi feita a centrifugação a 3000g, a 4 °C por 5 minutos. O sedimento obtido foi suspenso em 500 µL de meio DMEM 2,5% de SFB e congelado a – 80 °C até o momento da titulação viral. A titulação segue o mesmo procedimento do item anterior.

4.7.2. Infectividade viral na MCA

No segundo momento, foi feita a inoculação na MCA de ovos embrionados com nove dias de desenvolvimento e todo o ensaio foi realizado em quintuplicata. Os ovos foram incubados em estufa a 37 °C para induzir a embriogênese, em umidade constante, sem CO₂, até o momento da inoculação. Os ovos foram higienizados com álcool 70% e após, com o auxílio de um ovoscópio, foram iluminados para verificar a viabilidade dos embriões e também para determinar a posição do embrião e da câmara de ar (**figura 23A**). A câmara de ar e outro em local que não tenha vaso sanguíneo foram marcados com lápis. (**figura 23B, C**). Posteriormente, foi feito um furo na câmara de ar e em cima do ovo nos locais marcados, tomando o cuidado para que o furo não atingisse nenhum vaso sanguíneo. (**figuras 23D, E**). Com uma mangueira, o ar da câmara de ar é puxado e em seguida foi observado no ovoscópio o deslocamento da membrana para que neste ponto fosse feita a inoculação viral. (**figura 23 F**). A mesma proporção de partículas virais utilizadas nas infecções do cultivo de CEFs foi usada para infectar a MCA, sendo correspondente a baixa e alta MOI à 10⁶ e 10⁸ PFU, respectivamente.

O vírus foi diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1X, completando o volume de inóculo para 100 µL por ovo embrionado e a inoculação foi feita utilizando uma pipeta p100. Os orifícios feitos na câmara de ar e no local da inoculação viral foram fechados com fita adesiva. Os ovos embrionados foram incubados em estufa a 37 °C e após incubação de 2, 6, 12, 24, 48 e 72 horas, foram brevemente colocados a -4 °C por 24 horas. (**figura 23 G**). Em seguida, as MCAs foram coletadas (**figura 23 H, I**).

Com auxílio de uma pinça, os ovos foram abertos a partir do orifício feito na câmara de ar. O embrião é retirado, e um próximo corte foi feito no lado oposto da infecção para retirar todo o interior do ovo, tomando o cuidado para não romper a gema e a membrana. Aproveitando o corte, a membrana é recortada junto com a casca, de modo que apenas o local próximo da inoculação seja recolhido. A membrana foi lavada duas vezes com PBS 1X em placa de petri, fotografada, pesada e armazenada a -80 °C em pequeno volume de PBS.



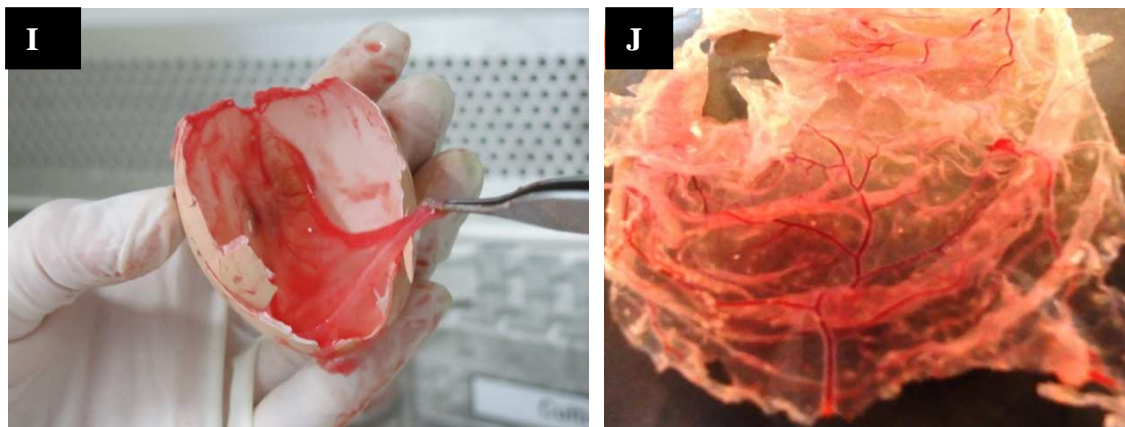


FIGURA 21: Inoculação na MCA. Os ovos foram iluminados com o auxílio de um ovoscópio para determinar a posição do embrião e da câmara de ar (A). A câmara de ar e um ponto na câmara de ar são marcados com lápis (B). Do outro lado, sendo observado ausência de vaso sanguíneo, também foi marcado com lápis (C). Posteriormente, foi feito um furo na câmara de ar e em cima do ovo nos locais marcados. A seta aponta os vasos sanguíneos (D, E). Com uma mangueira, o ar da câmara de ar foi puxado. É observado que a membrana se encontra deslocada, indicado por seta (F). A inoculação foi feita com 100 μ L da suspensão viral, no orifício em que a membrana foi deslocada (G). Após incubação de 2, 6, 12, 24, 48 e 72 horas, a membrana foi coletada, lavada em PBS, fotografada e pesada (H, I, J).

4.7.3. Construção de curvas ciclo único do vírus MVA multiplicado em CEFs e MCA

Para cada tempo de coleta de 2, 6, 12, 24, 48 e 72 horas, a titulação foi feita como descrito anteriormente, perfazendo-se um total de 6 pontos para a geração da curva de ciclo único. Os gráficos foram feitos através do software GraphPad Prism versão 5.0, à partir da média de 5 amostras por tempo.

4.8. Infecção na MCA para determinar o modo de maceração

Para determinar o modo de maceração com maior obtenção de título viral, 2 grupos de ovos embrionados ($n=5$) foram infectados com 10^7 partículas virais e as MCAs foram coletadas após 48 horas. Para facilitar o processamento das amostras, com destruição do tecido e liberação das partículas virais, as membranas foram congeladas e descongeladas por três vezes. Utilizando um almofariz e um pistilo estéril por membrana, 5 amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e as outras 5 amostras com areia autoclavada. O líquido obtido do macerado foi congelado e descongelado por

mais três vezes e posteriormente foi centrifugado a 3500g por 5 minutos, 4 °C. O sedimento foi descartado e o sobrenadante coletado para posterior titulação.

4.9. Titulação das amostras MCA

Após o processo de maceração das amostras e de acordo com o peso da membrana, 9 partes do peso da membrana foram acrescentadas em volume de PBS e assim foi feita uma diluição na base 10. Este procedimento foi utilizado para corrigir a diferença entre os pesos. O sobrenadante coletado foi titulado em CEFs conforme o protocolo de titulação viral e o título viral foi definido pelo quociente do volume total do espécime processado pelo volume de adsorção, multiplicado pela média de clones e pelo inverso da diluição. O título viral foi calculado em PFUs totais.

4.10. Ensaio de produtividade viral e detecção de pocks na MCA após diferentes títulos de infecção

Ovos embrionados foram infectados com 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^7 PFUs (n=5/título viral), afim de correlacionar com a detecção de pocks e obtenção de título viral. As MCAs foram coletadas após 72 horas de infecção, pesadas, fotografadas e armazenada a – 80 °C. O macerado das membranas foi titulado em CEFs conforme protocolo estabelecido.

4.11. Infectividade viral na MCA para detecção de pocks por três amostras de VACV

Para analisar as lesões produzidas pelas amostras Western Reserve (WR), Lister (LST) e MVA na MCA, ovos embrionados com 9 dias de desenvolvimento foram infectados com 10^4 PFUs (n=5/amostra viral) e as MCAs foram coletadas após 72 horas. Os pocks foram medidos com o auxílio de um paquímetro, instrumento de medida com escala em milímetro.

4.12. Aquisição, processamento e análise das imagens

Entre os instrumentos de aquisição de imagens foram utilizados o microscópio de fluorescência, microscópio confocal e câmera fotográfica. Para a aquisição das imagens por microscopia de fluorescência foi utilizado o software Image Pro-plus e para o

processamento e análise das imagens coletadas pela microscopia confocal o software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

4.12.1. Microscopia confocal

O experimento foi realizado no Laboratório de Biofotônica/Departamento de Física/UFMG sob a coordenação da Prof^a. Ana Maria de Paula. As imagens de fluorescência foram obtidas utilizando um microscópio confocal, no módulo de varredura, modelo FV300, acoplado ao microscópio óptico modelo BX6, fabricante Olympus e objetiva de 1X. Foram utilizados 2 lasers: o laser de Argônio com comprimento de onda em 488 nm, acoplado a um filtro de 510-540 nm para selecionar a fluorescência do GFP e o laser de luz transmitida. As imagens da MCA obtidas pelo laser de luz transmitida são apresentadas em preto e branco e apenas auxiliaram na confirmação dos pontos de coleta das imagens.

4.12.2. Quantificação de fluorescência

As imagens, por microscopia confocal, foram obtidas com as mesmas configurações para que intensidade de fluorescência fosse determinada. As imagens estão em formato TIFF, 16 bits (65.536 tons de cinza), 512x 512 pixels, o que corresponde a uma área de 1,6 x 1,6 cm. Foram analisadas as medidas da área em cm^2 para que fosse determinado o quanto o vírus se espalha na MCA. A intensidade de fluorescência das imagens foi analisada pelo software ImageJ e sua quantificação foi estabelecida pelo valor médio de cinza.

4.13. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism versão 5.0. Todos os resultados foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov (KS) e intervalo de confiança 95%.

Os resultados do modo de maceração foram obtidos através do teste paramétrico T de Student pareado e os resultados são expressos em média \pm Erro Padrão da Média (EPM). Os dados submetidos ao teste de normalidade KS, apresentou distribuição de Gauss normal, razão pela qual foi usado o teste T paramétrico pareado.

Os resultados das características dos pocks das três amostras de VACV foram submetidos ao teste de normalidade KS, não apresentou distribuição de Gauss normal devido ao pequeno número de amostras, razão pela qual foi usado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, Anova de uma via, e o pós-teste Dunn's para comparação múltipla. Foi feita a comparação entre as amostras VACV-WR e Lister, VACV-WR e MVA, Lister e MVA. Os resultados são expressos em mediana \pm Erro Padrão da Média (EPM) e intervalo de confiança 95%.

Os resultados que estabeleceram a produtividade viral, após os títulos de infecção de 10^1 a 10^8 PFU, foram submetidos ao teste de normalidade KS, apresentou distribuição de Gauss normal, razão pela qual foi usado o teste paramétrico Anova com análise de variância de uma via.

Os resultados da análise comparativa da multiplicação viral entre os sistemas de cultivo MCA e CEFs, após infecção com 10^6 e 10^8 PFU, foram submetidos ao teste estatístico Anova de duas vias e o pós-teste de Bonferroni para comparar as médias entre os grupos de cada tempo. Quanto ao teste de normalidade, apresentou distribuição de Gauss normal. Quanto à significância é admissível variância entre os sistemas de cultivo de até 19%.

Com relação a significância, foi utilizado os seguintes critérios para expressar o valor P:

- * Quando o valor de P for menor que 0,05
- ** Quando o valor de P for menor que 0,01
- *** Quando o valor de P for menor que 0,001

4.14. Processamento das amostras para análise histopatológica

O experimento foi realizado no Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Morfologia, sob a orientação do Prof. Gustavo Menezes. Para realização de cortes histológicos, fragmentos da membrana corioalantóica foram fixados em formol tamponado a 10% por 24 horas e depois processados para a técnica de inclusão em parafina que consiste em desidratação crescente em álcool, diafanização por xilol e embebição em parafina. Foram realizados cortes histológicos de 5µm de espessura e corados por Hematoxilina e Eosina para avaliação histológica. Enquanto que as análises foram feitas pela Prof^a. Milena, Departamento de Patologia.

V *Resultados*

5.1. Infecção na MCA para determinar do modo de maceração

Para este experimento foram infectados 10 ovos embrionados com 10^7 PFU e as MCAs foram coletadas após 48 horas de infecção. O objetivo foi determinar o modo de maceração com maior obtenção de título viral. As membranas foram divididas em 2 grupos (n=5), sendo o primeiro grupo de MCAs macerado com nitrogênio líquido, N_2 (L), e o outro com areia autoclavada. Após a maceração, foi feita a titulação e os títulos médios obtidos foram de $1,3 \times 10^9$ PFU/g e $5,1 \times 10^8$ PFU/g, respectivamente. Apesar da relativa aparência de maior título viral das amostras maceradas com N_2 (L), não houve diferença estatística significativa entre os dois modos de maceração (**figura 22**). Entretanto, o procedimento de maceração adotado para os experimentos de titulação das MCAs foi com nitrogênio líquido.

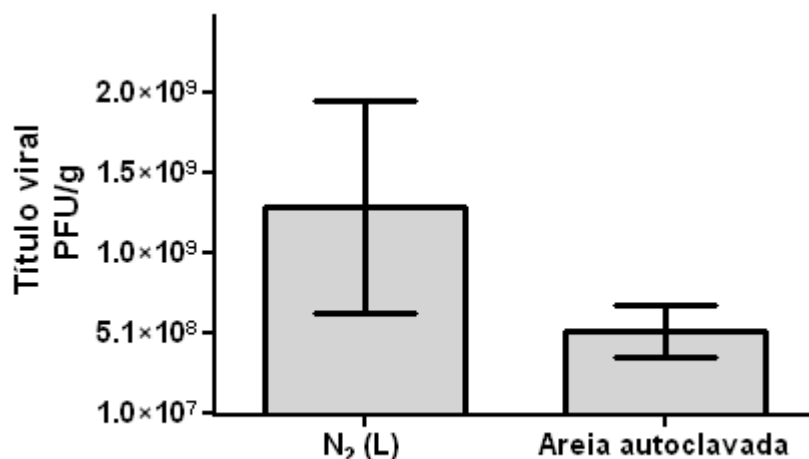


FIGURA 22: Títulos virais obtidos por dois modos de maceração: nitrogênio líquido e areia autoclavada. Foram infectados 5 ovos embrionados por modo de maceração, com 10^7 PFU e as MCAs foram coletadas após 48 horas. O macerado das membranas foi titulado em CEFs. Os títulos virais foram calculados em PFU/g. Foi usado o teste T paramétrico não pareado e os resultados são expressos em média \pm Erro Padrão da Média (EPM). $P > 0,05$, portanto, os resultados obtidos pelos dois modos de maceração não são estatisticamente diferentes.

5.2. Produtividade viral em cultivo primário de CEFs

Para análise comparativa da multiplicação do MVA entre os dois sistemas de cultivo, monocamadas confluídas de CEFs em garrafas de 25cm^2 foram infectadas com MOI de 0,1 e 10, o correspondente a 10^6 PFU e 10^8 PFU, respectivamente. As monocamadas de

CEFs foram coletadas nos tempos de 2, 6, 12, 24, 48 e 72 horas. Todo o ensaio foi feito em quintuplicata e os resultados foram obtidos a partir da média de dados da titulação. Os títulos virais calculados em PFUs totais estão representados nas curvas de crescimento ciclo único, perfazendo os tempos de infecção de 2, 6, 12, 24, 48 e 72 horas (**figura 23**). Os títulos médios obtidos após infecção com MOI 0,1 foram de 1×10^6 PFU (2 horas), 2×10^6 PFU (6 horas), 1×10^8 PFU (12 horas), 6×10^8 PFU (24 horas), 3×10^9 PFU (48 horas) e 5×10^9 PFU (72 horas). Entretanto, após infecção com MOI de 10 os títulos médios obtidos foram de $2,3 \times 10^7$ PFU (2 horas), $6,7 \times 10^7$ PFU (6 horas), 1×10^9 PFU (12 horas), $2,5 \times 10^9$ PFU (24 horas), $1,8 \times 10^9$ PFU (48 horas) e 2×10^9 PFU (72 horas.). Com estes resultados conclui-se que, após infecção com 10^6 PFU, houve uma produtividade viral de 3 unidades logarítmicas, sendo crescente a obtenção de título viral em até 72 horas de infecção. Entretanto, em infecções com 10^8 PFU foi observado baixa produtividade, com um aumento de título de uma unidade logarítmica.

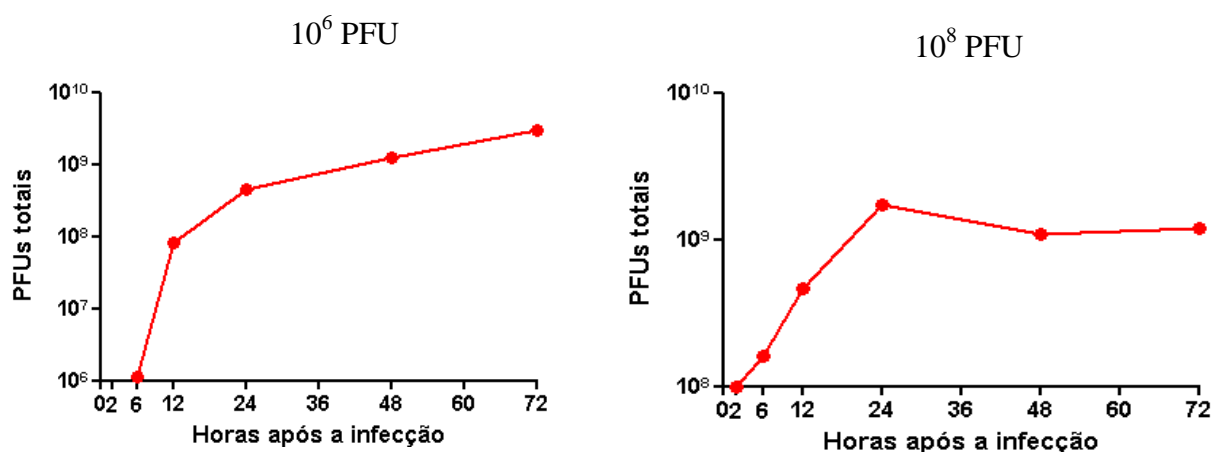


FIGURA 23: Curvas de crescimento ciclo único do vírus multiplicado em CEFs, após infecção com 10^6 e 10^8 PFU. O perfil de multiplicação viral é crescente após infecção com 10^6 PFU, enquanto que em infecção com 10^8 PFU é observado baixa produtividade viral.

Conforme o procedimento de titulação feito através da contagem de clones verdes fluorescentes no microscópio de fluorescência, a **figura 24** mostra o padrão de expressão da proteína GFP após infecção com 10^6 PFU (**figura 24 A-G**) e 10^8 PFU (**figura 24 H-P**). Foi observado que, na infecção com 10^6 PFU os clones apareceram com uma discreta expressão de GFP em até 12 horas após a infecção e que a partir deste tempo os clones foram numerosos e de fluorescência forte. Em contraste, na infecção com MOI de 10 os clones já apareceram com intensidade em todos os tempos de infecção.

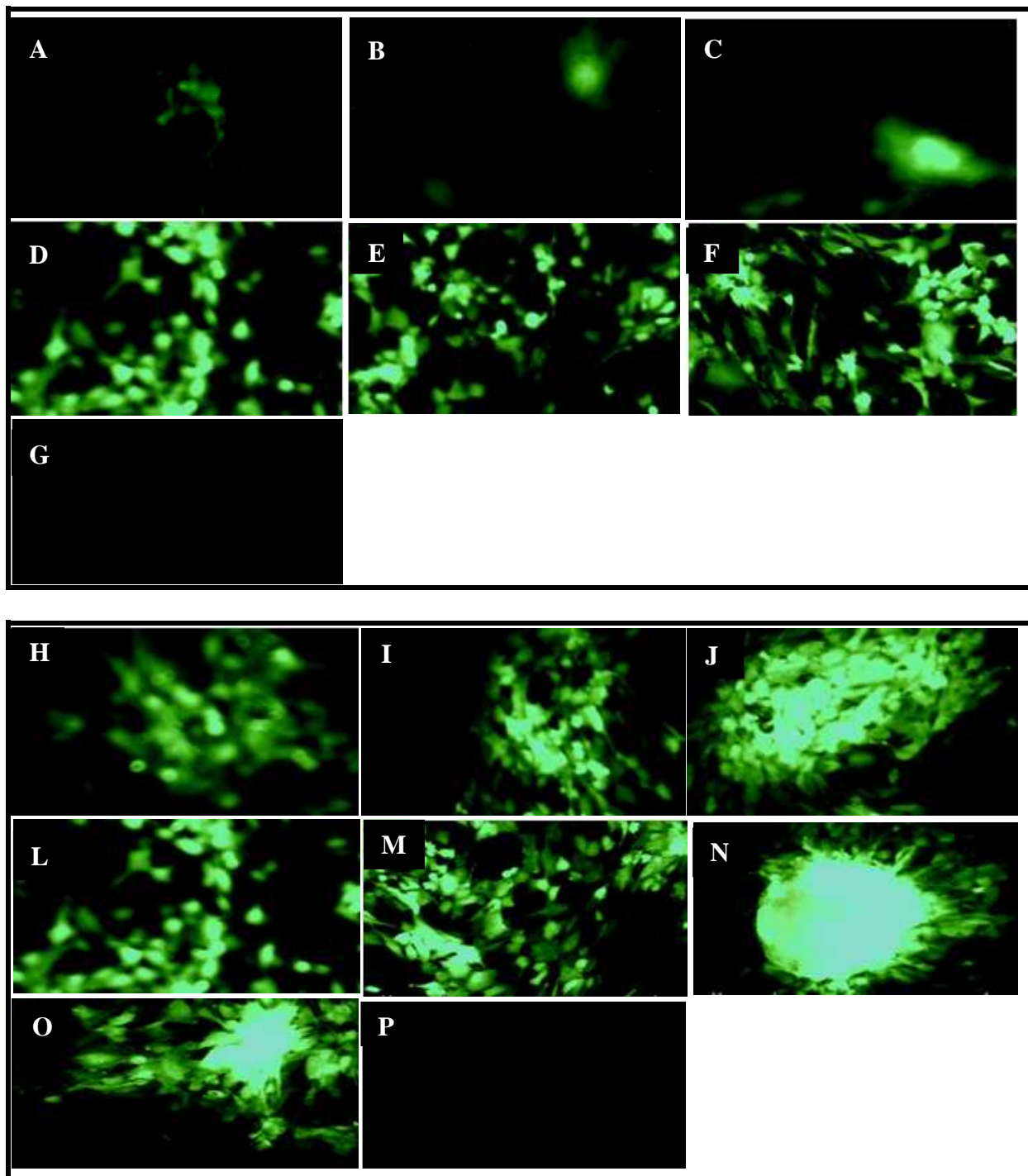


FIGURA 24: Titulação viral obtida pela contagem de clones verdes fluorescentes do vírus multiplicado em cultivo de CEFs. As imagens foram obtidas pelo microscópio de fluorescência, objetiva de 40x. Monocamadas de CEFs infectadas com MOI de 0,1 foram coletadas nos tempos de 2 (A), 6 (B), 12 (C), 24 (D), 48 (E) e 72 (F) horas e posteriormente tituladas. (G) representa o controle negativo. Foi observado que, na baixa MOI os clones apareceram com uma discreta expressão de GFP em até 12 horas após a infecção e que a partir deste tempo os clones foram numerosos e de fluorescência forte. Em contraste, na infecção com MOI de 10 os clones já apareceram com intensidade, sendo numerosos e de fluorescência forte no tempo de 2 (H) horas após a infecção. Os tempos de infecção de 6 (I), 12 (J), 24 (L), 48 (M, N) e 72 (O) horas mostram imagens com o mesmo padrão. A imagem (N) mostra a intensidade de expressão do GFP em um clone e (P) representa o controle negativo.

5.3. Produtividade viral na MCA

Da mesma maneira que o ensaio anterior, os resultados foram obtidos a partir da média de dados da titulação. Os títulos virais calculados em PFUs totais estão representados nas curvas de crescimento ciclo único, perfazendo os tempos de infecção de 2, 6, 12, 24, 48 e 72 horas (**figura 25**). Os títulos médios obtidos após infecção com MOI 0,1(10^6 PFU) foram de $1,5 \times 10^6$ PFU (2 horas), $9,2 \times 10^6$ PFU (6 horas), $2,4 \times 10^8$ PFU (12 horas), $3,2 \times 10^8$ PFU (24 horas), $1,4 \times 10^8$ PFU (48 horas) e $2,8 \times 10^8$ PFU (72 horas). Entretanto, em infecções com 10^8 PFU os títulos médios obtidos foram de 1×10^8 PFU (2 horas), 2×10^8 PFU (6 horas), $2,3 \times 10^8$ PFU (12 horas), $2,6 \times 10^8$ PFU (24 horas), $2,1 \times 10^9$ PFU (48 horas) e 1×10^9 PFU (72 horas). Com estes resultados conclui-se que, após infecção com 10^6 PFU, ocorre um aumento de título de 2 unidades logarítmicas. Entretanto, em infecções com 10^8 PFU foi observado baixa produtividade viral, com um aumento de título de uma unidade logarítmica.

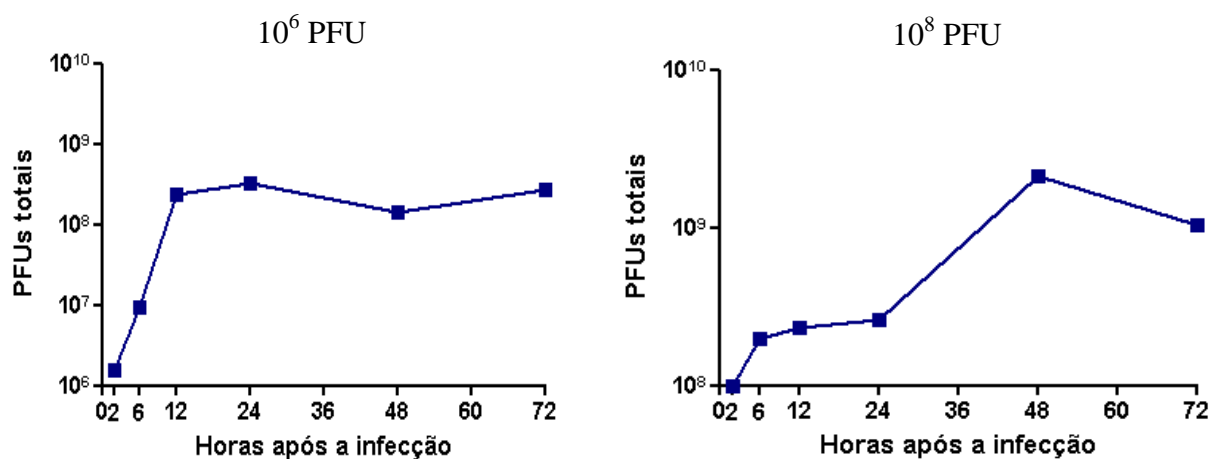


FIGURA 25: Curvas de crescimento ciclo único do vírus multiplicado na MCA, após infecção com 10^6 e 10^8 PFU. Com 12 horas de infecção verifica-se uma produtividade viral de 2 unidades logarítmicas, após infecção com 10^6 PFU. Enquanto que, em infecção com 10^8 PFU é observado baixa produtividade viral.

5.4. Análise comparativa da multiplicação viral entre os sistemas de cultivo CEFs x MCA após infecção com 10^6 e 10^8 PFU

Na **figura 26A** é apresentada a comparação estatística da produtividade viral entre os sistemas de cultivo CEFs x MCA. A análise foi feita entre cada tempo de infecção. Os resultados mostraram que entre os sistemas de cultivo, e em todos os tempos de infecção, as diferenças na produtividade viral não foram significativas. Na **figura 26B**, as curvas de crescimento ciclo único do vírus dos dois sistemas de cultivo, mostraram

que em infecções com 10^6 PFU na MCA (azul) ocorre um aumento de título de 2 unidades logarítmicas com 12 horas de infecção, havendo redução de título após 24 horas de infecção. Porém em CEFs (vermelho) houve uma produtividade viral máxima, com um aumento de título de 3 unidades logarítmicas, sendo crescente a obtenção de título viral. Entretanto, em infecções com 10^8 PFU foi observado baixa produtividade viral tanto em CEFs quanto na MCA, com um aumento de título de uma unidade logarítmica.

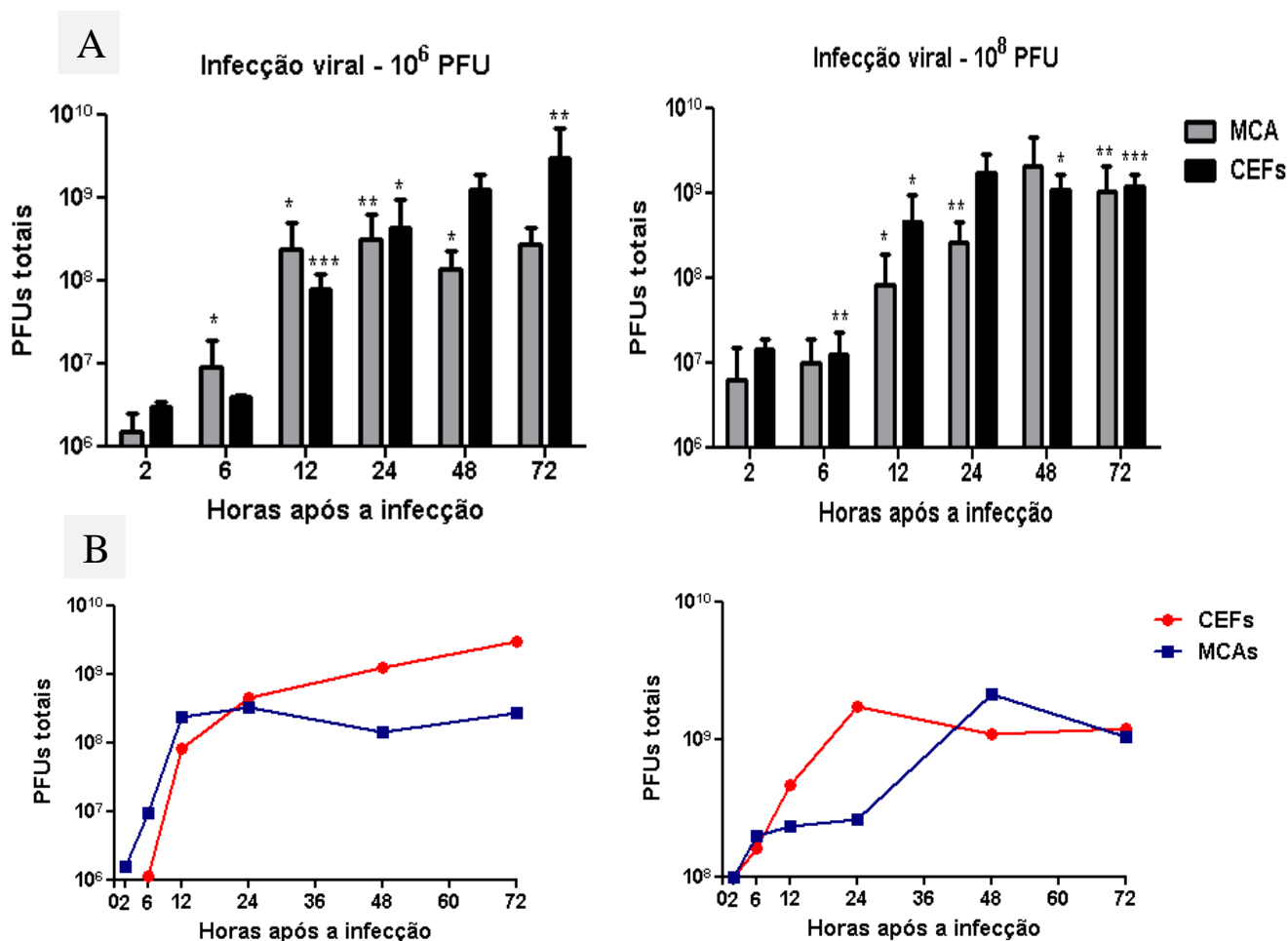


FIGURA 26: Análise comparativa da multiplicação viral entre os sistemas de cultivo CEFs x MCA, após infecção com 10^6 e 10^8 PFU. (A) Para comparação estatística foi usado o teste Anova de duas vias e o pós-teste de Bonferroni para comparar as médias entre os grupos de cada tempo. Os títulos virais foram calculados em PFUs totais. * indica $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, e quanto aos demais grupos, as diferenças não foram significativas entre as amostras. Os dados submetidos ao teste apresentaram que as diferenças na produtividade viral em todos os tempos de infecção não foram significativas entre os sistemas de cultivo. **(B)** Curvas de crescimento ciclo único, após infecção com 10^6 PFU, mostra um perfil de multiplicação viral semelhante em ambos os sistemas em até 24 horas de infecção. Após este tempo de infecção, na MCA houve um declínio na produção viral, enquanto que em CEFs a produção é crescente. Entretanto, em infecções com 10^8 PFU é observado tanto em CEFs quanto na MCA baixa produtividade viral.

5.5. Correlação entre os títulos de inóculo de 10^1 a 10^8 PFU com a produtividade viral, desenvolvimento embrionário e detecção de pocks na MCA

5.5.1. Produtividade viral

A **figura 27** apresenta a produtividade viral na MCA, obtida a partir da média ($n=5$), após infecções com inóculos de 10^1 a 10^8 PFU, em 72 horas de incubação. De 10^1 a 10^8 PFU, os títulos médios obtidos foram de $3,6 \times 10^5$ PFU, $7,3 \times 10^6$ PFU, 3×10^7 PFU, 1×10^8 PFU, $6,5 \times 10^8$ PFU, $2,7 \times 10^8$ PFU, $7,7 \times 10^9$ PFU, $3,9 \times 10^8$ PFU, respectivamente. Em infecções com até 10^4 PFU houve aumento de título de 4 unidades logarítmicas e a partir deste log de infecção houve redução na obtenção de títulos virais. Estes resultados demonstraram, portanto, maior produtividade viral em infecções com até 10^4 PFU e que a produtividade viral é inversamente proporcional ao título de infecção.

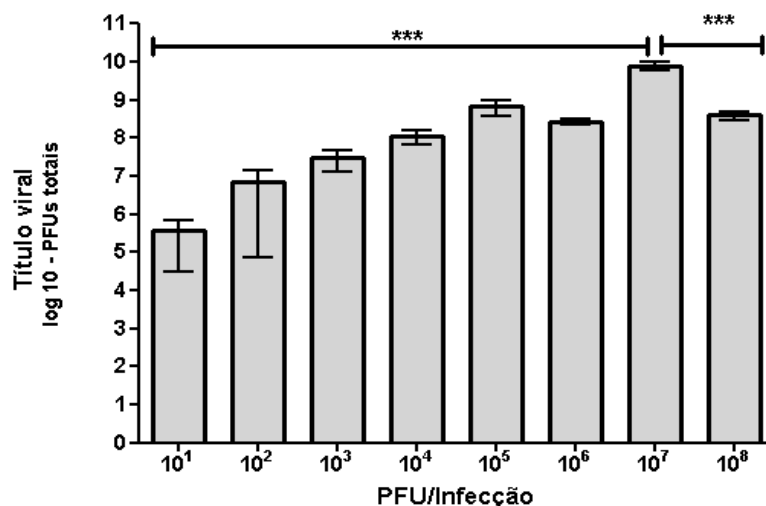


FIGURA 27: Relação entre os títulos de inóculo de 10^1 a 10^8 PFU e produtividade viral na MCA. Após 72 horas de infecção, as MCAs foram maceradas e tituladas em CEFs. Os títulos virais foram calculados em PFUs totais. Foi utilizado o teste Anova de uma via e o pós-teste de Bonferroni. Os resultados são expressos em média \pm EPM. A comparação múltipla entre os grupos mostrou que apenas o grupo inoculado com 10^7 PFU é estatisticamente diferente quando comparado aos demais grupos. *** indica $P < 0.001$. Entretanto, esta diferença não reflete o saldo de produtividade viral.

5.5.2. Desenvolvimento embrionário

As infecções de 10^1 a 10^8 PFU foram acompanhadas com o desenvolvimento embrionário, sendo observado que em infecções acima de 10^4 PFU o desenvolvimento do embrião é afetado, entretanto, alguns embriões ainda resistem a altos títulos. É observado que MCAs com embriões desenvolvidos são mais espessas, os vasos sanguíneos estão repletos de sangue e como resultado da migração de células inflamatórias as lesões são produzidas no tecido (**figura 28B**). As MCAs não desenvolvidas e de aspecto esbranquiçado, como mostrado na **figura 28A**, sugerem morte embrionária e, portanto, para determinação de produtividade viral entre os sistemas de cultivo, foram descartadas e novas infecções substituíram estas membranas.

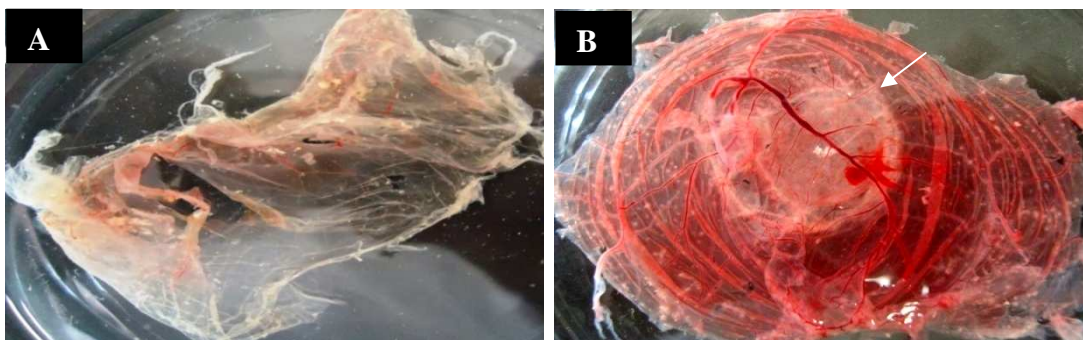


FIGURA 28: Aspecto de MCAs infectadas, acompanhadas com o desenvolvimento embrionário. Em (A) membrana infectada com 10^4 PFU apresenta aspecto esbranquiçado e em (B) membrana infectada com 10^7 PFU mostra uma lesão inflamatória bem evidente (indicado por seta). As MCAs foram coletadas após 72 horas de infecção.

5.5.3. Detecção de pocks

As infecções com os títulos de inóculo de 10^1 a 10^8 PFU foram acompanhadas também quanto a presença de lesões inflamatórias (pocks) na MCA, as quais se apresentam como pequenos pontos brancos espalhados de forma difusa na membrana. Após 72 horas de incubação, as MCAs foram coletadas e os pocks foram visualizados em infecções com 10^2 PFU em 3 MCAs, com 10^3 PFU apenas em uma MCA e com 10^4 PFU em 3 MCAs. As membranas são mostradas na **figura 29**.

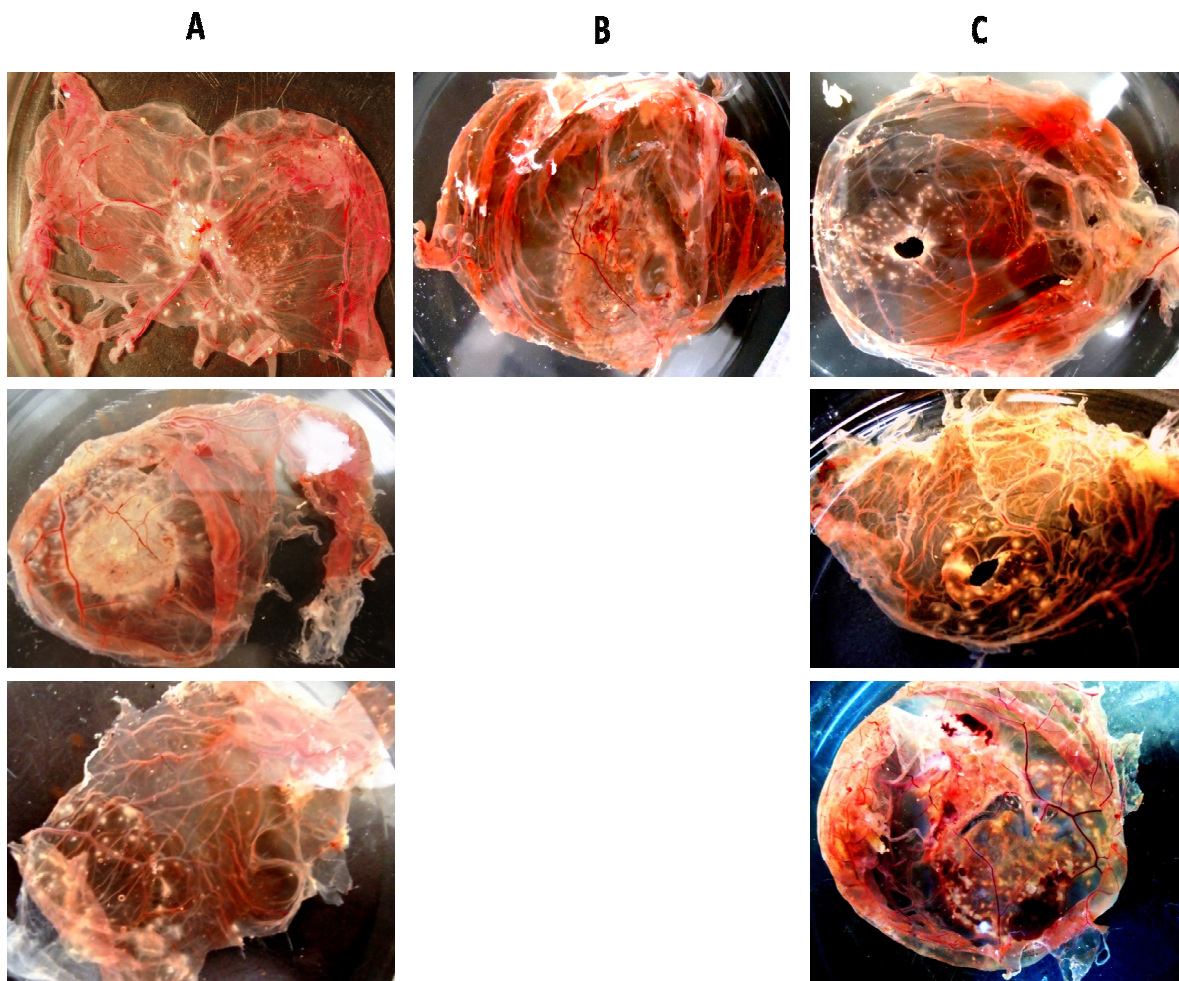


FIGURA 29: Detecção de pocks na MCA. Ovos embrionados ($n=5$ /título de infecção) foram infectados com 10^1 a 10^8 PFU e as MCAs foram coletadas após 72 horas de infecção. Entretanto, em resposta à infecção, lesões individualizadas (pocks) foram visualizadas apenas nas infecções com (A) 10^2 , (B) 10^3 e (C) 10^4 PFU, as quais se apresentam como pequenos pontos brancos espalhados de forma difusa na membrana.

5.6. Análise qualitativa da expressão de GFP em MCAs infectadas com mesmo título e tempo de infecção

Este experimento teve por objetivo analisar qualitativamente a expressão de GFP em 4 MCAs infectadas com 10^6 PFU. As MCAs coletadas após 48 horas de infecção foram analisadas por microscopia confocal. As imagens de fluorescência das membranas A, B e C foram obtidas com aumento 1x, e evidencia que a expressão de GFP é variável em um mesmo título e tempo de infecção. A membrana B apresentou maior expressão de GFP, enquanto que a membrana C ausência de expressão de GFP. Já a imagem de fluorescência da membrana D, obtida com aumento de 10x, evidencia a formação de um halo que delimita a infecção, impedindo a invasão do vírus no tecido. (figura 30).

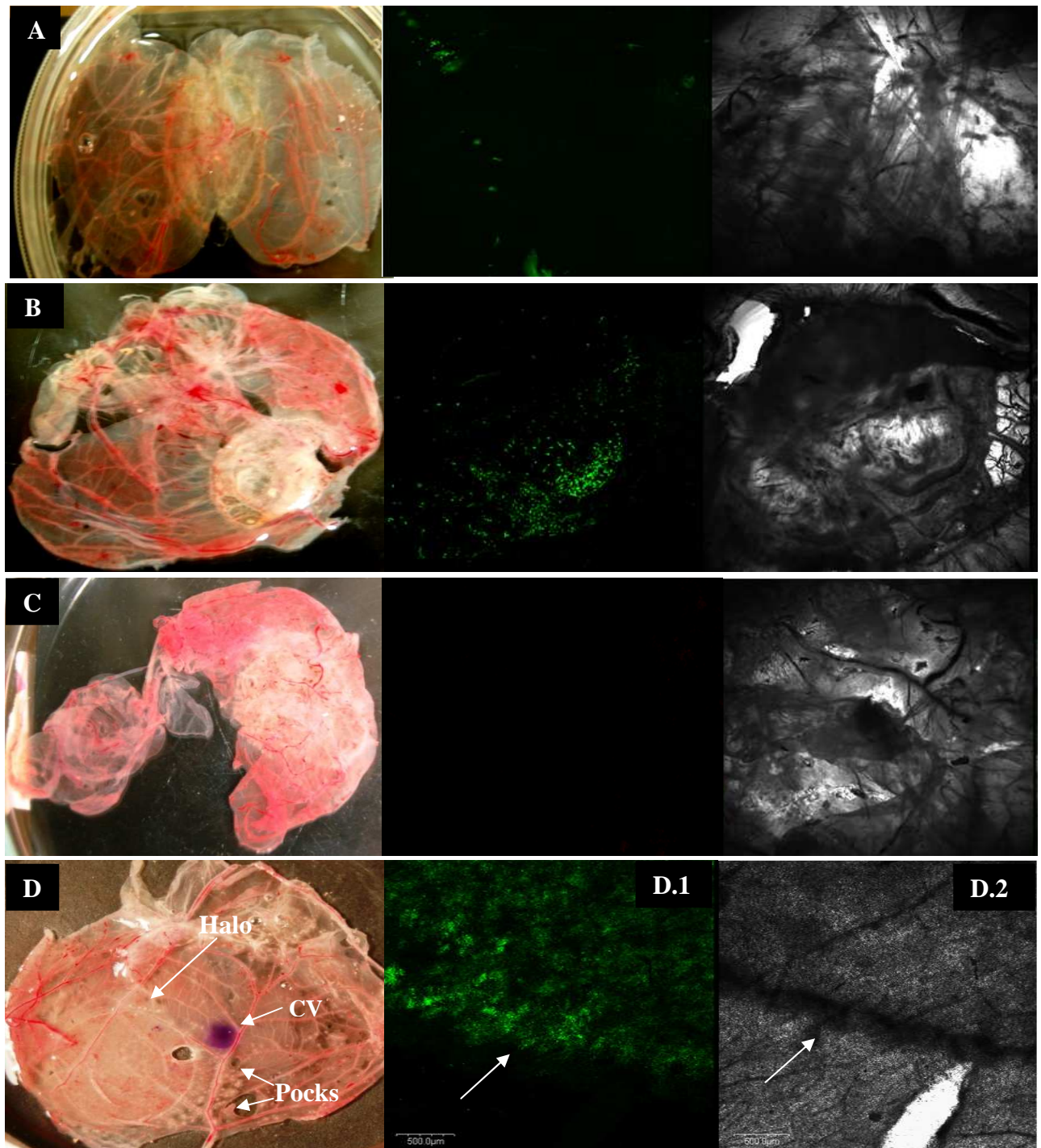


FIGURA 30: Análise qualitativa da expressão de GFP evidencia multiplicação viral restrita ao local da infecção. Quatro membranas (A,B,C,D) foram infectadas com 10^6 PFU e coletadas após 48 horas de infecção. Análise por microscopia confocal das MCAs A, B e C, aumento 1x, revela que a expressão de GFP é variável. A membrana B apresentou maior expressão de GFP, enquanto que, a membrana C ausência de expressão de GFP. Em (D) o ponto de infecção marcado com cristal violeta (CV) pouco antes de coletar a MCA mostra, ao lado esquerdo, a formação de um halo limitando a infecção (indicado por seta) e ao lado do halo alguns pocks (lesões inflamatórias). Através do laser de luz transmitida (D.2), em aumento de 10x, uma seta aponta o halo de limitação da infecção, enquanto que o laser de fluorescência (D.1) mostra a expressão de GFP apenas dentro do halo.

5.7. Análise quantitativa da expressão de GFP do vírus MVA multiplicado na MCA

O objetivo deste experimento foi comprovar qualitativamente e quantitativamente através de imagens obtidas por microscopia confocal, a multiplicação viral na MCA. Portanto, as MCAs foram infectadas com os mesmos títulos de infecção da análise comparativa. A perspectiva foi comparar os dados de quantificação de fluorescência com os dados da titulação da análise comparativa.

5.7.1. MCA infectada com 10^6 PFU

Este experimento foi realizado para analisar quantitativamente a expressão de GFP em MCAs infectadas com 10^6 PFU, após (A) 2, (B) 6, (C) 12, (D) 24, (E) 48 e (F) 72 horas de infecção.

Em cada tempo de infecção, uma MCA foi coletada e alterações no aspecto das membranas foram indicadas por setas, sugerindo uma reação inflamatória local (**figura 31**). A **figura 32** mostra imagens de 1,6 x 1,6 cm, adquiridas por microscopia confocal, sendo a primeira imagem à esquerda obtida pela emissão de um laser de Argônio com comprimento de onda de 488nm e a segunda por um laser de luz transmitida. O controle negativo (CN) é representado por uma membrana inoculada com PBS e coletada após 72 horas. Foi verificado que nos tempos de 2 e 6 horas não houve expressão de GFP (**figuras 32 A, B**). As imagens obtidas a partir de 12 horas de infecção foram analisadas através do software ImageJ, para que a expressão de GFP fosse quantificada e a área total de infecção definida através da soma de áreas ocupadas pela expressão de GFP. A **tabela 5** apresenta estes resultados, mostrando que com 12 horas de infecção foi registrado maior intensidade de fluorescência em relação a todos os tempos. Nos tempos posteriores de infecção a quantificação de fluorescência mostrou redução na expressão de GFP na medida em que aumenta o tempo de infecção.

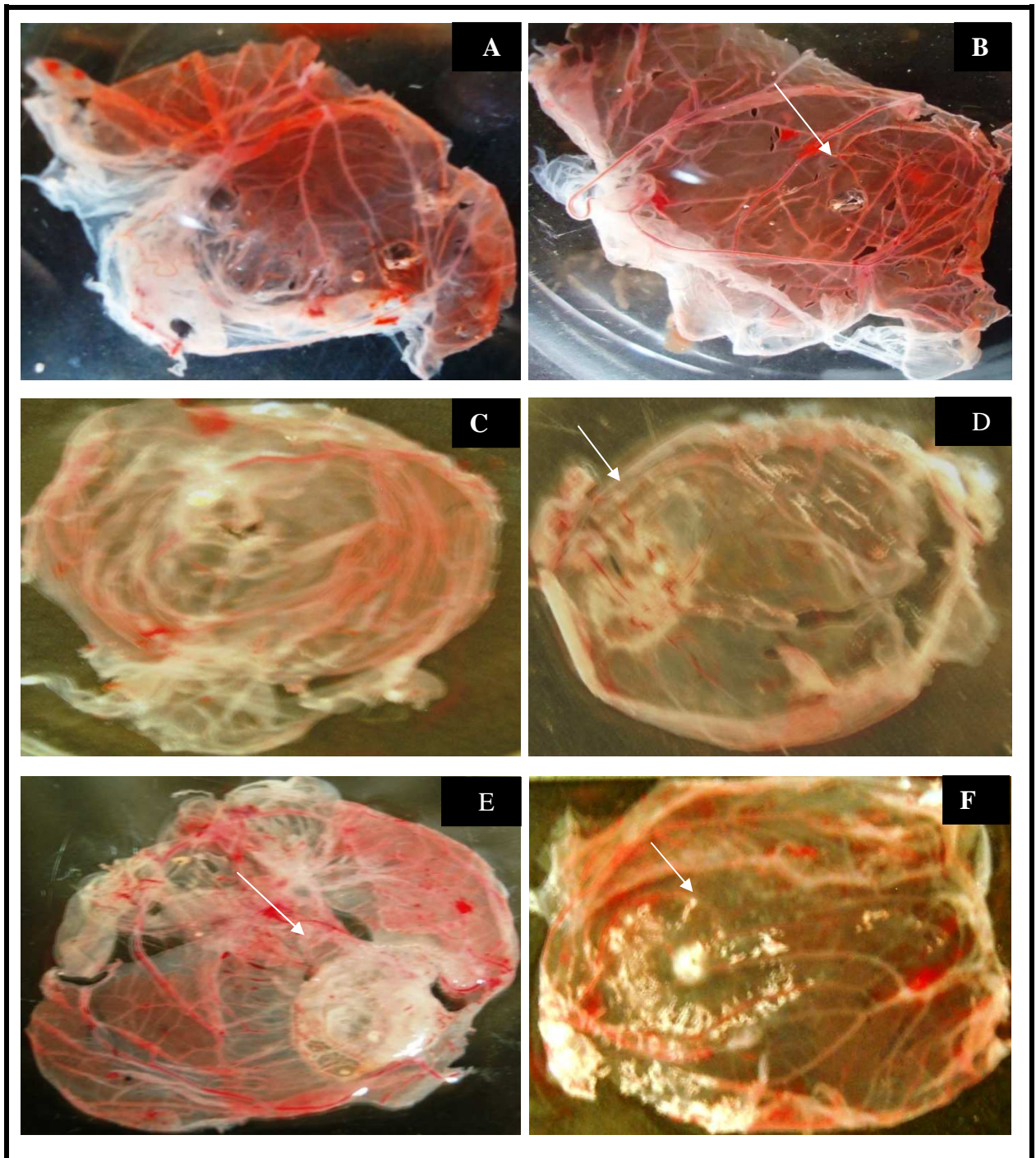
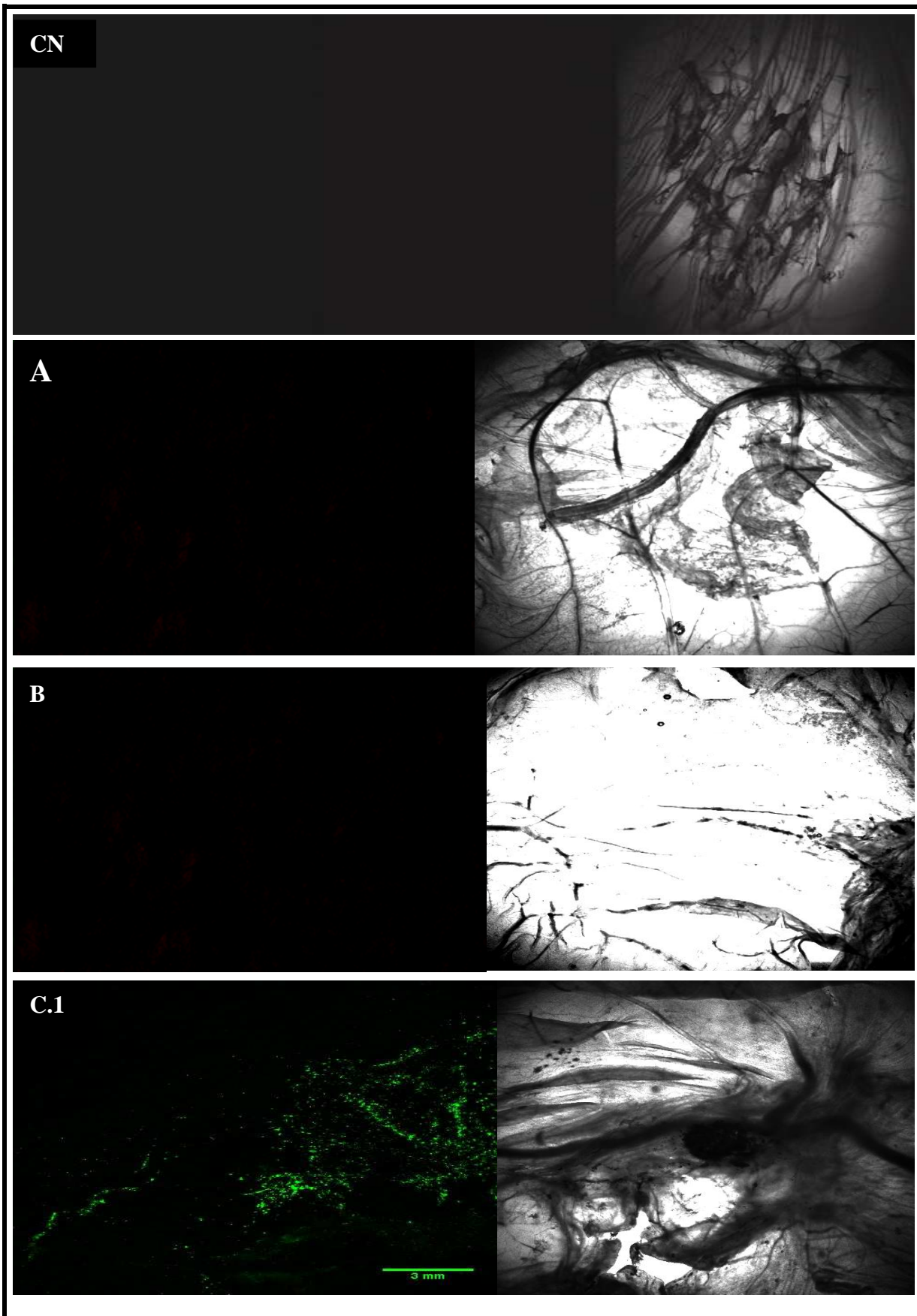
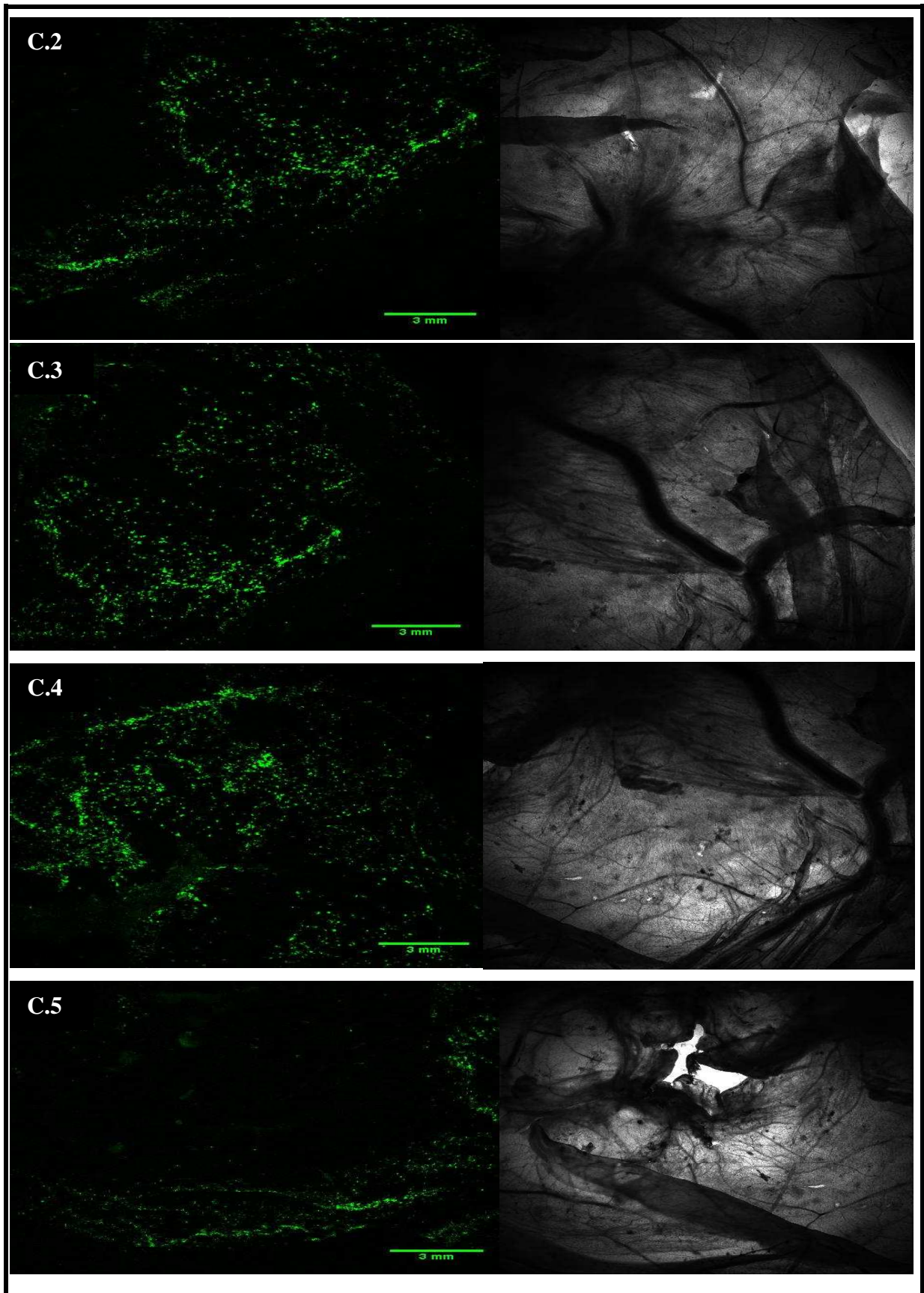
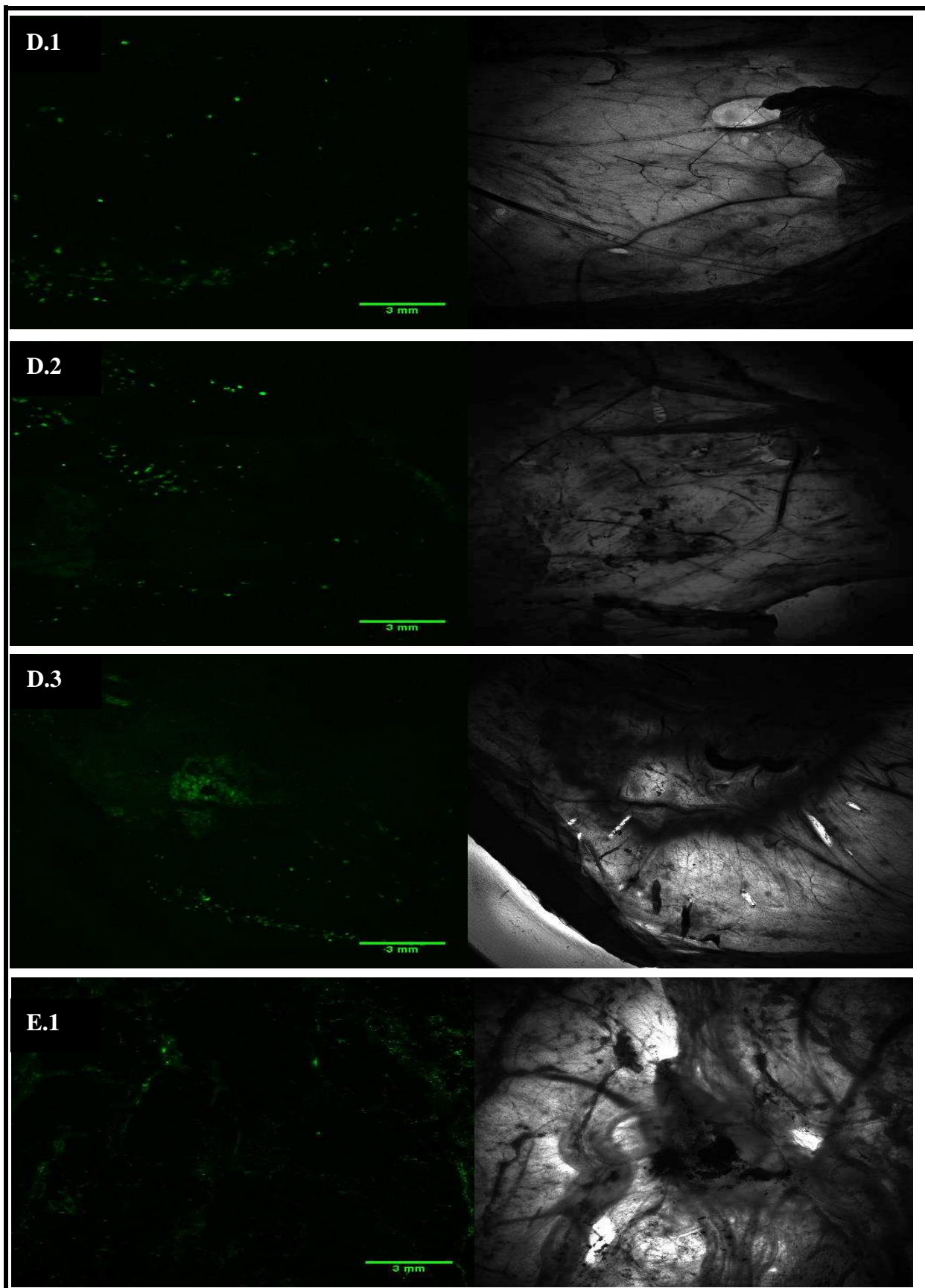
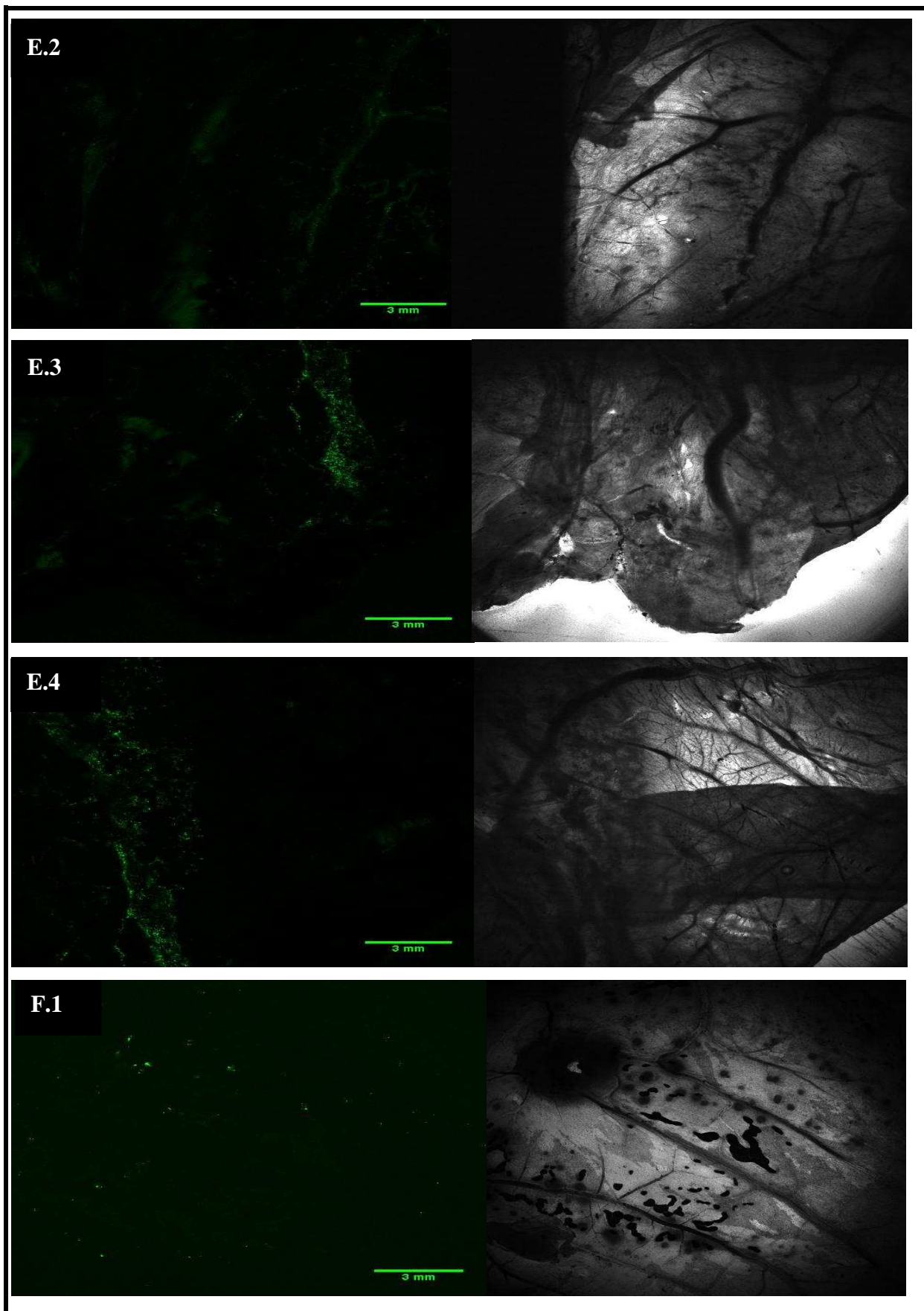


FIGURA 31: MCAs infectadas com 10^6 PFU. Estas MCAs coletadas após (A) 2, (B) 6, (C) 12, (D) 24, (E) 48 e (F) 72 horas de infecção foram usadas para análise de quantificação de fluorescência.









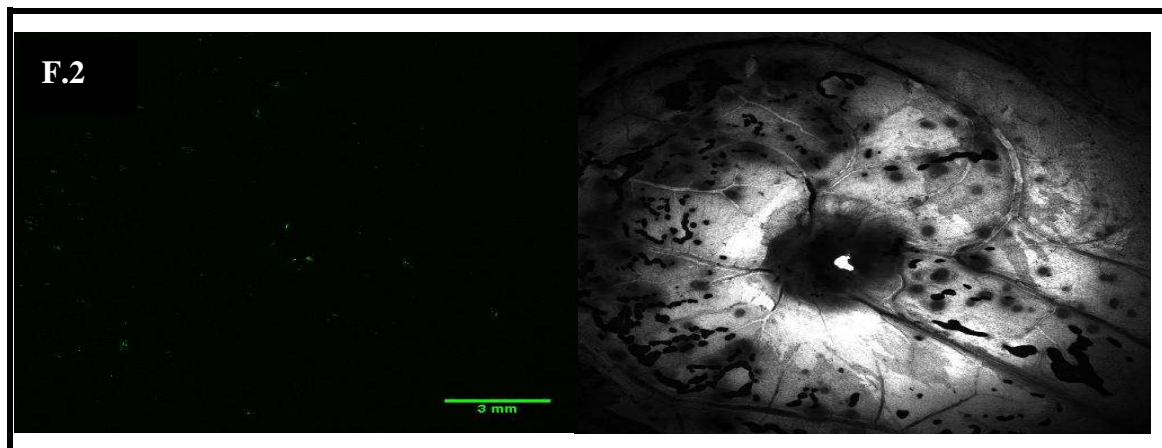


FIGURA 32: Análise qualitativa da expressão de GFP em MCAs infectadas com 10^6 PFU. (CN) representa uma MCA inoculada com PBS e coletada após 72 horas. As imagens obtidas por microscopia confocal, aumento 1x, correspondem à áreas de 1,6 x ,6 cm das membranas de (A) 2, (B) 6, (C) 12, (D) 24, (E) 48 e (F) 72 horas após a infecção apresentadas na figura 31. Na MCA A e B é demonstrado que não há expressão de GFP.

TABELA 5: Quantificação da expressão de fluorescência de GFP/ área total, em infecção com 10^6 PFU.

Tempo de coleta da MCA	Imagens	Área (cm ²)	Intensidade de fluorescência
12 horas	C.1	2,56	97.944
	C.2	2,56	145.475
	C.3	2,56	105.868
	C.4	2,56	77.066
	C.5	2,56	54.593
	Total	12,8	480.946
24 horas	D.1	2,56	146.330
	D.2	2,56	98.911
	D.3	2,56	111.261
	Total	7,68	356.502
48 horas	E.1	2,56	74.293
	E.2	2,56	64.499
	E.3	2,56	66.606
	E.4	2,56	67.309
	Total	10,24	272.707
72 horas	F.1	2,56	135.138
	F.2	2,56	85.349
	Total	5,12	220.487

5.7.2. MCA infectada com 10^8 PFU

Do mesmo modo que o experimento anterior, este experimento foi realizado para analisar quantitativamente a expressão de GFP, porém em MCAs infectadas com 10^8 PFU. Em cada tempo de infecção, uma MCA foi coletada e alterações no aspecto das membranas foram indicadas por setas, sugerindo uma reação inflamatória local (**figura 33**). Em seguida, estas MCAs foram analisadas por microscopia confocal, sendo verificado que nos tempos de 2 e 6 horas não houve expressão de GFP (**figuras 34 A e B**). As imagens foram analisadas pelo software ImageJ, a expressão de GFP foi quantificada e a área total de infecção foi definida através da soma de áreas ocupadas pela expressão de GFP. A **tabela 6** apresenta estes resultados, mostrando que com 24 horas de infecção foi registrado maior intensidade de fluorescência em relação a todos os tempos (**figura 34D**). A MCA com 48 horas apresentou um halo de infecção bem definido e limitado em uma área de $2,56 \text{ cm}^2$ (**figura 34E**), enquanto que a MCA com 72 horas de infecção mostrou poucos pontos fluorescentes em uma área de $5,12 \text{ cm}^2$, apresentando uma redução significativa de fluorescência (**figura 34F**).

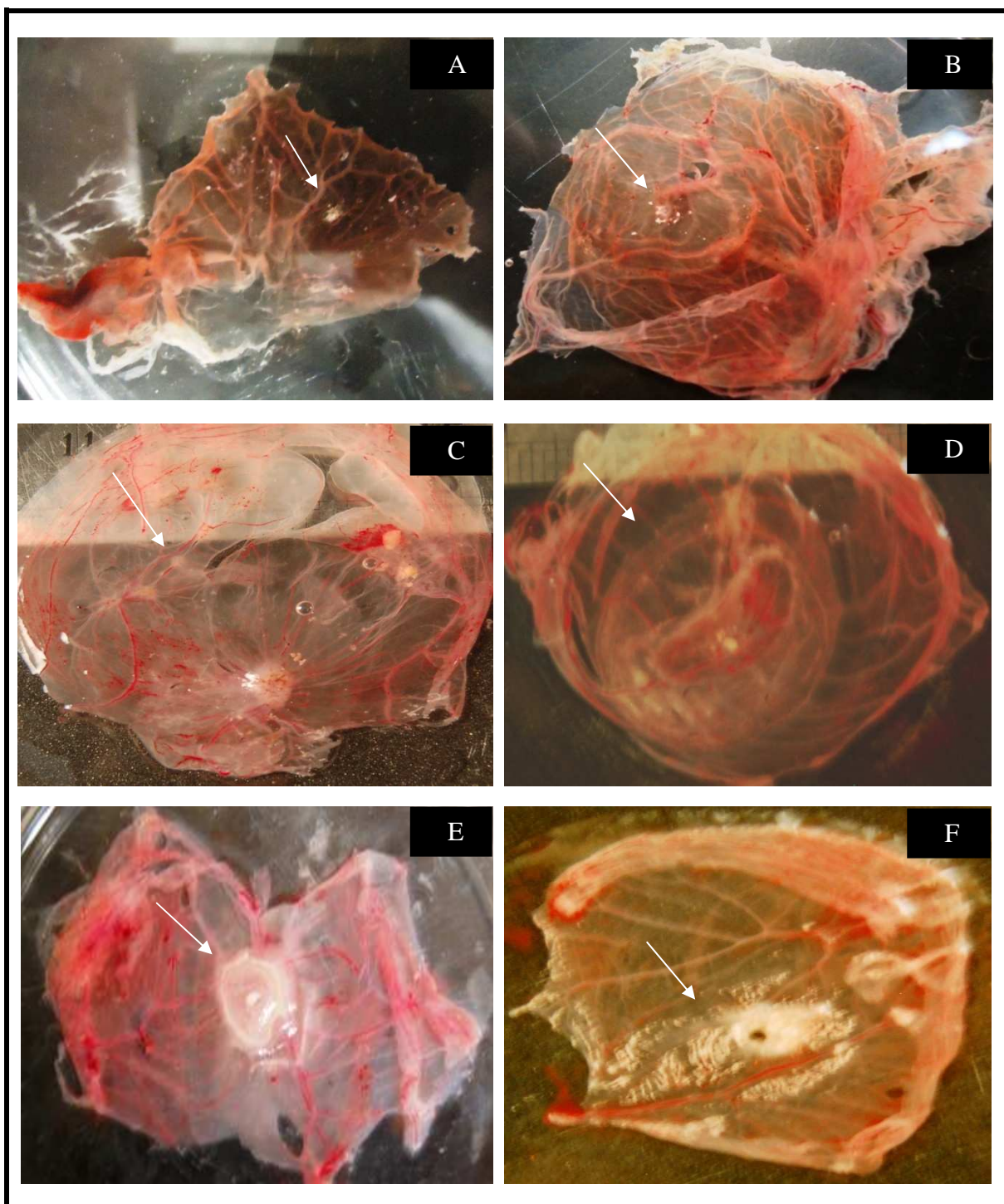
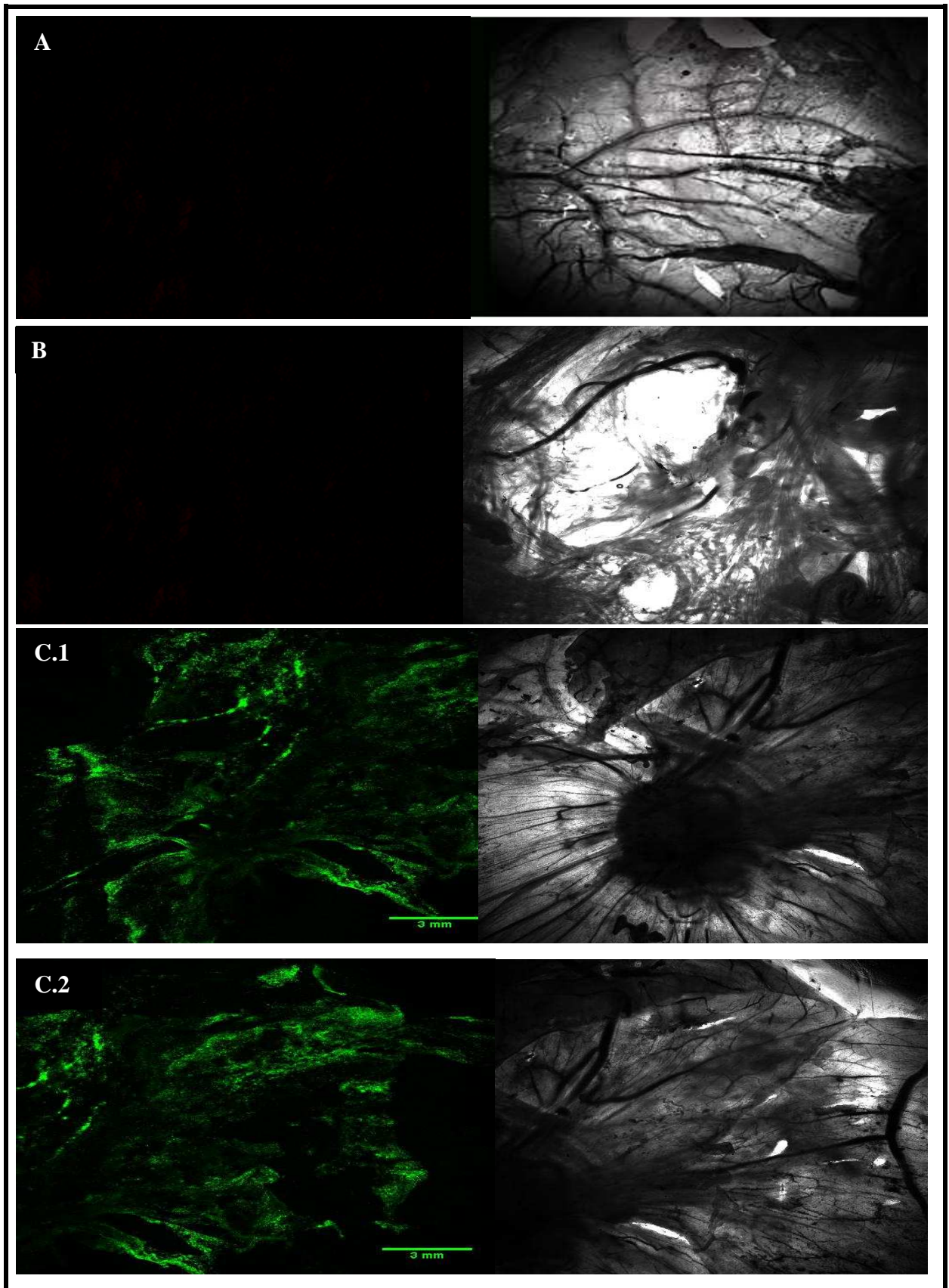
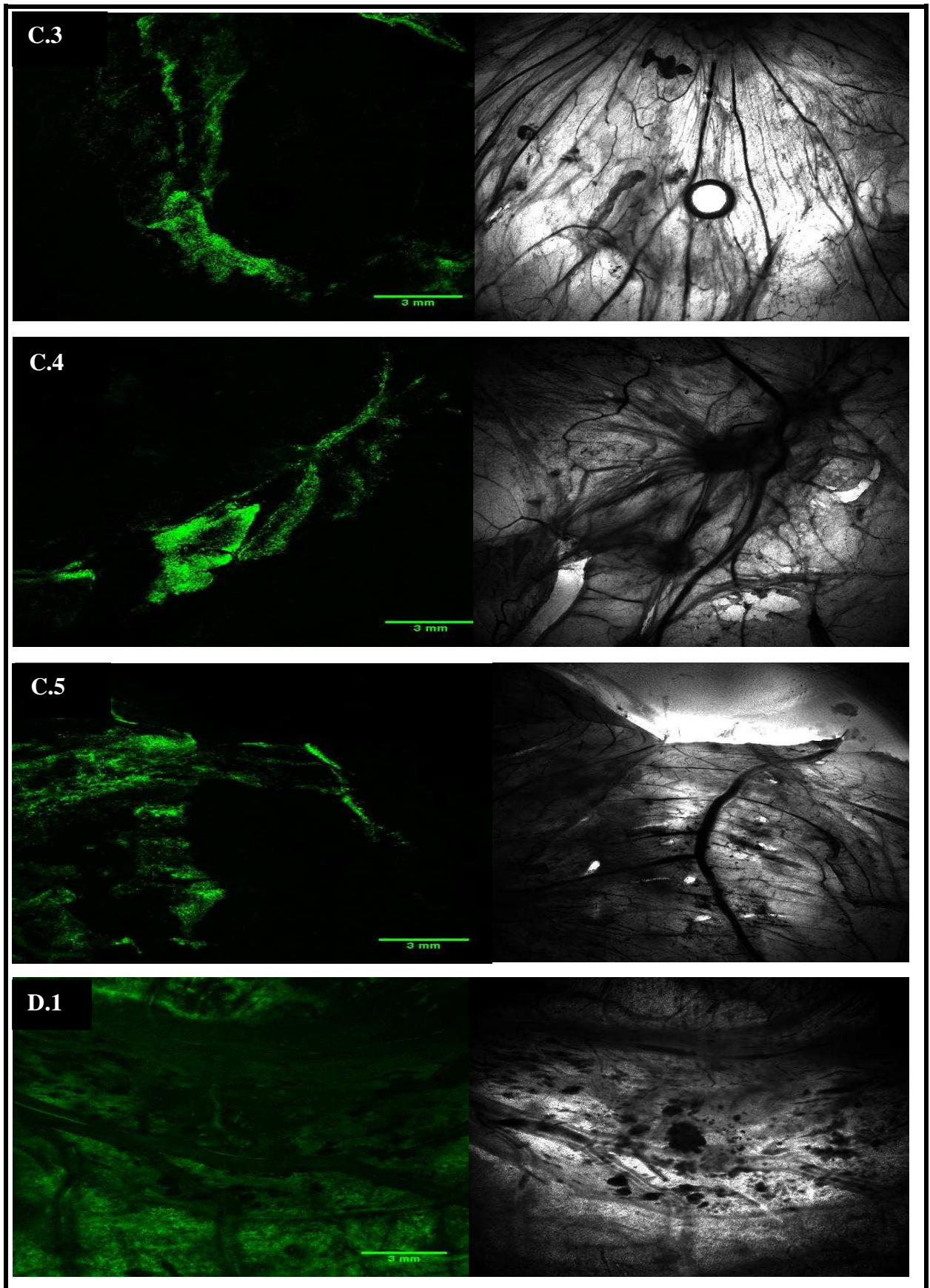
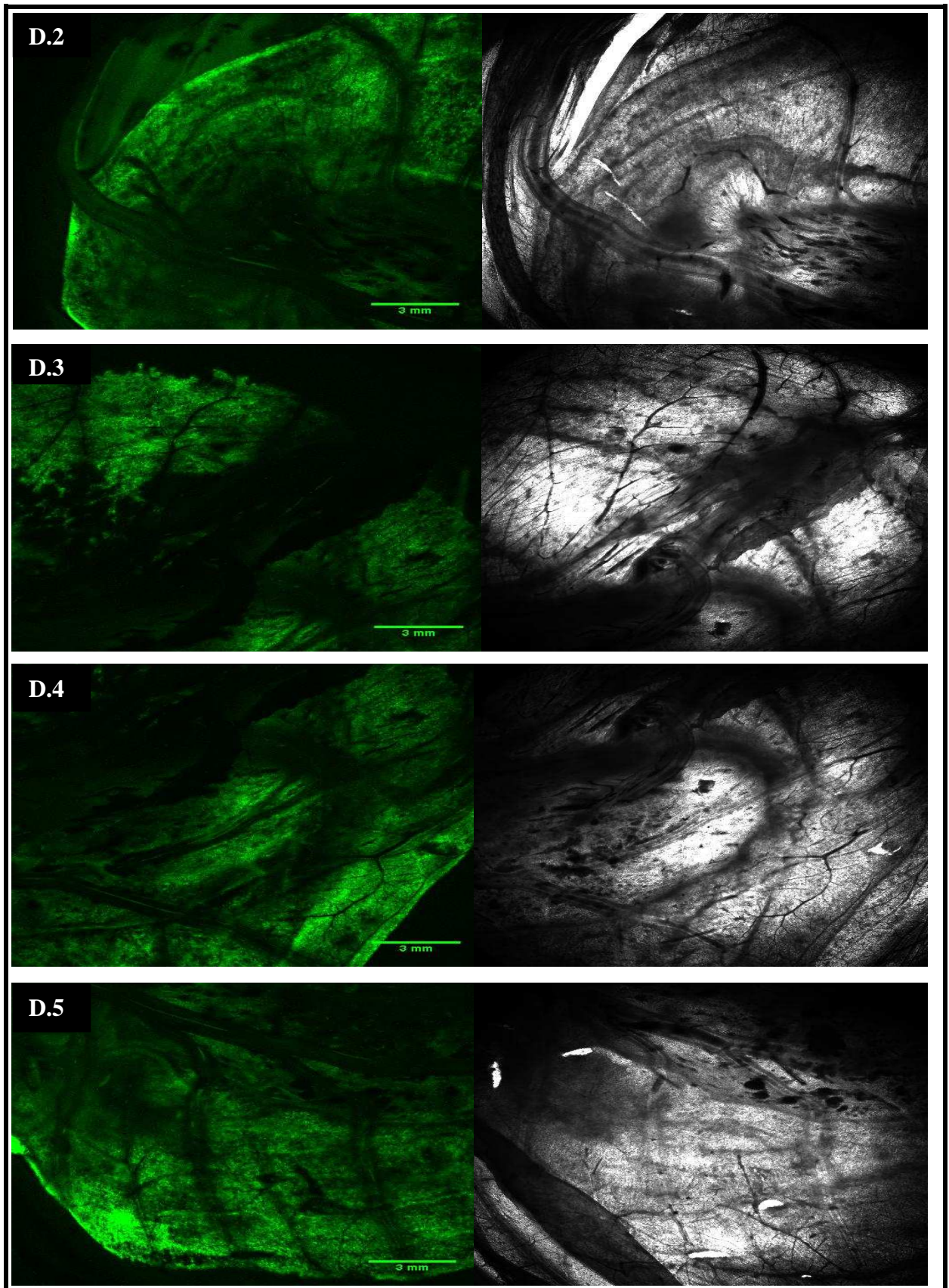


FIGURA 33: MCAs infectadas com 10^8 PFU. Estas MCAs coletadas após (A) 2, (B) 6, (C) 12, (D) 24, (E) 48 e (F) 72 horas de infecção foram usadas para análise de quantificação de fluorescência.







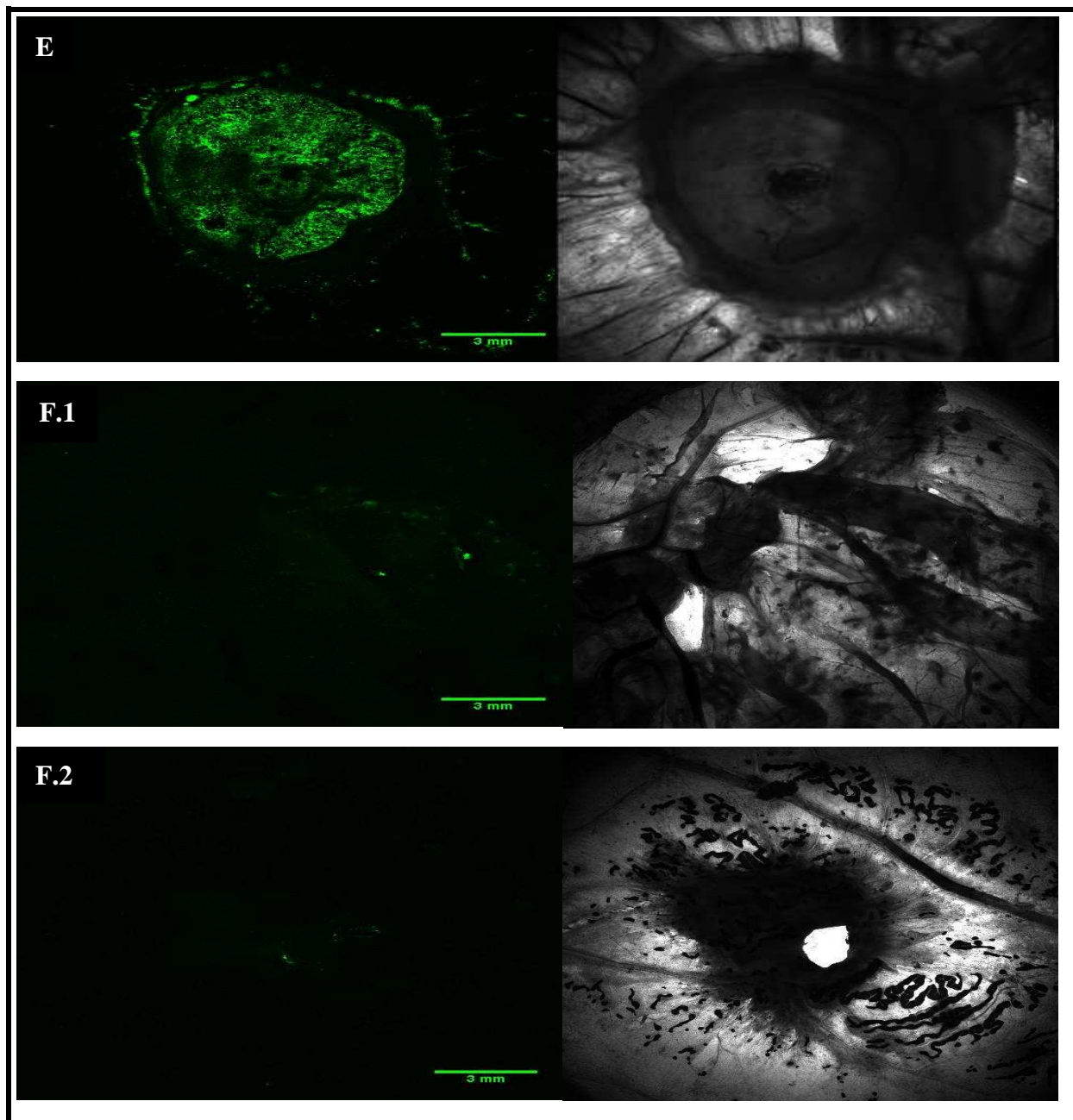


FIGURA 34: Análise qualitativa da expressão de GFP em MCAs infectadas com 10^8 PFU. As imagens obtidas por microscopia confocal, aumento 1x, correspondem à áreas de 1,6 x ,6 cm das membranas de (A) 2, (B) 6, (C) 12, (D) 24, (E) 48 e (F) 72 horas após a infecção apresentadas na figura 33. Em A e B é demonstrado que não há expressão de GFP.

TABELA 6: Quantificação da expressão de fluorescência GFP/ área, em infecção com 10^8 PFU.

Tempo de coleta da MCA	Imagens	Área (cm ²)	Intensidade de fluorescência
12 horas	C.1	2,56	253.579
	C.2	2,56	248.807
	C.3	2,56	153.276
	C.4	2,56	164.385
	C.5	2,56	175.614
	Total	12,8	995.661
24 horas	D.1	2,56	493.340
	D.2	2,56	688.627
	D.3	2,56	435.440
	D.4	2,56	581.307
	D.5	2,56	742.258
	Total	12,8	2.940.972
48 horas	E	2,56	230.941
	Total	2,56	230.941
72 horas	F	2,56	162.957
	Total	2,56	162.957

5.8. Infecção na MCA para detecção de pocks por três amostras de *Vaccinia virus*

As membranas foram infectadas com 10^4 PFU por três amostras de *Vaccinia virus*: Western Reserve (WR), Lister (LST) e MVA foram coletadas após 72 horas de incubação. Os pocks produzidos pela amostra WR são grandes, brancos e com diâmetros que variaram entre 3,24 – 4,4 mm (A). Já a amostra LST apresentou lesões brancas e intermediárias entre as amostras WR e MVA, com diâmetros de 1,19 – 1,28 mm (B). E a amostra MVA, pocks brancos e pequenos cujos diâmetros variaram entre 0,84 – 0,88 mm (C). A análise estatística, feita do diâmetro dos pocks, mostrou pelo pós teste Dunn's que entre as amostras LST e WR, MVA e LST não houve diferença estatística, mas sim entre WR e MVA ($P < 0.05$). O fenótipo dos pocks produzidos pelo protótipo VACV-WR, portanto, é diferente estatisticamente da amostra MVA. Enquanto que, entre as amostras vacinais LST e MVA não houve diferença (**figura 35**).

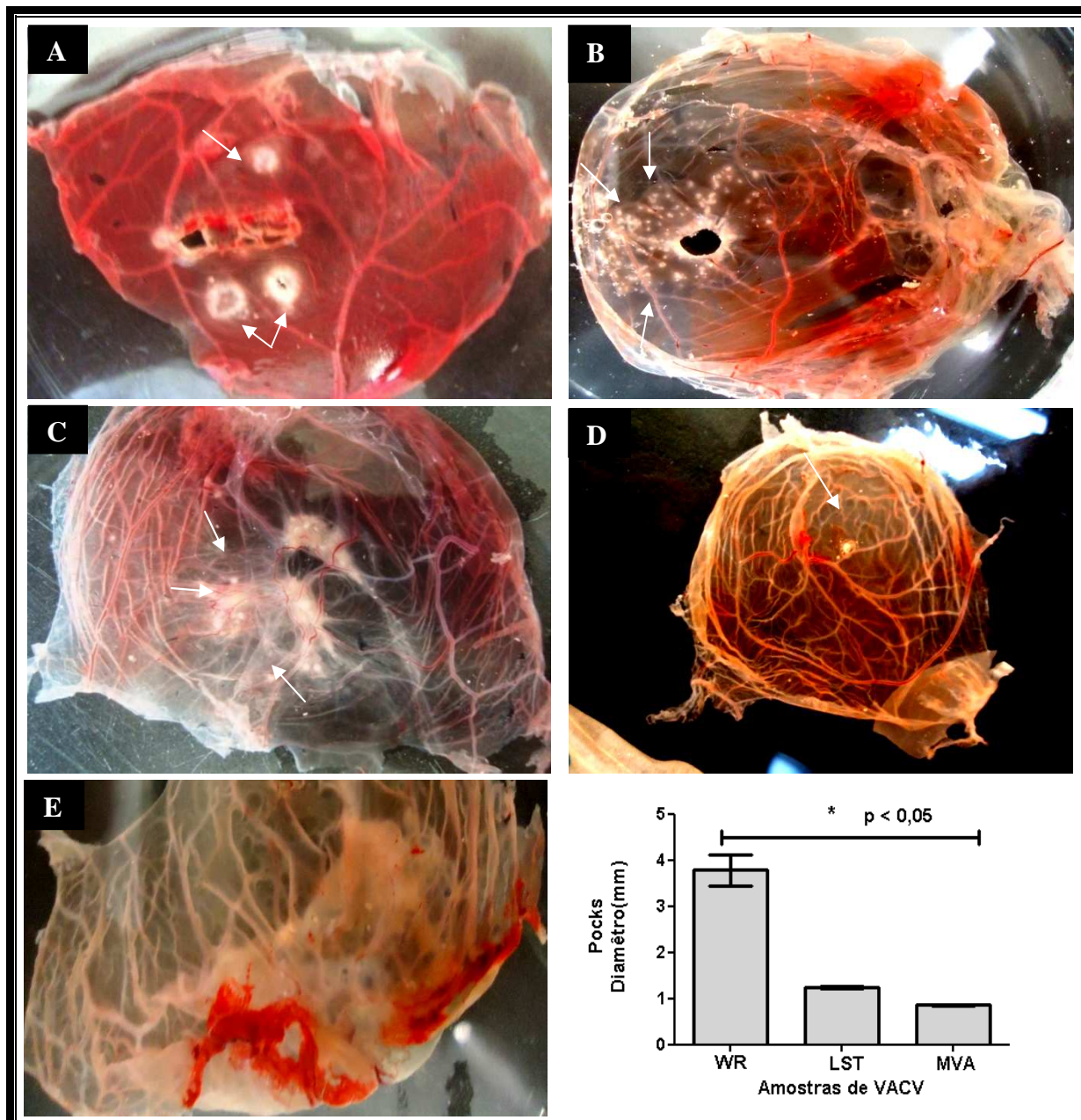


FIGURA 35: Análise fenotípica de pocks produzidos por três amostras de VACV. As lesões induzidas pelos vírus (A) WR, (B) LST e (C) MVA estão indicadas por setas. Ovos embrionados com 9 dias de desenvolvimento foram infectados com 10^4 PFU e as membranas foram coletadas após 72 horas de incubação. Observa-se diferença no fenótipo dos pocks formados pela infecção com o VACV-WR (pocks grandes e brancos) em relação às infecções causadas pelas amostras Lister e MVA, as quais induzem a formação de pequenos pocks brancos, sugerindo redução na virulência das amostras. (D) representa o controle negativo (CN). No CN foi feita a inoculação com PBS e a MCA foi coletada no mesmo tempo de infecção das demais amostras, sendo observado uma pequena lesão no local da inoculação (seta). (E) representa uma membrana não infectada. (F) Os diâmetros dos pocks foram medidos e analisados pelo teste Kruskal-Wallis, Anova de uma via, e o pós-teste Dunn's para comparação múltipla. Os resultados são expressos em mediana \pm Erro Padrão da Média (EPM). * indica $P < 0.05$ quanto à comparação entre as amostras WR e MVA, caracterizando as amostras diferentes estatisticamente. Entretanto, não houve diferença estatística entre as amostras MVA e LST, LST e WR.

5.9. Análises histopatológicas da MCA em infecção com 10^6 e 10^8 PFU

A **tabela 7** resume as alterações histopatológicas na MCA após infecções com 10^6 e 10^8 PFU, nos tempos de infecções de 12, 24, 48 e 72 horas, observadas na **figura 35**.

TABELA 7: Alterações histopatológicas identificadas na MCA

Infecção	10^6 PFU	10^8 PFU
12 horas	Hiperplasia moderada do ectoderma e hiperemia leve do mesoderma.	Hiperplasia acentuada do ectoderma e hiperemia moderada do mesoderma.
24 horas	Hiperemia e edema moderados do mesoderma.	Hiperemia e edema extensos do mesoderma.
48 horas	Área focal de necrose no mesoderma associada a edema e infiltração leve de heterófilos e células mononucleares.	O mesoderma apresentou hiperemia e edema intensos.
72 horas	Hiperemia e edema intensos, com infiltração moderada de células mononucleares.	Hiperemia intensa, vasos sanguíneos reativos e infiltração moderada de células mononucleares no mesoderma.

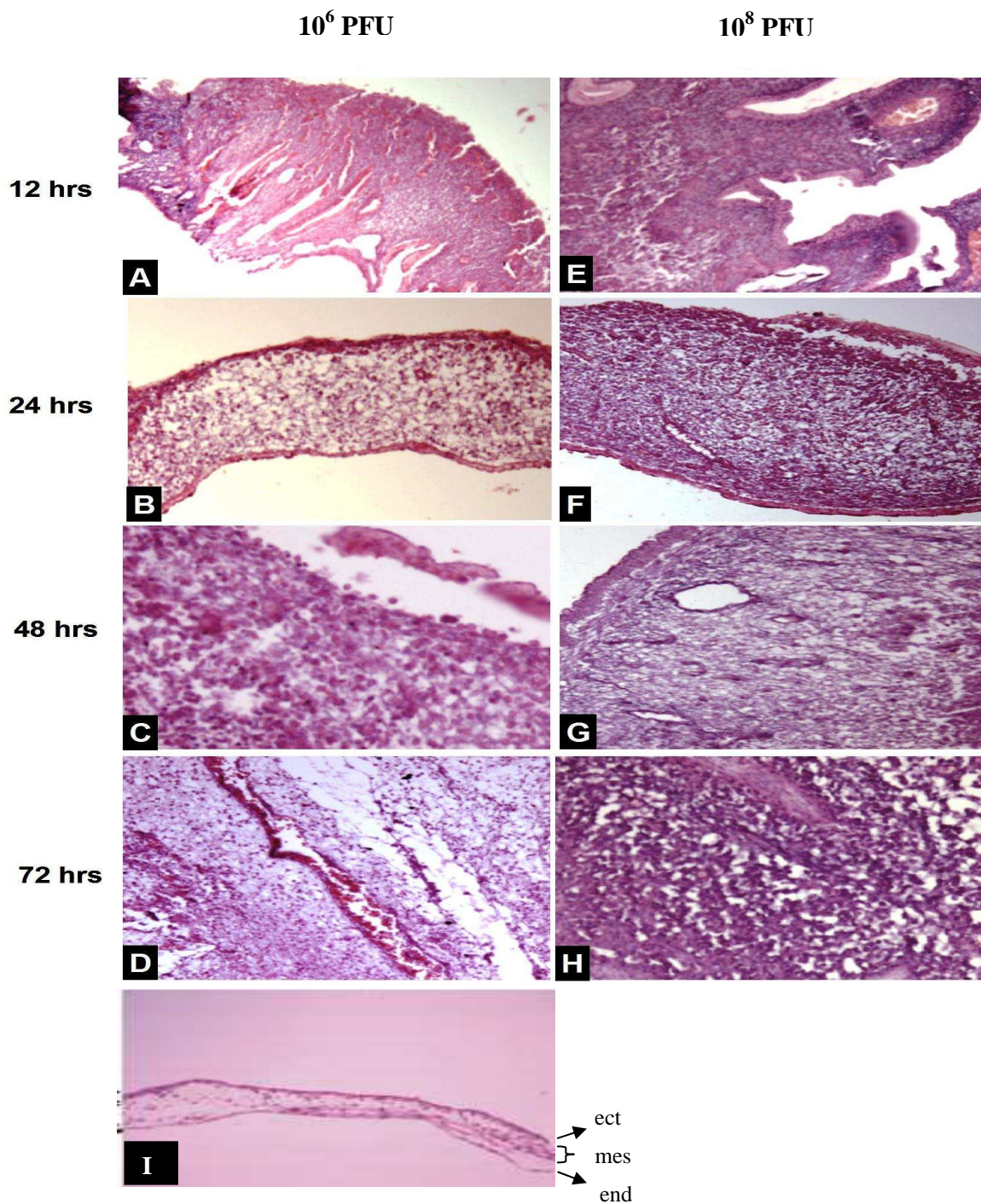


FIGURA 36: Fotomicrografias de seções da membrana corioalantóica, H&E. Membrana corioalantóica apresentou hiperplasia moderada do ectoderma e hiperemia leve do mesoderma, 12 horas (A). Nota-se hiperemia e edema moderados do mesoderma, 24 horas (B). Mesoderma com área focal de necrose associada a edema e inflamação mista, 48 horas (C). Observa-se hiperemia e inflamação crônica, 72 horas (D). Membrana corioalantóica com hiperplasia acentuada do ectoderma e hiperemia moderada do mesoderma, 12 horas (E). Observa-se hiperemia e edema extensos do mesoderma, 24 horas (F). Mesoderma com hiperemia e edema intensos, 48 horas (G). Hiperemia intensa, vasos sanguíneos reativos e inflamação crônica moderada no mesoderma, 72 horas (H). A-H, 200x. (I) MCA não infectada.

VI *Discussão*

O presente estudo introduz um novo método biológico de multiplicação do vírus MVA. Considerando que há uma extensa verificação experimental que explora a possibilidade de inserção do MVA na plataforma vacinal, a multiplicação do vírus foi testada na membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha, um sistema de cultivo *in vivo* suscetível a multiplicação de *Orthopoxvirus*.

Além disso, estabelece uma análise comparativa do crescimento cinético com o cultivo primário de CEFs após infecção com MOI de 0,1 e 10, o correspondente a 10^6 e 10^8 PFUs. Podemos inferir que na MOI= 0,1 a multiplicidade de infecção é dada por 1 vírus para cada 10 células e que na MOI=10 são 10 vírus para uma célula. Logo, em infecção de baixa MOI ocorre que há uma quantidade menor de vírus para competir por fatores transcricionais e traducionais, além de haver disponibilidade de células vizinhas a uma nova infecção. Em contraste, na alta MOI a multiplicação viral esgotaria os insumos celulares e a disponibilidade para a progênie viral se multiplicar. Portanto, o fator competição explica o fenômeno. Os resultados da titulação, em ambos os sistemas de cultivo, corroboram a explicação do fenômeno: na baixa MOI houve um aumento de título significativo enquanto que na alta MOI é observado baixa produtividade viral. Embora as diferenças na produtividade viral entre os sistemas de cultivo não foram significativas, seria de se esperar um desempenho de multiplicação viral comprometido em um sistema *in vivo* (MCA) cujo mecanismo de defesa fosse mais complexo.

Além dos dados de titulação e dentro dos mesmos padrões de infecção da análise comparativa, a multiplicação viral na MCA é comprovada qualitativamente e quantitativamente através das imagens de microscopia confocal. Embora houvesse perda de informação nas imagens com a objetiva de 1X, por outro lado, foi possível ter mais precisão em medir a área total de infecção no tecido e facilidade para determinar a intensidade de fluorescência da proteína da GFP. Não foi verificada a expressão de GFP nos tempos de 2 e 6 horas. A ausência de expressão é justificada pelo fato de que replicação do DNA viral ocorre nas primeiras horas após a infecção (McFADDEN, 2005). A expressão de GFP foi evidenciada com 12 horas após a infecção e as análises de intensidade de fluorescência mostraram, tanto em infecção com 10^6 quanto em 10^8 PFU, maior intensidade de fluorescência com 24 horas e decréscimo na intensidade de fluorescência em 48 e 72 horas. Este resultado pode ser justificado, de acordo com PALUMBO et al., 1989 e PALUMBO et al., 1994, pela significativa influência do sistema imune do hospedeiro. A resposta inflamatória é desencadeada logo após a

infecção e o segundo mecanismo de defesa é a produção de interferon, o qual induz um estado antiviral e, conseqüentemente, ambos limitam a multiplicação viral. Conforme OVERMAN & TAMM (1957) a partir das 24 horas são observadas lesões histopatológicas e com 72 horas uma considerável degeneração celular. E de acordo com JACOBSEN (2011) os embriões se tornam mais resistentes com o aumento da idade, havendo aumento de citocinas regulatórias e o processo inflamatório sugere que a imunopatologia contribui com a patogênese.

A partir destes dados, outras questões surgiram, por exemplo: infecções na MCA são mais produtivas em que título de infecção? E a detecção de pocks? Quais títulos virais determinam a produção de lesões individualizadas? Os resultados mostraram que os pocks foram produzidos em infecções entre 10^2 a 10^4 PFUs. Acima deste título, o que se observa nas membranas são áreas esbranquiçadas, enormes e bem evidentes de uma reação inflamatória no local da infecção. A titulação destas MCAs mostraram que, em infecções com até 10^4 PFUs, há um crescimento cinético de até 4 unidades logarítmicas. E o que se observa acima deste log de infecção é uma redução na obtenção de título viral.

Os pocks produzidos pela amostra MVA foram comparados com a produção de pocks por duas outras amostras de *Vaccinia virus*: Western reserve (protótipo da família *Poxviridae*) e Lister (amostra mais usada em todo o mundo para produção de vacina durante o programa mundial de erradicação da varíola). As três amostras de VACV provocam a formação de pocks com as mesmas características: brancos, nos quais são encontrados grande quantidade de heterófilos e reduzidos níveis de antígenos virais (PALUMBO et al., 1989, FREDRICKSON et al., 1992, PALUMBO et al., 1994, NATHANIEL et al., 2004). O protótipo VACV-WR induz a formação de pocks grandes, fenótipo estatisticamente diferente da amostra MVA. Contudo, deve ser considerado que o MVA, durante o processo de atenuação, sofreu deleções em genes imunomodulatórios e que portanto, apresenta mecanismos de evasão reduzidos (MEISINGER et al., 2007; SUTER et al., 2009; JACOBS et al., 2009; VASAN et al., 2010).

VII *Conclusões*

- ❖ O vírus MVA se multiplica de maneira eficiente em ambos os sistemas de cultivo.
- ❖ A multiplicação do vírus MVA na membrana corioalantóide mostra-se promissora, pela obtenção de altos títulos virais em um sistema economicamente viável.
- ❖ A produtividade viral em ambos os sistemas é inversamente proporcional ao título de infecção.
- ❖ Embora as lesões inflamatórias (pocks) sejam o indicativo da multiplicação viral na MCA, a ausência dos mesmos não se correlaciona com reduzidos títulos virais.

VIII *Perspectivas*

- ❖ Microscopia eletrônica para melhor compreensão da reação inflamatória.

- ❖ Produção de vacinas com o vírus MVA multiplicado em ovos embrionados.

Referências bibliográficas

ABRAHÃO, J.S., SILVA-FERNANDES, A.T., ASSIS, F.L. et al.,(2010) Human Vaccinia virus and Pseudocowpox virus co-infection: Clinical description and phylogenetic characterization. *Journal of Clinical Virology*. v.48, n. 1, p. 69-72.

ABRAHÃO, JS, GUEDES, MIM, TRINDADE, GS, (2009) One more piece in the VACV Ecological Puzzle: Could Peridomestic Rodents Be the between Wildlife and Bovine Vaccinia Outbreaks in Brazil? *Plos one*, v.4 (10) p.1-7.

ALI, HMS, NIMIR, AHH, KLALAFALLA, AI (2009) Growth characteristic of Camel pox and Vaccinia viruses in embryonated eggs and cell culture. *Trop Anim Health Prod*, v.41, p.393-396.

AMERICO, J.L., MOSS, B., EARL, P.L. (2010) Identification of wild-derived inbred mouse strains highly susceptible to monkeypox virus infection for use as small animal models. *J Virol.*; v.84, n.16, p.8172-80.

BARBOSA, VM. (2011) Fisiologia da incubação e desenvolvimento embrionário. *Belo Horizonte: FEP MVZ*, p. 77-82.

BOMHARD, W.V., MAULDIN, E.A., BREUER, W. et al. (2010) Localized cowpox infection in a 5-month-old Rottweiler. *Vet Dermatol*.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Disponível em http://www.cdc.gov/rotavirus/about_rotavirus.htm. Acesso 19 de setembro de 2010.

CONDIT, R.C. & NILES, E.G. (2002) Regulation of viral transcription elongation and termination during vaccinia virus infection. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1577, p. 325-336.

DAIAN, D.S.O. (2008) Construção de um vetor viral baseado no vírus Vaccínia de Ankara Modificado (MVA) expressando a proteína verde fluorescente (GFP). Trabalho de Monografia. Departamento de Microbiologia/ ICB/UFMG.

DI LULLO G, SOPRANA E., et al. (2010) The combination of marker gene swapping and fluorescence-activated cell sorting improves the efficiency of recombinant modified

vaccinia virus Ankara vaccine production for human use. *J Virol Methods*.;163(2):195-204.

DREXLER I, HELLER K, et al. (1998) Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *J Gen Virol*.; v.79, p.347-52.

DREXLER, I., STAIB, C., SUTTER, G. (2004) Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential? Elsevier, v.15, p.506-512.

DUBOCHET, J., ADRIAN, M., et al. (1994) Structure of intracellular mature vaccinia virus observed by cryoelectron microscopy. *Journal of Virology* . p. 1935-1941.

DURUPT, F, KOPPERS-LALIC, D, BALME, B, et al. (2012) The chicken chorioallantoic membrane tumor assay as model for qualitative testing of oncolytic adenoviruses. *Nature*, v.19, p.58-68.

EDWIN, H., LENNETTE, N. J., SCHMIDT (1979) Diagnostic procedures for: viral, rickettsial and chlamydial infections. 5^o edição. American Public Health Association. Washington, p.43-44.

EMERSON, G.L., LI, Y., et al. (2009) The Phylogenetics and Ecology of the Orthopoxviruses Endemic to North America. *PLoS One*. V.4, p.7666.

ESPOSITO, J.J. & FENNER, F. (2001) Poxvirus in *Fields Virology*. FIELDS, B.N, KNIPE,D.M, HOWLEY,P.M. et al. 4 (2) Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA-USA, p.2885-2921.

FENNER, F, WITTEK, R, DUMBEL, KR, (1988) *The Orthopoxviruses*. Academic Press, p.102-105, 198-199.

FENNER, F. (2000) Adventures with poxviruses of vertebrates. *FEMS Microbiol Rev*.; v.24, p.123-33.

FIOCRUZ-BIOMANGUINHOS, disponível em <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1485&sid=9>, acesso em 27 janeiro de 2012.

FONSECA, FG, FREITAS, LFD, QUINAN, BR (2011) *Vaccinia virus* as recombinant viral vectors: are we ready to use them? Insights from the field and from the lab. *J. Vaccines Vaccin*, v.2, p.132.

FREDRICKSON TN, SECHLER JM, PALUMBO GJ et al., (1992) Acute inflammatory response to cowpox virus infection of the chorioallantoic membrane of the chick embryo. *Virology*, v.187, p.693-704.

FRENZ, T., WAIBLER, Z., HOFMANN, J. et al. (2010) Concomitant type I IFN receptor-triggering of T cells and of DC is required to promote maximal modified vaccinia virus Ankara-induced T-cell expansion. *European journal immunology*, v.40, p. 2769-2777.

FRESHNEY, R.I. (1988) *CULTURE OF ANIMAL CELLS. A Manual of Basic Technique*. 2ª edição. Department of Medical Oncology Cancer Research Campaign Laboratories. University of Glasgow. P 175.

FRIED, B, STABLEFORD, LT (1991) Cultivation of helminthes in chick embryos. *Advances in parasitology*, v.30, p.107-165.

GARCEL, A., CRANCE, J.M., et al. (2007) Genomic sequence of a clonal isolate of the vaccinia virus Lister strain employed for smallpox vaccination in France and its comparison to other orthopoxviruses. *J Gen Virol.*; v.88, p.1906-16.

GARCÍA AD, MESEDA CA, et al. (2007) Characterization and use of mammalian-expressed vaccinia virus extracellular membrane proteins for quantification of the humoral immune response to smallpox vaccines. *Clin Vaccine Immunol.*; n.14, p.1032-44.

GEDDES, A.M. (2006) The history of smallpox. *Clinics in Dermatology*, v. 24, n.3, p. 152-157.

GILBERT ,S.C., MOORTHY, V.S., ANDREWS, L. et al. (2006) Synergistic DNA-MVA prime-boost vaccination regimes for malaria and tuberculosis. *Vaccine*. v. 24, n. 21, p. 4554-61.

GUBSER, C., HUÉ, S., KELLAM, P., SMITH, G.L. (2004) Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol.*; v.85, p. 105-17.

GUDMUNSDOTTER, L., NILSSON, C., BRAVE, A. et al. (2009) Recombinant Modified Vaccinia Ankara (MVA) effectively boosts DNA-primed HIV-specific immune responses in humans despite pre-existing vaccinia immunity. *Elsevier*, v. 27, p. 4468-4474.

HANSEN, H., OKEKE, M.I., NILSSEN, O., TRAAVIK, T. (2004) Recombinant viruses obtained from co-infection in vitro with a live vaccinia-vectored influenza vaccine and a naturally occurring cowpox virus display different plaque phenotypes and loss of the transgene. *Vaccine.*; v.23, p.499-506.

HERMANN, G. S. (2003) Novas perspectivas em vacinas virais. *História, Ciências e Saúde*. v.10, p. 655-69.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). Disponível em <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>> acesso em 06 de janeiro de 2012.

JACOBS, B.L., LANGLAND, J.O., et al. (2009) Vaccinia virus vaccines: past, present and future. *Antiviral Res.*; v.84, p.1-13.

JACOBSEN, ID, GROBE, K, BERNDT, A, et al. (2011) Pathogenesis of *Candida albicans* infections in the alternative chorio-allantoic membrane chicken embryo model resembles systemic murine infections. *Plos one*, v.6, e.19741.

JOHNSTON, JB, McFADDEN, G (2003) Poxvirus Immunomodulatory Strategies: Current perspectives. *Journal of Virology*, v.77, p.6093-6100.

JOKLIK, W. K. (1962) The purification for four strains of poxvirus. *Virology*. v.18, p.9-18.

JONES, T. (2008) IMVAMUNE, an attenuated modified vaccinia Ankara virus vaccine for smallpox infection. *Curr Opin Mol Ther.* v.10, n.4, p.407-17.

KAPLAN, C. (1989) Vaccinia virus: a suitable vehicle for recombinant vaccines? *Archives de Virology*, v.106, p.127-139.

KENNEDY, R. B. & POLAND, G. A. (2010) The identification of HLA class II-restricted T cell epitopes to vaccinia virus membrane proteins. *Virology*, v. 408, n. 20, p.232-240.

KENNEDY, R.B., OVSYANNIKOVA, I.G., JACOBSON, R.M. et al. (2009b) The immunology of smallpox vaccines. *Curr Opin Immunol.* v.21, n.3, p.314-20.

KENNEDY, R.B., OVSYANNIKOVA, POLAND, G.A. (2009a) Smallpox vaccines for biodefense. *Vaccine.* v.27, p. D73-D79.

KIRN, D.H. & THORNE, S.H. (2009) Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nature Reviews Cancer* .v.9, p. 64-71.

KNIPE, DM; HOWLEY, PM (2007) *Fields Virology*. 5^o edição, v.1, Lippincott Williams & Wilkins, p. 2951.

LAUTERBACH H, KASSUB R, et al. (2010) Immune requirements of post-exposure immunization with modified vaccinia Ankara of lethally infected mice. *PLoS One.*; v.5,n.3, p.9659.

MACNEIL, A., REYNOLDS, M.G., INGER K. DAMON, I.K. (2009) Risks associated with vaccinia virus in the laboratory. *Virology*, v.385, n.1, p.1-4.

MAEDA, K., WEST, K., HAYASAKA, D. et al. (2005) Recombinant Adenovirus Vector Vaccine Induces Stronger Cytotoxic T-cell Responses Than Recombinant Vaccinia Virus Vector, Plasmid DNA, or a Combination of These. *Viral Immunology*, v. 18, n. 4, p.657-667.

MAHALINGAM, S., DAMON, I.K. and LIDBURY, B.A. (2004) 25 years since the eradication of smallpox: why poxvirus research is still relevant. *Trends in Immunology*. v. 25, n.12, p. 636-639 .

McCRAITH, S., HOLTZMAN, T. , MOSS, B. AND FIELDS , S. (2000) Genome-wide analysis of vaccinia virus protein–protein interactions. *Proc Natl Acad Sci.*; v.97, p.4879–4884.

McFADDEN, G. (2010) Killing a killer: what next for smallpox? *PLoS Pathog*. v.6, n.1, p. e1000727.

McFADDEN, G., (2005) Poxvirus tropism. *Nature Reviews Microbiology*; v.3, p.201-213.

MEISINGER-HENSCHER, C., SCHMIDT, M., et al. (2007) Genomic sequence of chorioallantoic vaccinia virus Ankara, the ancestor of modified vaccinia virus Ankara. *J Gen Virol.*, v.88, p.3249-59.

MERKEL, T.J., PERERA, P.Y., KELLY, V.K. et al. (2010) Development of a highly efficacious vaccinia-based dual vaccine against smallpox and anthrax, two important bioterror entities. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

MOSS, B & SHIDLER, J L (2001) Immunology 101 at poxvirus U: immune evasion genes. *Semin Immunol*. V.13, p.59-66

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

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

MYSTKOWSKA-BACZKOWSKA, ET, KOMAR, A, SAMOS-ZIELINSKA, J et al. (1995) Evaluation of the chorioallantoic membrane in the chick embryo to test the irritation potential of chemical and cosmetic products. *Rocz Pannstw Zakl Hig*, v.46, 407-15.

NATHANIEL, R, MacNEILL, AL, WANG, YX (2004) Cowpox virus CrmA, Myxoma virus SERP2 and baculovirus P35 are not functionally interchangeable caspase inhibitors in poxvirus infections. *Journal of General virology*, v.85, p.1267-1278.

OKEKE MI, NILSSEN Ø., et al. (2009) In vitro host range, multiplication and virion forms of recombinant viruses obtained from co-infection in vitro with a vaccinia-vectored influenza vaccine and a naturally occurring cowpox virus isolate. *Virology*; v.6, p.55.

OSTROUT, N.D., MCHUGH, M.M., D J TISCH, D.J. (2007) Long-term T cell memory to human leucocyte antigen-A2 supertype epitopes in humans vaccinated against smallpox. *Clin Exp Immunol.*; v.149, n.2, p. 265–273.

OVERMAN JR & TAMM, I (1957) Multiplication of *Vaccinia virus* in the Chorioallantoic Membrane in Vitro. *Virology*, v.3, p.173-184.

PALUMBO GJ, PICKUP DJ, FREDRICKSON TN, et al., (1989) Inhibition of an inflammatory response is mediated by a 38-KDa protein of cowpox virus. *Virology*, v.172, p.262-73.

PALUMBO, GJ, BULLER, RM, GLASGOW, WC (1994) Multigenic evasion of inflammation by poxviruses. *Journal of Virology*, v.68, p.1737-1749.

PARKER, S., NUARA, A., BULLER, R.M., SCHULTZ, D.A. (2007) Human monkeypox: an emerging zoonotic disease. *Future Microbiol.*; v.2, p.17-34.

PROGRAMA DE COMUTAÇÃO BIBLIOGRÁFICA (COMUT), disponível em <http://www.ibict.br>, acesso em 12 de janeiro de 2012.

REISINGER, K.S., BLOCK, S.L., IZU, A. (2009) Subunit Influenza Vaccines Produced from Cell Culture or in Embryonated Chicken Eggs: Comparison of Safety, Reactogenicity, and Immunogenicity. *The Journal of Infectious Diseases*, v.200, p.849–857.

RIBATTI, D, RANIERI, G, NICO, B, et al. (2011) Tryptase and chymase are angiogenic *in vivo* in the chorioallantoic membrane assay. *Int. j. Dev. Biol.*, v.55, p.99-102.

ROBERTS, K.L. & SMITH, L.G. (2008) Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends in Microbiology.* v.16, n. 10, p. 472-479.

ROBINSON , H.L. (2008) Viral attenuation by design. *Nature Biotechnology.* v.26, p.1000 –1001.

ROTT, M, REINACHER, M, ORLICH, M, KLENK, HD (1980) Cleavability of Hemagglutinin Determines Spread of Avian Influenza Viruses in the Chorioallantoic Membrane of Chicken Embryo. *Archives of Virology*, v.65, p.123-133.

SAITO T, FUJII T, et al. (2009) Clinical and immunological response to attenuated tissue-cultured smallpox vaccine LC16m8. *JAMA.*; v.301, p.1025-33.

SAW, CL, HENG, PW, LIEW, CV (2008) Chick chorioallantoic membrane as an *in situ* biological membrane for pharmaceutical formulation development: a review. *Drug Dev Ind Pharm*, v.34, p.1168-77.

SIMON, J.D., JONATHAN, L.H. (2010) Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer. *Nature Reviews Microbiology.* v.8, p.62-73.

SMITH, G.L. & McFADDEN, G. (2002) Smallpox: anything to declare? *Nature Reviews Immunology.* v.2, p.521-527.

SMITH, G.L., VANDERPLASSCHEN, A., LAW, M. (2002) The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *Journal of General Virology*, v.83, p.2915-2931.

SPERLING K.M., SCHWANTES A., et al. (2009) 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, p.6029-38.

SUTER M, MEISINGER-HENSCHER C, et al. (2009) Modified vaccinia Ankara strains with identical coding sequences actually represent complex mixtures of viruses that determine the biological properties of each strain. *Vaccine.*; v.27, p.7442-50.

SUTTER G, STAIB C. (2003) Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery. *Curr Drug Targets Infect Disord.*; v.3, n.3, p.263-71.

SUTTER, G. & MOSS, B. (1992) Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Pro. Natl. Acad. Sci.*, v. 89, p. 10847-10851.

1	
---	--

TERAJIMA ,M., CRUZ, J., LEPORATI, AM., et al. (2006) Identification of vaccinia CD8+ T-cell epitopes conserved among vaccinia and variola viruses restricted by common MHC class I molecules, HLA-A2 or HLA-B7. *Hum Immunol.*;v.67, n.7, p.512-20.

TRINDADE , GS, LI, Y, ONSON, VA, EMERSON, G et al., (2008) Real-time PCR assay to identify variants of *Vaccinia virus*: Implications for the diagnosis of bovine vaccinia in Brazil. *Journal of Virological Methods*, v.152, p.63-71.

TRINDADE, G.S. FONSECA, F.G., MARQUES, J.T (2003) Araçatuba Virus: A Vaccinialike Virus Associated with Infection in Humans and Cattle. *Emerg Infect Dis.* 2; v. 9, n.2, p. 155–16.

TRINDADE, G.S., DRUMOND, B.P., GUEDES, M.I.M.C. (2007) Zoonotic Vaccinia Virus Infection in Brazil: Clinical Description and Implications for Health Professionals. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n.4, p. 1370-1372.

VARGAS, A, ZEISSER-LABOUÉBE, M, LANGE, N, et al. (2007) The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, v.59, p. 1162-76.

VASAN S, SCHLESINGER SJ, et al. (2010) Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of ADMVA, a multigenic, modified vaccinia Ankara-HIV-1 B'/C candidate vaccine. *PLoS One.*; v.5, n.1, p.e8816.

VIJAYSRI, S., JENTARRA, G., HECK, M., et al. (2007) Vaccinia viruses with mutations in the E3L gene as potential replication-competent, attenuated vaccines: Intra-nasal vaccination. Elsevier, v. 26, p. 664-676.

WEAVER, J.R, ISAACS ,S.N. (2008) Monkeypox virus and insights into its immunomodulatory proteins. Immunol Rev.; v.225, p.96-113.

WERDEN SJ, McFADDEN G. (2007) The role of cell signaling in poxvirus tropism: the case of the M-T5 host range protein of myxoma virus. Biochim Biophys Acta. v.1784, p.228-37.

WERDEN SJ, RAHMAN MM, McFADDEN G. (2008) Poxvirus host range genes. Advances in Virus Research. v.71, p. 135-171.

WOLCOTT, BD (1940) Permanent Mounts of Virus-Infected Chorioallantoic Membranes. Science, v.94, n.2431.

WOODBERRY, T., GADNER, J., ELLIOT, S. L. et al. (2003) Prime Boost Vaccination Strategies: CD8 T Cell Numbers, Protection, and Th1 Bias. The Journal of Immunology, v.170, p.2599-2604.

WYATT LS, EARL PL, ELLER LA, MOSS B. (2004) Highly attenuated smallpox vaccine protects mice with and without immune deficiencies against pathogenic vaccinia virus challenge. Proc Natl Acad Sci.; v.101, p.4590-5.

