



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Ana Cláudia dos Santos Pereira Andrade

**A administração diária do probiótico *Lactobacillus paracasei*
ST11 reduz a letalidade causada por *Vaccinia virus* em modelo
murino**

Belo Horizonte, Setembro de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Ana Cláudia dos Santos Pereira Andrade

**A administração diária do probiótico *Lactobacillus paracasei*
ST11 reduz a letalidade causada por *Vaccinia virus* em modelo
murino**

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas/Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Jônatas Santos Abrahão

Co-orientadores: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

Dr. Danilo Bretas de Oliveira

Colaboradora: Prof. Dra. Jaqueline Maria Siqueira Ferreira

Belo Horizonte, Setembro de 2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me guiar e me manter sempre no caminho certo, rumo aos meus objetivos, sem perder as forças e a esperança, por maiores que fossem os desafios;

Ao meu orientador, Dr. Jônatas Santos Abrahão, pela orientação impecável, por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse trabalho, por sempre propor novos desafios e por acreditar no meu potencial. Aos professores, Erna Kroon, Paulo Peregrino, Cláudio Bonjardim e Giliane Trindade pelo aprendizado.

A Dra Jaqueline Ferreira, por ter me mostrado a beleza da ciência durante a iniciação científica. Devo muito do que aprendi a você. Aos Dr. Flaviano Martins e Dr. Danilo Oliveira, obrigada pela orientação e por todos os conselhos. Com certeza foram muito úteis e os levarei para o resto da vida;

Aos colegas do GEPViG, por todas as discussões científicas e por estarem sempre dispostos a ajudar no fosse preciso. Com vocês, aprendi o que é fazer parte de um grupo de pesquisa e enxerguei o quão incrível é fazer ciência;

A Dra. Daniele Souza pelos conselhos científicos, pela prestatividade em contribuir com este trabalho. A Dra. Camila Megale, pela ajuda nos experimentos de histologia e por aceitar a enriquecer esse estudo;

Aos jovens distintos, Lud, Rafa, Ju, Maurício, Rodrigo, Paulo, Grazi e Carol por me fazer rir todos os dias e ter sempre vontade de voltar pro laboratório. A caminhada com vocês foi muito mais tranquila, principalmente durante as disciplinas. Levarei vocês sempre no meu coração.

Especialmente, quero agradecer a Grazi, Rafa, Maurício e Ju que foram meus anjos da guarda durante o mestrado, me ajudaram em todos os momentos que precisei, me motivaram e me ensinaram muito do que eu sei hoje;

As amigas Juliana, Mileide, Mariana e Jéssica que sempre estiveram presentes, independente da distância. Obrigado pela amizade sincera e duradoura, pelos ótimos momentos que passamos juntos e que com certeza ainda passaremos;

Ao meu companheiro da vida, Raffael Batista. Não existem palavras para descrever o quão grata sou por você estar ao meu lado. Você sempre estava presente quando precisei e com você ao meu lado, tudo foi mais fácil. Obrigada por sempre acreditar em mim, por nunca deixar que eu desistisse ou mesmo fraquejasse. Enfim, obrigada por tudo!;

A minha família, pelo apoio incondicional e por todo o amor e carinho com que me tratam. Em especial, agradeço aos meus avós, Francisco e Julieta, que sempre me incentivaram e acreditaram que eu chegaria mais longe; a minha madrinha Carmem, por todo o carinho e confiança que teve em mim. As minhas irmãs, Andréia e Amanda, por todos os ótimos momentos que vivemos em casa e por me fazer querer sempre chegar mais longe, no intuito de ser sempre um exemplo para vocês;

Finalmente, agradeço de corpo e alma aos meus pais! Se aqui estou, escrevendo estas palavras e concluindo mais uma etapa da minha vida, é graças a vocês. A vocês, que sempre me incentivaram, mais do que quaisquer outras pessoas no mundo, que nunca duvidaram da minha capacidade e sempre tiveram fé nas minhas escolhas, muito obrigada! Jamais teria chegado até aqui se não fosse por vocês. Muito obrigada, por tudo, sempre. Vocês são os meus orgulhos!

À banca avaliadora pela disponibilidade e por poder colaborar na fase final desse trabalho.

Às agências de fomento, CAPES, CNPq E FAPEMIG pelo auxílio financeiro que permitiu a execução desse projeto.

A todos vocês, meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO	13
ABSTRACT	15
I. INTRODUÇÃO	16
Capítulo I: Da varíola à vaccínia bovina: O impacto dos poxvírus para a humanidade.	16
1.1. Família <i>Poxviridae</i>	16
1.1.1. Taxonomia	16
1.2 Gênero <i>Orthopoxvirus</i>	17
1.2.1 Morfologia e genoma	17
1.2.2 Ciclo de multiplicação	20
1.3- A História natural do VACV.....	23
1.3.1 Vacinas anti-varíola	23
1.3.2 Vaccínia bovina.....	26
1.4 – Interação vírus-hospedeiro	28
1.4.1 – Patogênese e manifestações clínicas.....	28
1.4.2 Resposta imune	30
1.4.3 Estratégias de imunoevasão.....	35
1.5 Opções de tratamento contra os OPVs.....	36
Capítulo II: A complexa interação entre os microrganismos colonizadores do trato gastrointestinal com os seus hospedeiros: como modular esse sistema ao nosso favor?	38
1. A microbiota gastrointestinal: instalação, composição e função	38
2. O Histórico dos microrganismos probióticos	40
3. Benefícios dos probióticos à saúde humana	41
4. O Gênero <i>Lactobacillus</i>	42

4.2 O potencial imunomodulador da espécie <i>L. paracasei</i> CNCM I-2116 (ST11)	44
II. JUSTIFICATIVA	45
III. OBJETIVOS	46
3.1. Objetivo geral	46
3.2. Objetivos específicos	46
IV. FLUXOGRAMA DE TRABALHO	47
V. METODOLOGIA	48
5.1. Sistemas celulares	48
5.1.1. Células VERO e BSC40	48
5.2. Vírus	48
5.3. Multiplicação viral em células Vero	48
5.4. Purificação viral	49
5.5. Titulação viral	49
5.6. Cultivo do probiótico	50
5.7. Inativação do probiótico	50
5.8. Quantificação do probiótico	51
5.9. Animais	51
5.10. Desenho experimental	51
5.11. Infecção dos animais	54
5.12- Titulação viral dos órgãos processados (CAMPOS & KROON, 1993 - modificado)	54
5.13- Dosagem de citocinas	55
5.13.1 Ensaio Imunoenzimático ligado a enzima (ELISA)	55
5.13.2 PCR em tempo real	56
5.13. Análises histopatológicas	57
5.13. Análises estatísticas	57
VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO PARCIAL	58
6.1. Multiplicação, purificação e titulação viral	58

6.2. Quantificação do probiótico.....	58
6.3. Infecção de camundongos Balb/C com VACV-WR e esquemas de tratamento.....	58
6.3.1 Tratamento utilizando probiótico vivo após a infecção.....	58
6.3.2. Tratamento com o probiótico antes da infecção	60
6.3.3. Tratamento com probiótico inativado pelo calor	64
6.3.4. Título viral em órgãos de camundongos infectados com <i>Vaccinia virus</i> tratados com probiótico	67
6.4. Avaliação do perfil de citocinas produzidas durante o tratamento com o probiótico	71
6.5. Dosagem dos genes estimulados por interferon por PCR em tempo real	77
6.6. Análises Histopatológicas	79
VI. DISCUSSÃO	80
VIII- CONCLUSÕES	91
IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Morfologia das partículas dos ortopoxvírus.....	18
FIGURA 2: Eletromicrografia de transmissão de IMV(A), IEV(B) e EEV(C)...	19
FIGURA 3: Representação esquemática do genoma dos <i>Orthopoxvirus</i>	20
FIGURA 4: Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos poxvírus.....	23
FIGURA 5: <i>Eczema vaccinatum</i>	25
FIGURA 6: Manifestações clínicas da vaccínia bovina	27
FIGURA 7: Ativação de ISGs por IFNs.....	34
FIGURA 8: Desenho Experimental	54
FIGURA 9: Variação percentual média diária do peso (A) e curva de sobrevivência (B) de camundongos Balb/c infectados.....	61
FIGURA 10: Manifestações clínicas decorrentes da infecção intranasal com VACV-WR em camundongos Balb/C no sexto d.p.i, tratados ou não com probiótico vivo.....	64
FIGURA 11: Variação percentual média diária do peso (A) e curva de sobrevivência (B) de camundongos Balb/c infectados com VACV.....	64
FIGURA 12: Variação percentual média diária do peso (A) e curva de sobrevivência (B) de camundongos Balb/c infectados com VACV.....	66
FIGURA 13: Manifestações clínicas decorrentes da infecção intranasal com VACV-WR em camundongos Balb/C no sexto d.p.i, tratados ou não com probiótico inativado.....	67

FIGURA 14: Títulos virais de VACV-WR em órgãos de camundongos infectados pre tratados e pos tratados com probiótico	69
FIGURA 15: Título viral no pulmão(A), cérebro(B) e fígado(C) dos camundongos infectados com VACV- WR, tratados ou não com probiótico, no 3° e 9° d.p.i.....	71
FIGURA 16: Níveis de IFN γ no pulmão	73
FIGURA 17: Níveis de IL-17 no pulmão	73
FIGURA 18: Níveis de TNF α no pulmão	74
FIGURA 19: Níveis de IL-10 no pulmão	76
FIGURA 20: Níveis de IFN α 2 (RNAm) no pulmão	76
FIGURA 21: Níveis de IFN β (RNAm) no pulmão.....	77
FIGURA 22: Níveis de IFN λ (RNAm) no pulmão.....	77
FIGURA 23: Níveis de OAS (RNAm) no pulmão	79
FIGURA 24: Níveis de PKR (RNAm) no pulmão.....	79
FIGURA 25: Análises histológicas dos pulmões de camundongos pós-tratados com o probiótico e dos grupos controle.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

µg: Microgramas

µL: Microlitro

ARAV: Araçatuba virus

ATCC: American type cell collection

CDV: Cidofovir

CEBIO/UFMG: Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais

CETEA: Comitê de Ética Animal

CEV: Vírus envelopados associados à célula

CPXV: *Cowpox virus*

CT: Ciclo limiar

CTGV: Cantagalo virus

DA: Dermatite atópica

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTP's: Desorribonucleotídeo trifosfatado

dpi: Dias após a infecção

ECP: Efeito citopático

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

EEV: Vírus envelopado extracelular

eIF2 α : Fator de iniciação eucariótico 2

ELISA: Ensaio imunoenzimático ligado à enzima

EUA: Estados Unidos da América

FAO: Organização de Alimentos e Agricultura

FDA: Food and Drug Administration

g: Força gravitacional

g: Gramas

GAF: Fator ativado por interferon

GALT: Gut-associated lymphoid tissue

GAS: Sequência ativada por interferon gama

GP1V: Guarani P1 vírus

GP2V: Guarani P2 vírus

HE: Hematoxilina e eosina

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses
IEV: Vírus intracelular envelopado
IgA: Imunoglobulinas A
IL: Interleucina
IMV: Vírus maduro intracelular
INF: Interferon
IRFs: Fatores Regulatórios de interferon
ISGs: Transcrição dos genes estimulados por interferon
ISGF3: fator genético 3 estimulador de IFN
ISRE (elemento responsivo estimulado por interferons
ITRs: Regiões terminais invertidas
Jaks: Janus quinases
kpb: Kilo pares de base
MEM: Meio mínimo essencial de Eagle
mg: Miligrama
MHC: *Major histocompatibility complex*
mL: Mililitros
mM: Milimolar
MMLV-RT: *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*
MOI: Multiplicidade de infecção
MPXV: *Monkeypox virus*
mRNA: Ácido ribonucléico mensageiro
MRS: Caldo De Man, Rogosa & Sharpe
MX: Gene de resistência a mixovírus
MX1: gene de resistência a mixovírus 1 murino
NK: Células natural killers
NYCBH: New York City Department of Health Laboratory
OAS: 2'5'oligo adenilato sintetase
OMS: Organização Mundial de Saúde
OPV: *Orthopoxvirus*
p/v: Peso por volume
PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos
PBS: Tampão fosfato salina
PCR: Reação em cadeia da Polimerase
pfu: Unidades formadores de placas

pH: Potencial hidrogeniônico
PKR: Proteína quinase R dependente de RNA dupla fita
PRRs: Receptores de reconhecimento de padrões moleculares
RNA: Ácido ribonucléico
RNase L: Endorribonuclease latente
rpm: Rotações por minuto
SFB: Soro fetal bovino
STATs: Transdutores de sinais e ativadores de transcrição
TCD4+: Células T auxiliares
TCD8+: Células T citotóxicas
TLR: Receptor do tipo Toll
TNF: Fator de necrose tumoral
Tyks: Tirocinas quinases
U: Unidade
UFC: Unidade formadora de colônia
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
VACV: *Vaccinia virus*
VACV-BR: *Vaccinia virus* brasileiro
VACV-WR: Western Reserve
VARV: *Variola virus*
VB: *Vaccinia* bovina
VSV: *Vesicular stomatitis virus*

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia-Universidade Federal de Minas Gerais

A ADMINISTRAÇÃO DIÁRIA DO PROBIÓTICO *LACTOBACILLUS PARACASEI* ST11 REDUZ A LETALIDADE CAUSADA POR *VACCINIA VIRUS* EM MODELO MURINO

ANA CLÁUDIA DOS SANTOS PEREIRA ANDRADE

ORIENTADOR: Jônatas Santos Abrahão

CO-ORIENTADORES: Flaviano dos Santos Martins

Danilo Bretas de Oliveira

Belo Horizonte, setembro de 2015

O *Vaccinia virus* (VACV), espécie protótipo do gênero *Orthopoxvirus* (OPV), família *Poxviridae*, desempenhou um importante papel para a humanidade devido seu uso durante a campanha de erradicação da varíola. O fim da vacinação contra varíola ocorreu em 1980, o que levou diminuição da cobertura vacinal na humanidade e favoreceu a emergência de outros OPV em diversas regiões do mundo. O VACV é o agente etiológico da vaccínia bovina (VB), uma zoonose emergente que tem sido associada a problemas econômicos, sociais, veterinários e de saúde pública, principalmente no Brasil e na Índia. Apesar da importância dos surtos de VB, existem poucas opções terapêuticas disponíveis comercialmente para o tratamento de infecções causadas pelos OPV. Recentemente, a utilização de microrganismos probióticos tem sido proposta como uma nova abordagem terapêutica para o controle de diversas infecções virais. No entanto, as atividades que os microrganismos probióticos podem exercer durante uma infecção causada por um poxvírus são desconhecidas. Este estudo investigou os efeitos gerados pela ingestão diária de *L. paracasei* ST11 durante uma infecção letal com VACV em modelo murino. Os resultados mostraram que o tratamento utilizando *L. paracasei* ST11 após a infecção com VACV em camundongos Balb/C foi capaz de diminuir a letalidade e a disseminação viral. Essa atividade é mediada pela diminuição de citocinas pró-inflamatórias como IFN gama, TNF alpha e IL-17, associado a um aumento da expressão de citocinas com atividade antiviral, IFN-alpha IFN beta e IFN lambda, além dos genes

estimulados por interferon, OAS e PKR. Estes resultados fornecem informações sobre como os probióticos podem modular o sistema imune do hospedeiro durante uma infecção com VACV.

ABSTRACT

Master Thesis

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia-Universidade Federal de Minas Gerais

DAILY ADMINISTRATION OF *Lactobacillus paracasei* ST11 PROBIOTIC REDUCES LETHALITY CAUSED BY *Vaccinia virus* IN MURINE MODEL

ANA CLÁUDIA DOS SANTOS PEREIRA ANDRADE

ADVISER: Jônatas Santos Abrahão

CO ADVISORS: Flaviano dos Santos Martins

Danilo Bretas de Oliveira

Belo Horizonte, August, 2015

Vaccinia virus (VACV), the prototype specie of *Orthopoxvirus* (OPV) genus, *Poxviridae* family, played an important role for humanity because of its use during the smallpox eradication campaign. Following smallpox eradication, other OPV have emerging worldwide. VACV is the etiologic agent of the bovine vaccinia (BV), an emerging zoonotic disease that has been associated with economic, social, veterinary and public health issues, especially in Brazil and India. Despite the importance of VB outbreaks there are few therapeutic options available commercially for treatment of OPV infections. In recent years, the probiotic microorganisms utilization has been proposed as a new therapeutic approach for the control of several viral diseases. However, it is unknown the relationship between probiotics microorganisms and poxvirus. This study investigated the effects generated by the daily intake of *L. paracasei* ST11 in a lethal mice VACV infection. The results showed that treatment using this probiotic after infection with VACV in Balb/c mice was able to decrease the mortality and viral spread. This activity is mediated by the reduction of proinflammatory cytokines such as IFN- γ , TNF- α and IL-17, associated with an increased expression of cytokines with antiviral activity, IFN- α and IFN- β and IFN- λ , in addition of interferon-stimulated genes, OAS and PKR. These results provide information about how probiotics may modulate the host's immune system during VACV infection.

I. INTRODUÇÃO

Capítulo I: Da varíola à vaccínia bovina: O impacto dos poxvírus para a humanidade.

1.1. Família *Poxviridae*

1.1.1. Taxonomia

A família *Poxviridae* é dividida em duas subfamílias, *Chordopoxvirinae* e *Entomopoxvirinae*, cujos hospedeiros são vertebrados e invertebrados, respectivamente (DAMON, 2013). A subfamília *Chordopoxvirinae* agrupa dez gêneros: *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Cervidpoxvirus*, *Crocodylidpoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Yatapoxvirus*, além da espécie *Squirrelpox virus*, ainda não associada a nenhum gênero (Tabela 1). A subfamília *Entomopoxvirinae* é constituída por três gêneros denominados *Alphaentomopoxvirus*, *Betaentomopoxvirus*, *Gammaentomopoxvirus*, além das duas espécies *Diachasmimorpha entomopoxvirus* e *Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus* 'O' que permanecem sem classificação em termos de gênero [INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV), 2014].

A subfamília *Chordopoxvirinae* é a mais estudada principalmente porque muitos membros desse grupo estão relacionados com infecções em humanos, tais como *Orthopoxvirus* (OPV), *Parapoxvirus*, *Yatapoxvirus*, e *Molluscipoxvirus*. Dentre os representantes dessa subfamília, destaca-se o gênero *Orthopoxvirus* que agrupa uma espécie relacionada exclusivamente com infecções em humanos, o *Variola virus* (VARV), e espécies zoonóticas, tais como *Monkeypox virus* (MPXV), *Cowpox virus* (CPXV) e *Vaccinia virus* (VACV) (ICTV, 2014, revisado por MOSS, 2013).

TABELA 1 – Gêneros da subfamília *Chordopoxvirinae*.

Gênero	Espécie protótipo	Número de espécies
<i>Avipoxvirus</i>	<i>Fowlpox virus</i>	10
<i>Capripoxvirus</i>	<i>Sheeppox virus</i>	3
<i>Cervidpoxvirus</i>	<i>Mule deerpox virus</i>	1
<i>Crocodylidpoxvirus</i>	<i>Nile crocodilepox virus</i>	1
<i>Leporipoxvirus</i>	<i>Myxoma virus</i>	4
<i>Molluscipoxvirus</i>	<i>Molluscum contagiosum virus</i>	1
<i>Orthopoxvirus</i>	<i>Vaccinia virus</i>	10
<i>Parapoxvirus</i>	<i>Orf virus</i>	4
<i>Suipoxvirus</i>	<i>Swinepox virus</i>	1
<i>Yatapoxvirus</i>	<i>Yaba monkey tumor virus</i>	2
Sem gênero definido	<i>Squirrelpox virus</i>	1

Fonte: ICTV, 2014

1.2 Gênero *Orthopoxvirus*

1.2.1 Morfologia e genoma

As partículas dos OPV são envelopadas apresentando estrutura complexa em formato oval (semelhante a um tijolo) ou pleomórfica, com dimensões variando entre 140-260nm de diâmetro por 220-450nm de comprimento. Os principais elementos estruturais destas partículas são o cerne, corpúsculos laterais e membrana(s). O cerne dos OPV apresenta conformação bicôncava e tem a função de abrigar o genoma, enzimas e fatores transcricionais de genes precoces. A membrana externa é constituída por bicamada lipídica, onde se encontram proteínas de superfície, que por sua vez, reveste corpúsculos dispostos lateralmente ao cerne viral. Algumas formas virais apresentam uma membrana adicional, denominada envelope, também de natureza lipoprotéica, constituindo o componente mais externo da partícula (Figura 1). (*revisado por MOSS, 2007; revisado por McFADDEN, 2005; CYRCLAFF, 2004*).

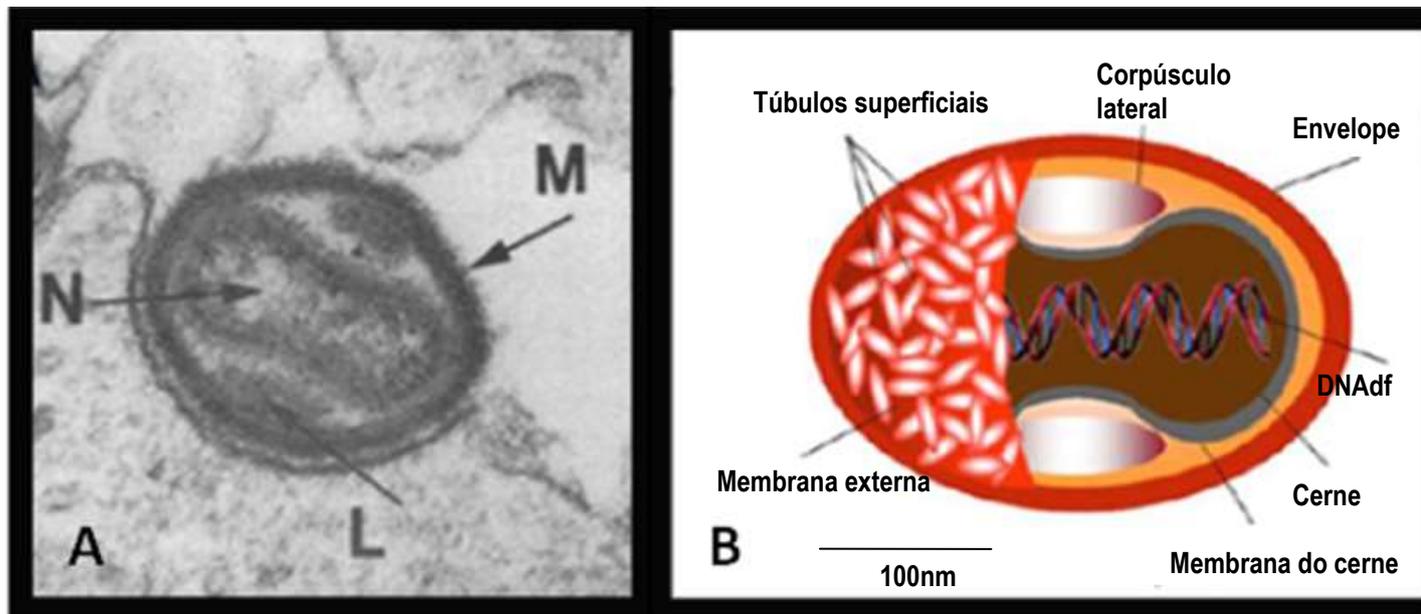


FIGURA 1: Morfologia da partícula dos ortopoxvírus. A) Micrografia eletrônica de um ortopoxvírus, evidenciando o cerne em forma de halter, os corpúsculos laterais e a membrana externa. Abreviações: N: cerne; L: corpúsculo lateral; M: membrana. B) Representação esquemática da partícula dos ortopoxvírus. Fontes: MOSS, 2001; FENNER, 1989 – modificado.

Durante o ciclo de multiplicação dos poxvírus são formadas partículas com diferenças estruturais, sendo que algumas apresentam uma única membrana e são denominadas vírus maduros intracelulares (IMV), outras possuem três membranas, os chamados vírus envelopados intracelulares (IEV) e ainda, partículas extracelulares que possuem duas membranas denominadas vírus extracelular envelopado (EEV). Além disso, podem ser formadas partículas extracelulares que permanecem associadas à membrana da célula hospedeira apresentando assim como os EEVs duas membranas, e são denominados vírus envelopados associados à célula (CEV) (Figura 2) (revisado por MOSS, 2013).

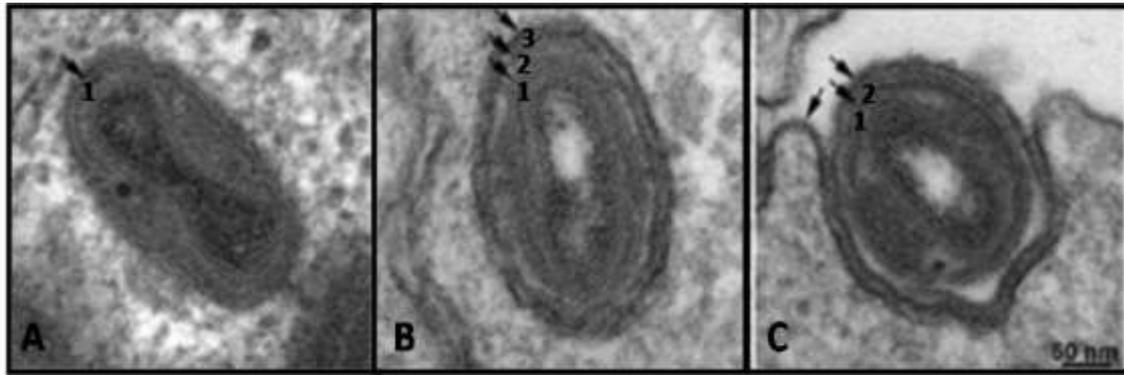


FIGURA 2: Eletromicrografia de transmissão de IMV(A), IEV(B) e EEV(C). As setas e números indicam membranas. Fonte: MOSS, 2013 – modificado.

Os OPV apresentam genoma constituído por uma molécula de DNA dupla-fita linear. Elementos essenciais na replicação do genoma desses vírus, como a enzima RNA polimerase dependente de DNA, enzima de metilação e fatores transcricionais de genes precoces estão presentes no cerne da partícula viral (FENNER, 1989; *revisado por* MOSS, 2013).

A porção central do genoma é composta por aproximadamente 90 genes conservados, sendo estes, responsáveis pela codificação de proteínas associadas à replicação do genoma e proteínas estruturais (GUBSER, 2004; *revisado por* McFADDEN, 2005; DRUMOND *et al.*, 2007). As extremidades do genoma são compostas de regiões terminais invertidas repetidas (ITRs- do inglês inverted terminal repeats) que são constituídas por sequências repetidas idênticas e opostas em ambas as extremidades do genoma, que podem variar, entre os diferentes ortopoxvírus. Estas regiões codificam genes associados à interação vírus-hospedeiro, conferindo características exclusivas de patogênese e imunomodulação a cada espécie (GUBSER *et al.*, 2004, *revisado por* SMITH *et al* 2013). As porções terminais do genoma são conectadas por sequências nucleotídicas conservadas, de fitas simples, ricas em adenina e timina que são fundamentais na formação de concatâmeros durante a replicação do genoma (FIGURA 3) (*revisado por* MOSS, 2013).

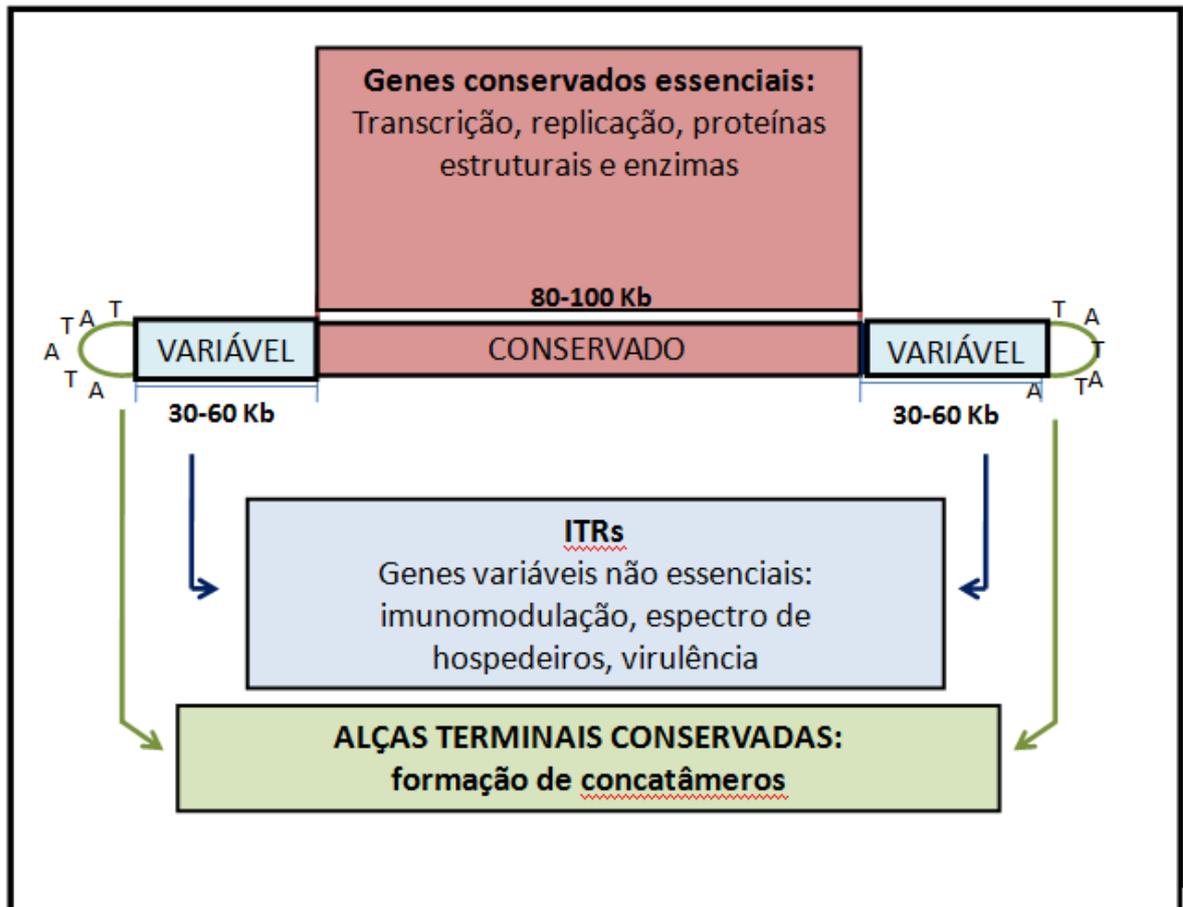


Figura 3: Representação esquemática do genoma dos *Orthopoxvirus*. O genoma possui aproximadamente 200 kb que é dividido em uma região central conservada e em regiões terminais invertidas variáveis (ITRs). Nas extremidades estão demonstradas as alças terminais. Fonte: SMITH & MACFADDEN, 2002- Adaptado.

1.2.2 Ciclo de multiplicação

O ciclo de multiplicação dos poxvírus ocorre apenas no citoplasma da célula hospedeira, sendo esse um fato interessante em se tratando de vírus de DNA. Durante a multiplicação do VACV são produzidas partículas virais distintas, conhecidas como, IMVs, IEVs, EEVs, CEVs, como descrito anteriormente. Com relação à capacidade dessas partículas de infectar a célula hospedeira é descrito que EEVs, CEVs e IMVs são infecciosas, enquanto os IEVs não são capazes de infectar as células. Isso porque as partículas dos IEVs não possuem proteínas de ligação virais expostas por

apresentarem também uma membrana externa adicional quando comparado aos vírus extracelulares (Figura 4) (SMITH *et al.*, 2002; MOSS, 2006).

O ciclo de multiplicação dos poxvirus (Figura 4) tem início quando partículas infecciosas realizam adsorção na membrana da célula hospedeira. (SMITH *et al.*, 2003; *revisado por* SCHMIDT *et al.*, 2012). Após a adsorção, ocorre o processo de fusão do envelope viral com a membrana celular. As partículas penetram nas células através da internalização macropinocítica (MERCER *et al.*, 2010). Além disso, a penetração pode ocorrer através da fusão com a membrana plasmática, a um pH neutro ou através de vesículas endossomais a um pH baixo. Estudos anteriores fornecem evidências de que a utilização destas vias varia de acordo com o tipo de célula, da amostra viral e das condições experimentais utilizadas (WHITBECK *et al.*, 2009; BENGALI *et al.*, 2012; *revisado por* SCHMIDT *et al.*, 2012).

Após a penetração, ocorre o desnudamento primário com liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula, o que propicia uma expressão gênica temporal. Inicialmente são expressos genes precoces ativados por fatores transcricionais virais responsáveis por controlar a expressão de proteínas moduladoras da resposta imune inata e fatores de crescimento celular e proteínas envolvidas na replicação do genoma (*revisado por* McFADDEN, 2005; McLENNAN, 2007). Em seguida, ocorre um desnudamento secundário, dando início a replicação do DNA com a formação de concatâmeros (BROYLES, 2003; *revisado por* ROBERTS & SMITH, 2008). Genes intermediários serão expressos regulando a expressão de genes tardios. Os genes tardios por sua vez codificam proteínas estruturais, que irão compor a partícula, além de enzimas e fatores de transcrição que serão empacotados durante a etapa de morfogênese do ciclo (*revisado por* MOSS, 2007; *revisado por* McFADDEN, 2005; BROYLES, 2003).

A morfogênese dos poxvirus ocorre em regiões do citoplasma ricas em proteínas virais e do hospedeiro, denominadas fábricas virais (*revisado por* ROBERTS e SMITH, 2008). A formação de partículas se inicia de forma sequencial, a partir de estruturas lipoprotéicas denominadas crescentes, que dão origem a partículas uniformes e esféricas, o vírus imaturo (IV) que após passarem por um essencial processo proteolítico originarão os IMVs (MOSS, 2006). Os IMVs compõem a maior parte da progênie viral infecciosa, sendo liberada durante a lise celular. Os IMVs podem ser transportados através de

microtúbulos até o complexo de Golgi, onde adquirem uma dupla membrana, dando origem aos IEVs (MOSS, 2006).

As partículas do tipo EEVs são formadas quando as IEVs são transportadas a membrana da célula hospedeira e liberadas por fusão de membrana perdendo sua membrana mais externa. As EEVs podem ser liberadas ou permanecerem associadas à membrana celular gerando os CEVs (SMITH *et al.*, 2002; *revisado por* ROBERTS & SMITH, 2008). Caudas de actina são polimerizadas sob as partículas dos CEVs, e estas são propelidas em direção às células vizinhas (*revisado por* MOSS, 2013, *revisado por* McFADDEN, 2005). Esta capacidade dos poxvírus de permanecerem associados à membrana celular está diretamente relacionada à sua disseminação célula a célula no hospedeiro (DOCEUL *et al.*, 2010).

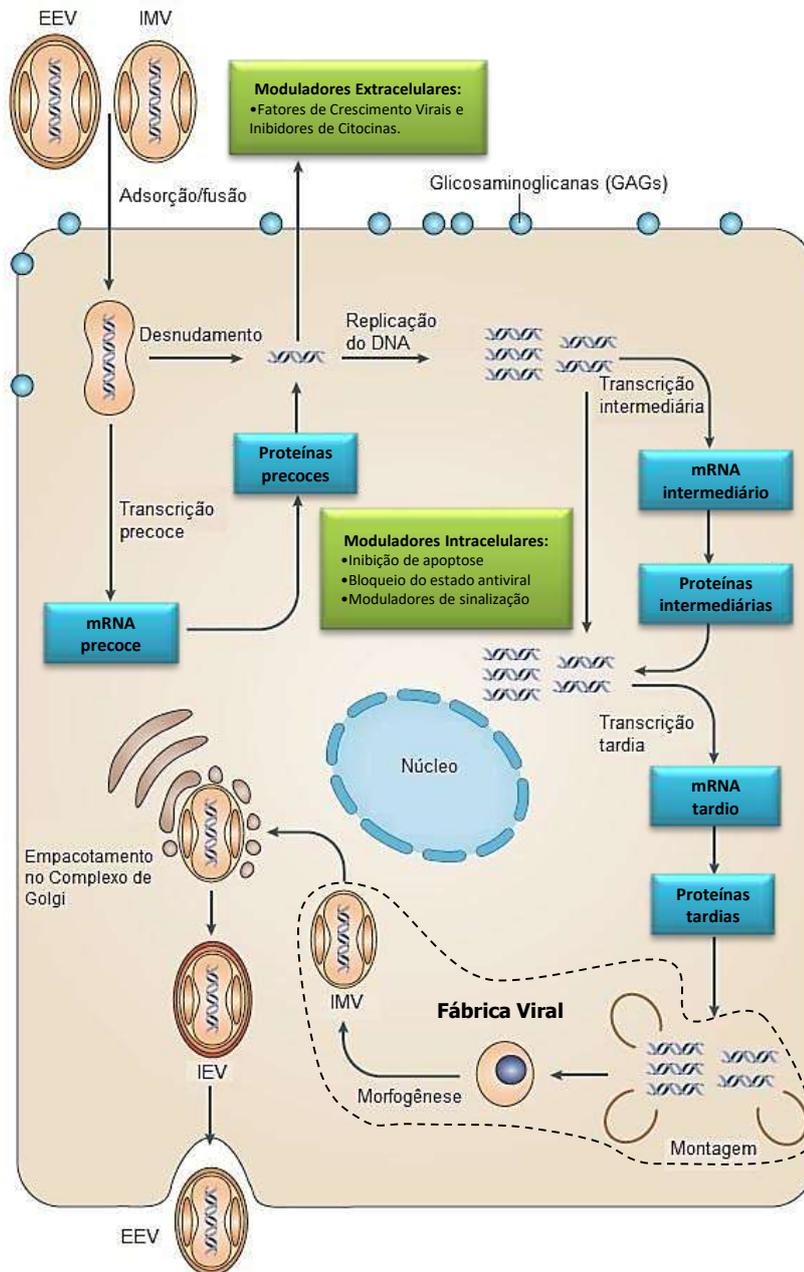


FIGURA 4: Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos poxvírus (McFADDEN, 2005 – modificado).

1.3- A História natural do VACV

1.3.1 Vacinas anti-varíola

A vacinação contra a varíola, introduzida pela primeira vez por Edward Jenner em 1796, foi a intervenção de saúde pública mais eficaz na história humana. Um poxvírus de identidade incerta, causador de doença branda em bovinos e ordenhadores foi utilizado como vacina. Para isso, foi feita a

inoculação de preparados de escarificação das lesões geradas em infecções causadas por esse vírus (FENNER *et al.*, 1988). Como resultado desse novo método os casos da doença foram reduzidos consideravelmente na Inglaterra e outros países da Europa, no entanto em outros continentes a varíola continuava causando milhões de mortes. Assim, em 1967, a Organização Mundial de Saúde (OMS) iniciou uma campanha de vacinação mundial contra varíola, sendo utilizadas amostras de VACV (FENNER *et al.*, 1988). A espécie VACV foi utilizada na produção da vacina utilizada nessa campanha pelo fato de oferecer alta proteção imunogênica, por produzir somente lesões localizadas, pela característica de ser menos virulento e possuir alto grau de reatividade imunológica cruzada com o VARV (*revisado por* HALLER *et al.*, 2014).

O VARV é o agente etiológico da varíola, a doença infecciosa que causou mais mortes no mundo (*revisado por* McFadden, 2005). Trata-se de uma doença exantemática febril sistêmica, incluindo sinais e sintomas como dor nas costas, dor de cabeça, vômito e prostração. Lesões geralmente se manifestavam nas palmas das mãos, plantas dos pés e face, que evoluem de iniciais máculas e pápulas até a fase de vesículas e pústulas (HENDERSON *et al.*, 1999; *revisado por* HALLER *et al.*, 2014). Assim como ocorre com outras espécies do gênero OPV, mais de um tipo de variante geneticamente e clinicamente diferente ocorre dentre os VARV: a varíola major apresentava-se como o tipo mais virulento (letalidade de até 40%) e a varíola minor, que resultava em manifestações mais brandas, com taxas de letalidade próximas de 1% (BULLER & PALUMBO, 1991; *revisado por* DAMON 2013).

A varíola foi declarada erradicada em 1980 pela OMS após a intensa campanha de vacinação, sendo que o último registro de um caso natural de varíola ocorreu em 1977, na Somália (FENNER *et al.*, 1988). A vacinação contra a varíola foi suspensa em 1980, devido principalmente à erradicação da doença e pelos efeitos adversos observados em alguns pacientes em decorrência da vacinação. A vacina ainda continua sendo administrada em alguns profissionais da saúde e militares nos Estados Unidos da América (EUA) (*revisado por* ENGLER, 2002, ARTENSTEIN, 2008, DARLING, 2014). A vacinação de militares levou a casos de transmissão intrafamiliar, assim como descrito também durante a campanha da OMS (VORA *et al.*, 2008). No

ano de 2007 um caso grave foi documentado, quando um soldado, pouco após ser vacinado, transmitiu VACV para seus familiares, incluindo uma criança de dois anos. Esta criança desenvolveu *eczema vaccinatum*, uma infecção disseminada e potencialmente letal, que induz o surgimento de lesões generalizadas, principalmente no ventre e nos membros (Figura 5) (VORA *et al.*,2008).



FIGURA 5: *Eczema vaccinatum*: Lesões generalizadas no peito e abdômen de uma criança de 2 anos provocadas por VACV. Fonte: VORA *et al*, 2008.

Indivíduos com dermatite atópica (DA) e que são vacinados contra varíola, apresentam maior risco de desenvolver o *eczema vaccinatum* (DARLING *et al.*, 2014). Por isso, a administração de vacinas utilizando o VACV não é recomendada para indivíduos que apresentem DA ativa ou quiescente bem como para as pessoas próximas a esses indivíduos (EAGLER *et al.*, 2002). Os mecanismos que explicam essa maior suscetibilidade ao VACV por estes indivíduos ainda não são completamente esclarecidos. Entretanto, alguns estudos demonstraram que a principal citocina mediadora dessa maior susceptibilidade ao VACV é a interleucina 17 (IL-17) (KAWAKAMI *et al*, 2009; DARLING *et al*, 2014; OYOSHI *et al*, 2009).

1.3.2 Vaccinia bovina

Nas últimas décadas tem ocorrido a emergência de vírus do gênero OPV no mundo, possivelmente devido a suspensão da vacinação global contra varíola o que levou a uma queda da população imune contra os OPVs (DI GIULIO *et al.*, 2004; DURAFFOUR *et al.*, 2013). Dentre esses, podemos destacar os surtos de vaccinia bovina (VB), uma doença exantemática que acomete bovinos e humanos no Brasil que tem como agente causador o VACV. (DUMBELL & RICHARDSON, 1993; *revisado por* FONSECA *et al.*, 1998, DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2007; DRUMOND *et al.*, 2008; ABRAHÃO *et al.*, 2009; ABRAHÃO *et al.*, 2010; ASSIS *et al.*, 2013a, ASSIS *et al.*, 2013b; ABRAHÃO *et al.*, 2015).

A primeira descrição desta doença ocorreu na cidade de Cantagalo, no estado do Rio de Janeiro, em 1999 (DAMASO *et al.*, 2000) e a amostra viral isolada foi denominada Cantagalo vírus (CTGV). Neste mesmo ano, alguns meses antes do surto de Cantagalo, uma amostra de VACV foi isolada de bovinos em um surto exantemático que também acometeu humanos, na cidade de Araçatuba, estado de São Paulo. Essa amostra foi denominada Araçatuba vírus (ARAV) e análises moleculares revelaram que se tratava de um VACV relacionado ao CTGV (TRINDADE *et al.*, 2003).

Até o ano de 2001, as amostras de VACV isoladas em surtos de VB apresentavam características filogenéticas muito similares. Porém, em 2001, na Zona da Mata Mineira, amostras molecularmente diferentes entre si foram isoladas durante um mesmo surto e denominadas Guarani P1 vírus (GP1V) e Guarani P2 vírus (GP2V) (TRINDADE *et al.*, 2006). Com base em diferenças biológicas e moleculares os VACV-BR foram divididos em dois grupos filogeneticamente e biologicamente distintos, denominados Grupo 1 (Cantagalo, Araçatuba, Guarani P2, outros) e Grupo 2 (Guarani P1, BeAn58058, SPAn232) (DRUMOND *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2008; TRINDADE *et al.*, 2007).

Posteriormente, outras amostras de VACV foram isoladas de surtos de VB no Brasil, em diferentes estados brasileiros, como Espírito Santo, Minas Gerais, Pernambuco, Maranhão, Tocantins, Pará, Rio de Janeiro e São Paulo

(DONATELE *et al.*, 2007; TRINDADE *et al.*, 2007; MEDAGLIA *et al.*, 2009; SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009; MEGID *et al.*, 2008, ASSIS *et al.*, 2013a; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A VB é caracterizada pelo aparecimento de lesões localizadas e ulcerativas que ocorrem frequentemente nos tetos e úberes das vacas, sendo comum também no focinho de bezerros quando são amamentados por vacas manifestando as lesões (LEITE *et al.*, 2005; LOBATO *et al.*, 2005). Além disso, quando em humanos, as lesões ocorrem principalmente nas mãos e braços, e com menor frequência na face (SCHATZMAYR *et al.*, 2005) (Figura 6).

A doença é transmitida pelo contato direto com as lesões, que pode ocorrer tanto durante a amamentação dos bezerros como durante a ordenha manual. A ordenha dos diferentes animais por trabalhadores rurais sem proteção nas mãos, ajuda a disseminar a doença no gado e também favorece a infecção dos ordenhadores (LOBATO *et al.*, 2005). Além disso, têm sido descritos casos de transmissão intrafamiliar de VACV associados a surtos de VB (BATISTA *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2014).



FIGURA 6: Manifestações clínicas da vaccínia bovina. Lesões causadas por VACV nos tetos de vacas (A e B), no focinho de bezerros (C) e na mão de ordenhador (D). Fontes: LEITE *et al.*, 2005; SCHATZMAYR *et al.*, 2011.

O tempo de evolução da doença ocorre aproximadamente durante três semanas, sendo que as lesões causadas por VACV no gado podem acarretar o aparecimento de infecções bacterianas secundárias e mastites, gerando um agravamento da doença e impossibilidade de ordenha. Além disso, as lesões geram em muitos casos incapacidade de trabalho dos ordenhadores. Essa situação culmina na diminuição ou interrupção da produção leiteira, gerando perdas econômicas significativas. É importante considerar também que entre as fazendas acometidas, muitas praticam ordenha para subsistência o que leva a um problema não só econômico, mas também social (KROON *et al.*, 2011). Nesse contexto, é importante ressaltar que Minas Gerais é o maior produtor de leite do Brasil, sendo também local de ocorrências constantes de surtos de VB (LEITE *et al.*, 2005; LOBATO *et al.*, 2005; TRINDADE *et al.*, 2006; ASSIS *et al.*, 2012a).

1.4 – Interação vírus-hospedeiro

1.4.1 – Patogênese e manifestações clínicas

O termo patogênese se refere a um balanço entre a biologia do patógeno e do hospedeiro que, em última instância, acarreta na manifestação da doença. Os OPVs causam um amplo espectro de manifestações clínicas dependendo da espécie viral e do hospedeiro envolvido (*revisado por* MCFADDEN, 2005).

O primeiro contato dos OPVs com seus hospedeiros ocorre na superfície cutânea ou em membranas mucosas. No caso do VACV, pequenas abrasões na pele atuam como porta de entrada para o vírus no hospedeiro. Estas abrasões permitem que as partículas virais atinjam a camada basal da epiderme, onde estas são capazes de causar infecção produtiva (DAMON, 2013). A multiplicação viral ocorre na porta de entrada da infecção e, posteriormente, a liberação de mediadores inflamatórios pelas células

epiteliais em consequência da replicação viral gera sintomas inespecíficos como febre e linfadenopatia local (SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009; TRINDADE *et al.*, 2009).

A manifestação clínica mais marcante resultante das infecções geradas pelos OPV é o surgimento de lesões exantemáticas. Primeiramente, é gerada uma vasodilatação dos capilares na derme da região acometida, em seguida há a formação de vesículas contendo alta concentração viral. Essas vesículas favorecem, portanto, a infecção por contato. Posteriormente, as vesículas se tornam pústulas devido ao recrutamento de células inflamatórias. Estas pústulas ulceram e cicatrizam formando crostas, que se desprendem após alguns dias, deixando uma cicatriz (*revisado por* FENNER, 1989; HENDERSON *et al.*, 1999, *revisado por* DAMON, 2007).

A infecção causada pelo VACV gera não apenas lesões localizadas, mas também infecção sistêmica (FERREIRA *et al.*, 2008, RHEFELD *et al.*, 2013, TRINDADE *et al.*, 2014). Neste caso, o VACV primeiramente se multiplica no local de entrada, atinge o sistema linfático e a corrente sanguínea, gerando uma viremia primária. Posteriormente, os vírus se multiplicam em órgãos muito vascularizados (ex: baço e fígado) e alcançam a corrente sanguínea novamente, causando a viremia secundária. Estes vírus podem circular pela corrente sanguínea tanto como partículas livres ou associadas a células sanguíneas. A viremia secundária permite que os vírus alcancem outros órgãos, como rins, intestino, pulmões e pele, nos quais causam lesões ulcerativas típicas (FENNER, 1948; *revisado por* ESTEBAN & BULLER, 2005, *revisado por* CHAPMAN *et al.*, 2010).

Os camundongos são considerados os melhores modelos animais para estudos de patogênese para maioria dos OPVs, incluindo VACV (JACOBS *et al.*, 2006). As vias de infecção utilizadas para VACV podem ser, intranasal, intracerebral, intraperitonal e aerossol, as quais são bastante utilizadas para modelos de infecções sistêmicas. Além disso, as vias, intravenosa e intradérmica (escarificação nas patas, na cauda e orelha) também são bastante empregadas (BRIODY, 1959; TURNER, 1967; BULLER, 1985; ANDREW *et al.*, 1989; TSHARKE *et al.*, 2002; MESEDA *et al.*, 2005; ABDALRHMAN *et al.*, 2006, FERRIER-REMBERT *et al.*, 2007).

A via intranasal apresenta como principal vantagem o fato de ser a via mais frequente de transmissão entre os OPVs (FENNER, 1989, *revisado por* CHAPMAN *et al.*, 2010). Além de ser uma via eficiente, permite avaliar e diferenciar a virulência das amostras de VACV (FERREIRA *et al.*, 2008a). A amostra *Vaccinia virus* Western reserve (VACV-WR) é uma amostras de referência para estudos com VACV. Essa amostra foi obtida após dezoito passagens sucessivas da amostra vacinal New York City Board of Health em cérebros de camundongos (BRONSON e PARKER, 1941). A infecção de camundongos Balb/c por via intranasal utilizando essa amostra gera pneumonia com graves lesões degenerativas, necrosantes e hemorrágicas (FERREIRA *et al.*, 2008a). Já a infecção por inoculação cutânea com VACV-WR, acarreta em uma infecção limitada que é bem tolerada, até em doses equivalentes a $5,0 \times 10^5$ unidades formadoras de placa (pfu) (WILLIAMSON *et al.*, 1990).

1.4.2 Resposta imune

A resposta imune induzida no hospedeiro frente a uma infecção mediada pelos OPVs consiste em um processo complexo e ainda não completamente elucidado. De um modo geral, em humanos, a resposta imune é iniciada após a penetração viral nas células epiteliais, com consequente produção de interferons (INFs) e outras citocinas. Os IFNs são capazes de induzir, um estado antiviral em células vizinhas, bem como no recrutamento de leucócitos para o foco da infecção (SMITH & KOTWALL, 2002; DAMON *et al.*, 2007).

Células dendríticas e macrófagos, que migraram para o foco inicial de infecção, fazem o reconhecimento das partículas virais através dos seus receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRR's – pattern recognition receptors), os quais podemos citar os receptores do tipo Toll (TLR's – toll like receptors). Além desses receptores de superfície celular, receptores citoplasmáticos também participam da resposta inata a poxvírus, reconhecendo moléculas de DNA e RNA produzidos durante a infecção (SMITH & KOTWALL, 2002; DAMON *et al.*, 2013).

A ativação desses receptores leva à produção de várias citocinas, como a IL-1, IL-12, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e IIFN's do tipo I (α e β), IL-15 e IL-18. Essas citocinas estimulam a diferenciação das células T

auxiliares (TCD4+) que estão quiescentes em células ativas produtoras de INF- γ e TNF- α auxiliando no controle da multiplicação viral (SMITH & KOTWALL, 2002; DAMON *et al.*, 2007).

Células T citotóxicas (TCD8+), importantes na eliminação de células infectadas, também são ativadas pela IL-12 e por IFN's do tipo I. Ambas as células TCD4+ e TCD8+ ativadas podem persistir por até 75 anos após a vacinação contra a varíola (AMANNA *et al.*, 2006). Juntamente com essas células, há ação de células natural killers (NK), que exercem um importante papel no início da infecção, antes da formação da resposta adaptativa específica contra o vírus (BURSHTYN, 2013).

Estudos utilizando camundongos como modelos para infecção causada por VACV mostraram que em uma infecção primária aguda, a resposta de anticorpos dependente de linfócitos T CD4+ mais importante para a eliminação viral que a resposta mediada por linfócitos T CD8 + . Os anticorpos anti-VACV podem proteger os camundongos de forma eficiente, mesmo quando há deficiência nos níveis de linfócitos T CD4 + ou T CD8 + . Entretanto, em uma infecção primária na ausência dos linfócitos T CD4+ e dos anticorpos específicos contra o VACV, os linfócitos T CD8+ exercem um importante papel na proteção dos camundongos contra a infecção (XU *et al.*, 2004; AMANNA *et al.*, 2006).

A resposta imune humoral tem participação em diversos mecanismos para a eliminação dos VACVs: 1) ligação de anticorpos à partícula viral causando agregação; 2) obstruindo a adsorção e internalização do vírus à célula hospedeira; 3) ligação ao vírus, permitindo a lise via complemento; 4) opsonização, resultando em fagocitose; ou ainda 5) citotoxicidade celular dependente de anticorpos (antibody dependent cellular cytotoxicity – ADCC) (SMITH & KOTWAL, 2002; XU *et al.*, 2004).

1.4.2.1. Interferon e sua atividade antiviral

IFNs correspondem a uma família heterôgenea de citocinas que são expressas por várias células de vertebrados em resposta ao estímulo por determinados patógenos. Atuam como a primeira resposta contra uma gama de infecções virais, levando ao controle precoce da infecção ou a montagem de uma resposta imune adequada (LAROCQUE *et al.*, 2011). Atualmente são

conhecidas três classes, denominadas IFN do tipo I, compreendendo principalmente IFNs alfa (14 – 20 subtipos) e IFN beta, IFN do tipo II (IFN gama) e IFNs do tipo III ou IFNs lambda (três subtipos) (*revisado por BONJARDIM, FERREIRA e KROON, 2009*).

Quase todas as fases de resposta imune inata e adaptativa tem atuação de IFNs. Todas as classes de IFNs compartilham a capacidade de aumentar a expressão de proteínas MHC (do inglês *major histocompatibility complex*) de classe I e assim promover respostas de células TCD8+. Em contraste, apenas IFN gama é capaz de induzir a expressão de proteínas MHC de classe II, promovendo assim respostas de células TCD4+. IFNs podem também ter efeitos diretos sobre os linfócitos B, regulando o desenvolvimento, a proliferação, e a secreção de imunoglobulinas. Outra função imunomodulatória corresponde à ação sobre células NK, aumentando sua citotoxicidade e estimulando a sua proliferação (BORDEN *et al.* 2007; SEN, 2001; THOMAS *et al.*, 2011).

Os IFNs do tipo I apresentam maior atuação em uma resposta imune inicial eficaz contra infecções virais (*revisado por BONJARDIM, 2005*), sendo por sua vez divididos em diferentes subtipos: alfa, beta, delta, epsilon, kappa, omega e tau (LEVY, MARIÉ e DURBIN, 2011). Vários tipos celulares são capazes de produzir IFNs do tipo I, tais como células dendríticas, fibroblastos, células epiteliais e macrófagos. Já o IFN do tipo II é produzido por tipos celulares mais restritos, como as células NK, linfócitos auxiliares CD4 e linfócitos citotóxicos CD8+. O IFN γ , é um potente estimulador da resposta imune do tipo Th1, a qual é importante para eliminação viral em várias infecções (*revisado por BORDEN et al, 2007; LAROCQUE et al., 2011*).

A produção de IFNs é transiente e culmina do desencadeamento de uma cascata de transdução de sinal que requer a ativação de receptores que reconhecem PRRs por ligação a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que correspondem aos mais diversos produtos microbianos (*revisado por BORDEN et al., 2007*). Os fatores de transcrição mais importantes ativados pela cascata de indução dos IFNs são os Fatores Regulatórios de IFN (IRF), especialmente IRF3 e IRF7, e NF κ B (*revisado por BONJARDIM, FERREIRA, KROON et al, 2009; revisado por BORDEN et al., 2007*).

Os IFNs expressos irão desencadear a ativação da transcrição dos genes estimulados por interferon (ISGs), sendo estes os mediadores dos efeitos antivirais e outras atividades biológicas. Os IFNs tipo I promovem a fosforilação de membros da família Janus quinases (Jaks) ou tirosinas quinases (Tyks), que uma vez ativadas fosforilam transdutores de sinais e ativadores de transcrição (STATs). As STATs formam heterodímeros STAT1/STAT2 que ligam-se a um terceiro fator p48/IRF9, formando o fator genético 3 estimulador de IFN (ISGF3) que por sua vez se ligará a porção ISRE (elemento responsivo estimulado por interferons) presente na região promotora dos ISGs, para a transcrição destes genes. Os IFNs λ também ativam as cascatas de sinalização muito semelhantes as que são ativadas pelos IFNs tipo I, entretanto os receptores celulares para essa classe de IFN são diferentes. O IFN tipo II também induz ativação de JAK 1-2, que fosforilam STAT1, que uma vez fosforilado formam homodímeros STAT1/STAT1 para formar o fator ativado por interferon (GAF). Esta proteína reconhece e se liga a sequência regulatória conhecida como Sequência Ativada por IFN gama (GAS) e inicia a transcrição gênica (Figura 7). Uma vez expressos, os ISGs desempenham ações que limitam a replicação e propagação viral, e que modulam indiretamente a maturação da resposta imune adaptativa (BERTLETT *et al*, 2005; SEN, 2001; *revisado por* BONJARDIM, FERREIRA, KROON, 2009).

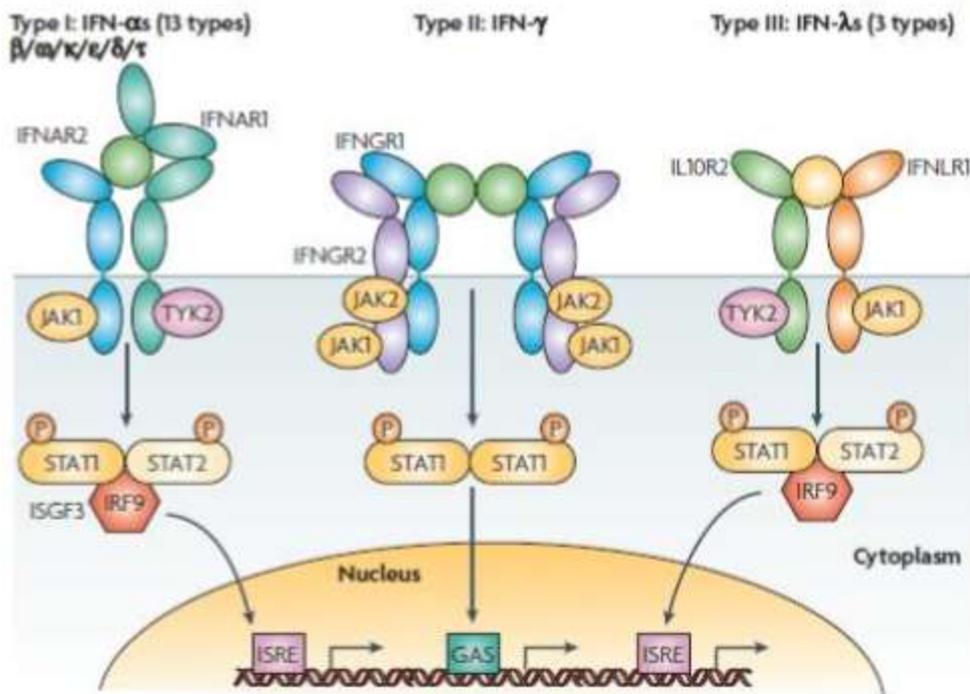


Figura 7: Ativação de ISGs por IFNs. Os IFNs são reconhecidos por receptores celulares específicos e ativam JAK1 a qual é responsável pela fosforilação de moléculas STAT. Em seguida, é formado um heterotrímero, composto por STAT1, STAT2 e IRF9, denominado ISGF3, o qual migra para o núcleo celular e leva a expressão dos ISGs. Fonte: BORDEN *et al.*, 2007.

Os ISGs correspondem a um grupo diverso de mais de 300 genes, dentre os quais se destacam por sua ampla caracterização o homólogo humano para o gene de resistência a mixovírus (Mx) 1 murino, 2'5'oligo adenilato sintetase (2'5'OAS) e proteína quinase R dependente de RNA dupla fita (PKR) (SEN, 2001; SAMARAJIWA, *et al.*, 2009).

Os genes Mx são ISGs que codificam proteínas que inibem a replicação de diferentes de vírus. Estas proteínas estão envolvidas no tráfico de vesículas através de sua associação com o citoesqueleto e o retículo endoplasmático. Logo, essa interação leva a atividade antiviral por complexação com nucleocapsídeos virais que são aprisionados em locais celulares para o isolamento ou a degradação, prevenindo a replicação viral (NETHERTON *et al.*, 2009; SEN, 2001; STEVENSON *et al.*, 2011).

Em células estimuladas com IFNs tipo I ou III, PKR é predominantemente encontrado no citoplasma e associado a ribossomos.

PKR é uma serina/treonina quinase que é ativada por autofosforilação mediada por dsRNA viral e assim, catalisa a fosforilação intermolecular do fator de iniciação eucariótico 2 (eIF2 α), um co-fator no processo de tradução, necessário para o recrutamento de RNA transportador para os ribossomos para formar o complexo traducional. Sua fosforilação por PKR permite que ele se ligue de forma irreversível ao eIF2 β , que normalmente atua liberando eIF2 α do complexo para que este possa participar da tradução de outros RNAs. Como a atividade de eIF2 β é inibida pela fosforilação e ligação de eIF2 α , este fica preso ao complexo e impedido de iniciar futuros eventos de tradução. Isto evita que a tradução de proteínas celulares e virais ocorra, alterando o padrão de tradução da célula hospedeira e prejudicando a replicação viral (*revisado por* BORDEN *et al.*, 2007; SHORT, 2009).

Os genes da família 2'5' oligoadenilato sintetase (2'5'OAS) e endorribonuclease latente (RNase L) são induzidos em resposta a IFNs e conduzem à degradação de RNAs. RNase L estimula a degradação de mRNAs virais e celulares para prevenir a síntese de proteínas virais. RNase L é ativado por uma interação com oligômeros de adenosina, que são ligados por uma ligação fosfodiéster em uma configuração 2'5' e que é ativada por dsRNA (*revisado por* BONJARDIM, FERREIRA e KROON, 2009 ; SHORT, 2009).

1.4.3 Estratégias de imunoevasão

Os vírus são dependentes da maquinaria celular para sua multiplicação, portanto, necessitam de mecanismos de escape, de obstrução ou subversão de elementos que medeiam a resposta antiviral do hospedeiro, para que a infecção viral seja eficiente (*revisado por* DAMON, 2013). Assim sendo, vírus com grande capacidade codificadora, como os poxvírus, possuem genes que codificam várias proteínas imunomodulatórias que atuam bloqueando ou amenizando a ação de citocinas e mecanismos do sistema imune inato. Um dos fatores demonstra a importância de proteínas imunomoduladoras é que cerca de um terço do genoma dos VACV codifica essas proteínas. Proteínas relacionadas a imuno evasão são expressas precocemente durante a infecção, sendo que a mesma proteína pode apresentar diferentes funções além de ter a capacidade de atuar na mesma via de transdução de sinal, porém com funções não redundantes, já que, a

deleção de uma delas pode resultar em um fenótipo viral distinto. Deste modo, as estratégias de imuno evasão dos poxvírus são importantes fatores de virulência que contribuem significativamente para a manutenção de infecções virais (*revisado por* BAHAR *et al.*, 2011; SMITH *et al.*, 2013).

As proteínas imunomodulatórias dos poxvírus podem ser divididas em três classes principais: proteínas de viromimetismo (virocinas e viroreceptores), proteínas de virocamuflagem e virotransdutores (*revisado por* HAGA e BOWIE, 2005). As virocinas são secretadas pelas células infectadas e são semelhantes às citocinas do hospedeiro (DAY *et al.*, 2008). Os viroreceptores são receptores celulares alterados que perderam seus domínios transmembrana e conseqüentemente são secretados pelas células infectadas para seqüestrar seus ligantes (DAY *et al.*, 2008). As proteínas de virocamuflagem subvertem as vias de apresentação de antígenos não-próprios das células infectadas fazendo com que estas células não sejam reconhecidas pelo sistema imune (JOHNSON e MCFADDEN, 2003; JOHNSON e MCFADDEN, 2004). Os virotransdutores são proteínas intracelulares que interferem com as vias sinalizadoras ou efetoras da resposta antiviral (DAY *et al.*, 2008).

1.5 Opções de tratamento contra os OPVs

Atualmente, as drogas mais promissoras para utilização no tratamento de infecções causadas pelos OPVs são Cidofovir (CDV)(e seu análogo CMX001); Tecovirimat (ST-246) e Imiquimod.

O CDV [(S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil) citosina, HPMPC], teve suas propriedades antivirais designadas e mencionadas pela primeira vez no ano de 1986. Esta droga apresenta um amplo espectro de ação contra vários vírus com genoma de DNA (*revisado por* DE CLERCQ, 2010) e atua inibindo seletivamente DNA polimerase viral (DE CLERCQ, 2002). O CDV é a única droga atualmente licenciada para o tratamento das infecções por OPV (PARKER *et al.*, 2008) e mostrou eficiência nos estudos realizados *in vitro* e *in vivo* tanto em tratamentos profiláticos quanto terapêuticos em camundongos infectados com VACV e CPXV (QUENELLE *et al.*, 2004, SMEE *et al.*, 2004; NEYTS *et al.*, 2004; *revisado por* DE CLERCQ, 2010).

A biodisponibilidade oral do CDV é a maior limitação para a utilização desta droga em larga escala ou em situações emergenciais, como um surto causado por OPVs. Alguns efeitos colaterais também são notados, como o aumento dos níveis séricos de creatinina e a possibilidade de desenvolvimento de lesões renais (DE CLERCQ, 2002). Além disso, a geração de amostras virais resistentes ao CDV com DNA polimerases mutantes é um agravante (GAMMON *et al.*, 2008). O CMX001 é uma substância análoga ao CDV que possui boa biodisponibilidade oral e apresenta menor nefrotoxicidade, apresentando porém menor efetividade (SLIVA e SCHNIERLE, 2007; LANIER *et al.*, 2010).

O composto Tecovirimat (anteriormente conhecida como ST-246) é uma pequena molécula que foi descoberta por meio de triagem de alto rendimento de uma biblioteca de compostos químicos. Tecovirimat é específica contra os OPVs incluindo VACV, CPXV, MPXV, ECTV e VARV, não existindo atualmente nenhuma evidência de que essa droga possa ser utilizada no tratamento de infecções causadas por outras famílias virais. O mecanismo de ação desta droga é distinto do CDV, e o Tecovirimat por sua vez já se mostrou efetivo contra amostras virais resistentes ao CDV. O alvo do Tecovirimat é uma proteína altamente conservada entre os poxvírus, com nenhum homólogo conhecido em mamíferos, chamada p37. O papel desta proteína no ciclo dos OPVs é mediar, juntamente com outras proteínas virais e celulares a formação dos vírus envelopados comprometendo a liberação das partículas virais das células infectadas e a disseminação das progênes virais no hospedeiro. Já foi demonstrado que vírus mutantes para produção de EEVs são avirulentos *in vivo* (GROSENBACH, *et al.*, 2010, *revisado por* KROON *et al.*, 2011).

Tecovirimat já se mostrou eficiente *in vitro* contra vários OPVs e previne a morbidade e letalidade em infecções por OPVs em camundongos imunocompetentes (BERHANU, 2009), imunosuprimidos (GROSENBACH *et al.*, 2010), esquilos (SBRANA *et al.*, 2007), cachorros (SMITH *et al.*, 2011) coelhos (AMANTANA *et al.*, 2013) e primatas não humanos (MUCKER *et al.*, 2013). Atualmente esta droga está sendo submetida a estudos de fase clínica conduzidos pelo Food and Drug Administration (FDA). Porém, amostras de VACV resistentes ao Tecovirimat já foram descritas (YANG *et al.*, 2005, *revisado por* KROON *et al.*, 2011).

Outra opção terapêutica contra infecções por OPVs é o Imiquimod, cujo nome comercial é Aldara™. O Imiquimod é um composto que pertence a família das imidazoquinolinas e induz a expressão de citocinas por ser um agonista de receptores do tipo Toll 7 (TLR7) por uma via dependente da proteína MyD88 (HEMMI *et al.*, 2002), induzindo principalmente a expressão de IFN α , IFN β , IL-6, IL-12, TNF α em estudos *in vivo* (*revisado por* KROON *et al.*, 2011). A formulação contendo 1% de Imiquimod em creme foi eficaz no tratamento de lesões cutâneas geradas por infecção com VACV em camundongos imunossuprimidos. Entretanto a formulação só se mostrou eficaz até a concentração de 5%, uma vez que acima dessa concentração há redução da atividade (TARBET *et al.*, 2011).

Capítulo II: A complexa interação entre os microrganismos colonizadores do trato gastrointestinal com os seus hospedeiros: como modular esse sistema ao nosso favor?

1. A microbiota gastrointestinal: instalação, composição e função

O ser humano inicia a vida desprovido de colonização microbiana devido ao ambiente estéril do útero. Esta existência livre de germes possui curta duração, uma vez que o nascimento expõe o recém-nascido a microbiota da mãe, iniciando o processo de colonização dos tecidos do aparelho digestivo, respiratório e urogenital, e da pele. A microbiota que se instala após o nascimento é bastante diversificada, e passa a coexistir com seu hospedeiro durante toda a sua vida. A interação complexa e dinâmica entre a microbiota e o ser humano se deve a milhões de anos de co-evolução. De forma recíproca a diversidade microbiana modula o sistema imune do hospedeiro, permitindo que a microbiota nos seres humanos seja, na grande maioria das vezes, controlada e bem tolerada (*revisado por* MAYNARD *et al.*, 2012).

O trato gastrointestinal dos mamíferos abriga a microbiota mais diversa e abundante do hospedeiro. A microbiota intestinal é composta por bactérias, archeas, vírus e pequenos eucariotos. Estima-se que cerca de 100 trilhões de microrganismos compõem a microbiota intestinal, sendo que o íleo e o cólon são as regiões mais densamente habitadas (WHITMAN, *et al.*, 1998). O número de células presentes na microbiota é cerca de dez vezes maior que o

número total de células no corpo humano. O microbioma intestinal apresenta mais de cem vezes o número de genes do genoma humano, sendo que cada indivíduo é preenchido por cerca de 15% das mais de 1000 espécies de bactérias intestinais que foram descritas, o que reflete a substancial variabilidade na composição da microbiota entre indivíduos (QIN, *et al.*, 2010).

A microbiota intestinal é responsável por várias funções, tais como: (i) resistência à colonização (inibem à multiplicação de patógenos alóctones e autóctones oportunistas);(ii) imunomodulação (permite uma resposta imune mais rápida e adequada durante uma agressão infecciosa, além de ser peça chave no desenvolvimento do sistema imune adaptativo); (iv) nutricional (atuam no fornecimento de vitaminas e substratos energéticos como ácidos butírico, propiônico e acético); (v) e desenvolvimento da mucosa intestinal [garantem o adequado desenvolvimento do epitélio intestinal e do GALT (do inglês, gut-associated lymphoid tissue)] bem como sua vascularização (BERG, 1996; MOREAU & GABORIAU-ROUTHIAU, 2000; NICOLI & VIEIRA, 2004; EGERT *et al.*, 2006; WALL *et al.*, 2009; STECHER & HARDT, 2011).

Em troca, membros dessa microbiota encontram um nicho protegido e rico em nutrientes, no qual podem se multiplicar e atingir elevadas densidades populacionais (HOOPER *et al.*, 2002). Portanto, perturbações dessa relação pode resultar em condições patológicas (ISOLAURI *et al.*, 2001; GUARNER & MALAGELADA, 2003).

Enquanto em recém-nascidos humanos as bifidobactérias são os organismos dominantes (MITSUOKA, 1992) em outros animais como camundongos, suínos e galinha, os lactobacilos são predominantes (SCHAEDLER *et al.*, 1965; BARROW, 1992; MOUGHAN *et al.*, 1992). Modificações na composição da microbiota induzida por alterações na dieta, tratamento com antibióticos ou por agentes patogênicos, pode perturbar o equilíbrio da microbiota intestinal favorecendo o crescimento dos componentes potencialmente patogênicos. Essas alterações na microbiota, referidas como disbioses, podem perturbar o equilíbrio estabelecido com o sistema imunológico que normalmente restringem a inflamação intestinal (THAISS *et al.*, 2014).

A manutenção de um equilíbrio apropriado da microbiota pode ser assegurada por uma suplementação sistemática da dieta com microrganismos probióticos. De forma empírica a humanidade já havia

descoberto este efeito benéfico há séculos. Porém, até o momento, alguns aspectos com relação ao mecanismo de ação que estes microrganismos exercem sobre o hospedeiro ainda permanecem desconhecidos (*revisado por* VASILJEVIC & SHAH, 2008).

2. O Histórico dos microrganismos probióticos

A história dos probióticos é conhecida há centenas de anos, desde a versão Persa do Velho Testamento (Gênesis 18:8) que relata que “Abrão atribuiu a longevidade ao consumo de leite azedo” (MARTINS *et al.*, 2009). O pesquisador Escherich em 1885 foi o primeiro a reconhecer a importância do estudo das bactérias presentes nas fezes e no trato intestinal de indivíduos saudáveis, e, desta forma auxiliou na compreensão da fisiologia da digestão, bem como na patologia e terapia de doenças intestinais de origem microbiana (*revisado por* VASILJEVIC & SHAH, 2008).

No ano de 1905, Ilya Metchnikoff notou que camponeses búlgaros possuíam expectativa de vida média de 87 anos, o que era considerado excepcional para o início de 1900. Além disso, percebeu também que quatro em cada mil indivíduos vivia mais de 100 anos de idade. Uma das principais diferenças observada no estilo de vida destes indivíduos em comparação com a dieta contemporânea foi um grande consumo de leite fermentado. Metchnikoff sugeriu em sua teoria de autointoxicação, que o corpo humano é lentamente envenenado por toxinas produzidas por agentes patogênicos no intestino e o corpo é progressivamente enfraquecido pela proliferação destes patógenos entéricos e este processo é combatido de forma eficaz com o consumo de leite fermentado e de bactérias produtoras de ácido láctico. (*revisado por* VASILJEVIC & SHAH, 2008).

A partir disso, os cientistas começaram a estudar os possíveis efeitos benéficos que as bactérias poderiam proporcionar à saúde humana. A palavra probiótico, que significa “promotor da vida” foi criada por Lilley e Stillwell (1965) como um antônimo da palavra antibiótico. No ano de 1989, Fuller definiu os probióticos como, “um suplemento microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro graças à melhoria no balanço microbiano intestinal”. Entretanto, estudos atuais já demonstraram que os probióticos podem gerar benefícios que vão além do trato gastrointestinal (ZUCCOTTI *et*

al., 2008; KHANI *et al.*, 2012). Com o passar dos anos, a definição de probióticos foi redefinida, de acordo com a OMS e a Organização de Alimentos e Agricultura (FAO) como, “microrganismos vivos que quando ingeridos em quantidade suficiente conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002; LEW & LIONG, 2013).

Para que uma espécie seja considerada um probiótico ela deve cumprir os seguintes requisitos: não ser patogênica; ter a possibilidade de ser integrado em alimentos funcionais em altas concentrações; apresentar resistência ao ambiente ácido do estômago e sais biliares; ser um antagonista das bactérias patogênicas do trato gastrointestinal; oferecer benefícios à saúde (HERBEL *et al.*, 2014). As principais espécies de microrganismos probióticos pertencem aos gêneros bacterianos: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Bifidobacterium*, sendo que dentre estes, os lactobacilos e as bifidobactérias são os mais estudados (NARAYAN *et al.*, 2010). Espécies de leveduras, como a *Saccharomyces boulardii* e algumas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* também são bastante empregadas como probióticos (MARTINS *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2011).

3. Benefícios dos probióticos à saúde humana

Os benefícios dos probióticos atribuídos à saúde humana mais estudados estão relacionados com distúrbios no trato gastrointestinal. Várias pesquisas já demonstraram o papel que os probióticos possuem na redução da duração e do risco de desenvolvimento de diarreias associadas ao uso de antibióticos e diarreias agudas infecciosas (SAZAWAL *et al.*, 2006; KLIGLER & COHRSEN, 2008). Além disso, podem atuar também reduzindo os sintomas da síndrome do intestino irritável. As principais espécies descritas nestes estudos são *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *S. boulardii*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* e *B. infantis* (SAZAWAL *et al.*, 2006; KLIGLER & COHRSEN, 2008; MCFARLAND & DUBLIN, 2008; RITCHIE & ROMANUK, 2012).

Na maior parte das vezes, são atribuídos aos probióticos vários mecanismos de ação, que simultaneamente, geram as ações benéficas. Esse

fenômeno ocorre, por exemplo, na prevenção e tratamento de infecções gastrointestinais. Acredita-se que uma combinação entre o mecanismo de competição direta com bactérias patogênicas no intestino juntamente com a modulação imune sejam responsáveis pelos efeitos dos probióticos diante dos distúrbios gastrointestinais (KLIGLER & COHRSSSEN, 2008).

Os benefícios dos probióticos são bastante diversos e não se restringem ao trato gastrointestinal (LEW & LIONG, 2013). Além de sua capacidade de influenciar positivamente a composição da microbiota intestinal, várias evidências sugerem que alguns probióticos podem modular o sistema imune, tanto localmente, quanto sistemicamente melhorando os mecanismos de defesa imune e/ou diminuindo distúrbios imunes, como alergias ou inflamações (GUÉNICHE *et al.*, 2010). Resultados de vários testes clínicos e pré-clínicos já revelaram a habilidade que várias linhagens de probióticos possuem de diminuir os sintomas e agir como profilático contra dermatite atópica, atuando principalmente através da redução de citocinas pró-inflamatórias. Dentre os gêneros que apresentaram esta atividade, destacam-se: *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (KLIGLER & COHRSSSEN, 2008; YESILOVA *et al.*, 2012).

4. O Gênero *Lactobacillus*

As espécies do gênero *Lactobacillus* pertencem ao filo *Firmicutes*, sendo estas Gram positivas, ácido tolerantes, anaeróbicas facultativas e fermentadoras. Os lactobacilos são comumente encontrados em alimentos como vinho, leite, carne, frutas, vegetais, e cereais integrais. Além disso, algumas espécies deste gênero compõem a microbiota normal do trato gastrointestinal, vaginal e cavidade oral de humanos e de diversas espécies de animais. Os lactobacilos têm sido utilizados por milhares de anos na conservação de alimentos através da fermentação (HERBER *et al.*, 2014).

O gênero *Lactobacillus*, é bastante diverso e engloba espécies encontradas principalmente em produtos lácteos (por exemplo, *L. delbrueckii* *ssp. bulgaricus* e *L. helveticus*), espécies comumente encontradas em trato

gastrointestinal humano e animal (por exemplo, *L. acidophilus* e *L. gasseri*), e espécies com notável capacidade de adaptação a diversos habitats (por exemplo, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. brevis* e *L. paracasei*). *L. paracasei* é um membro da microbiota intestinal humana e animal e é amplamente utilizado na indústria alimentar em culturas para produtos lácteos e também como bactérias com características probióticas (SMOKIVINA *et al.*, 2013).

4.1. A atividade antiviral dos Lactobacilos

O uso de probióticos tem sido proposto como uma nova abordagem terapêutica para o controle de diversas doenças virais (MURGUÍA-PENICHE, 2013). A indicação do uso de probióticos, principalmente dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* em casos de infecções virais é fundamentada por alguns estudos que demonstraram que os probióticos são capazes de prevenir, diminuir os sintomas e a duração de infecções virais, na maior parte das vezes, por meio de processos imunomoduladores (MARAGKOUidakis *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2013; KISO *et al.*, 2013, KUMPU *et al.*, 2013).

O gênero *Lactobacillus* apresenta várias espécies com grande potencial no controle de infecções virais. Lee e colaboradores (2013) publicaram um estudo mostrando que a administração sublingual de 1×10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) de *L. rhamnosus* em camundongos, foi capaz de aumentar a proteção destes animais contra a infecção com *Influenza A virus*, por meio do aumento da secreção de Imunoglobulinas A (IgA) nas mucosas, estímulo das células NK e linfócitos T, além do aumento da produção de IL-12 nos pulmões (LEE *et al.*, 2013a).

Em 2013, outros dois estudos descreveram a atividade protetiva de *L. pentosus* e *L. plantarum* contra *Influenza A virus* (KISO *et al.*, 2013; PARK *et al.*, 2013). A administração de 10^9 UFC de *L. plantarum*, via intranasal, foi capaz de causar um aumento na produção IL-12 e IFN- γ no fluido bronquioalveolar e diminuiu a inflamação durante a infecção com *Influenza A virus* em camundongos (PARK *et al.*, 2013). O efeito gerado pela ingestão diária de *L. rhamnosus* também foi testada contra rinovírus. Foi relatado que este tratamento diminuiu a ocorrência de infecções por este vírus em humanos (LUOTO *et al.*, 2013; LEHTORANTA, 2014). Em alguns casos, o efeito antiviral apresentado pelos probióticos pode ser atribuído a mais de uma espécie de microrganismo ou à utilização de uma combinação de

diferentes espécies. No ano de 2007, Ivec e colaboradores publicaram um trabalho mostrando um aumento da resposta antiviral *in vitro* contra o *Vesicular stomatitis virus* (VSV) gerado pelas espécies *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *B. longum*. Estas espécies foram capazes de induzir mecanismos de defesa em macrófagos contra a infecção por VSV, por meio da produção de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IFN- γ . A colonização com *L. rhamnosus* e *B. lactis* contribui para, homeostase imunológica, maturação das células do sistema imune e diminuição da diarreia causada por rotavírus humano, em porcos (VLASOVA *et al.*, 2013).

4.2 O potencial imunomodulador da espécie *L. paracasei* CNCM I-2116 (ST11)

Um dos primeiros estudos que investigou o potencial imunomodulador da espécie *L. paracasei*, linhagem ST11 foi realizado por Von der Weid em 2001, no qual foi avaliada a indução de linfócitos T CD4 *naives* de camundongos BALB/c estimulados por células alogênicas e tratadas com esta linhagem bacteriana. Os resultados deste estudo mostraram que, neste modelo, o probiótico inibiu fortemente a produção das citocinas mediadoras tanto da resposta inflamatória do tipo Th2 (IL-4 e IL-5), quanto do tipo Th1 (IFN γ). Porém, induziu a produção de TGF β de maneira dose dependente e manteve a produção de IL-10, sendo essas, citocinas que exercem importante papel na contenção da resposta inflamatória.

Outro estudo também corroborou o potencial de contenção da resposta inflamatória gerada por esta linhagem. Neste caso a linhagem ST11 foi capaz de aliviar os sintomas da doença inflamatória intestinal em camundongos. O tratamento com ST11 diminuiu a infiltração de neutrófilos, e a expressão de citocinas pró inflamatórias como IL1 β , IL-6 e IL12 (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A indústria L'oreal® em parceria com a Nestlé® comercializa um produto probiótico chamado Innéov Sensicap®, composto por *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116 (ST11), que é indicado para melhora da imunidade do organismo e do aspecto da pele e dos cabelos. Um estudo publicado por pesquisadores destas indústrias relatou que este microrganismo, na dose de 1×10^7 UFC/mL, inibiu os sintomas da inflamação cutânea em um ensaio *ex vivo* utilizando amostras de pele humana (GUENICHE *et al.*, 2010).

II. JUSTIFICATIVA

O VACV foi utilizado como vacina durante a campanha de erradicação da varíola, que foi declarada erradicada pela OMS, em 1980. Após sua erradicação, a vacinação foi suspensa principalmente devido aos seus efeitos adversos graves o que propiciou a emergência de surtos zoonóticos causados por estes vírus em todo o mundo. O VACV tem sido associado a surtos de VB no Brasil, levando a uma doença exantemática que afeta principalmente ordenhadores e o gado leiteiro no Brasil.

A diminuição da produção leiteira e o afastamento do paciente infectado do trabalho resulta em impactos na saúde pública e veterinária, além de econômicos e sociais. Apesar dos impactos gerados pelos surtos de VB no Brasil, bem como dos efeitos adversos graves que são gerados pela vacinação, atualmente existem poucas opções terapêuticas disponíveis para o tratamento das infecções geradas pelos OPVs.

Nos últimos anos, a utilização de microrganismos probióticos tem sido proposta como uma possível nova abordagem terapêutica para diversas doenças virais. Entre as espécies de microrganismos probióticos estudadas, destacam-se as espécies do gênero *Lactobacillus*. O probiótico Innéov Sensicap® demonstrou inibir sintomas de inflamação cutânea, como a vasodilatação, edema, degranulação de mastócitos e produção da citocina pró-inflamatória TNF- α . Além disso, outros estudos corroboram as propriedades anti-inflamatórias apresentadas por esse probiótico.

Considerando que muitos sintomas gerados durante a infecção com VACV são decorrentes de uma resposta inflamatória sistêmica e do completo desconhecimento de como os probióticos podem interagir com os OPVs, este estudo visou contribuir de forma inédita, no entendimento da influência que o *L. paracasei* é capaz de exercer durante uma infecção com VACV. O entendimento dessas relações podem, no futuro auxiliar na prospecção de novas opções terapêuticas contra as infecções geradas pelos OPVs.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a influência do tratamento com o probiótico *L. paracasei* (ST11) na infecção por *Vaccinia virus* em modelo murino.

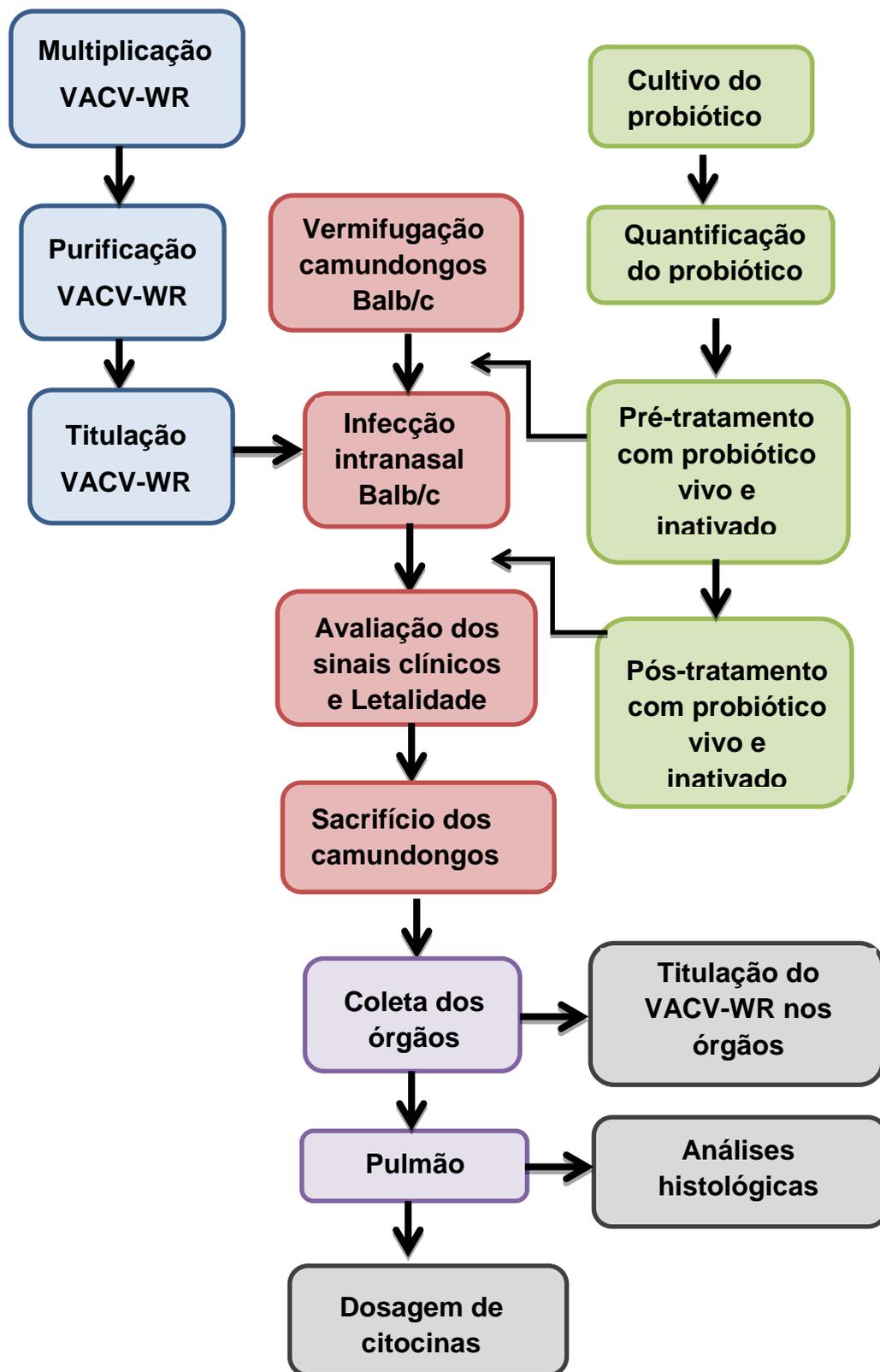
3.2. Objetivos específicos

- Avaliar as manifestações clínicas apresentadas pelos camundongos infectados com VACV-WR, comparando o grupo tratado e não tratado com o probiótico;

Analisar a influência do tratamento com probiótico na taxa de letalidade geranda durante infecção pelo VACV;

- Avaliar a influencia do tratamento com o probiótico na disseminação viral.
- Realizar análises histológicas dos pulmões dos camundongos dos grupos tratados e não tratados com o probiótico, infectados e não infectados com VACV.
- Quantificar as citocinas, TNF alfa, IL-10, IL-17, IFN gama, alfa e beta, bem como os ISGs, OAS, PKR e Mx1 dos grupos tratados e não tratados com o probiótico, infectados e não infectados com VACV.

IV. FLUXOGRAMA DE TRABALHO



V. METODOLOGIA

5.1. Sistemas celulares

5.1.1. Células VERO e BSC40

As células Vero e BSC foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC), (Maryland, EUA) e são derivadas de células epiteliais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). O cultivo dessas células foi realizado para multiplicação e titulação viral, quando as mesmas apresentaram cerca de 90 % de confluência da monocamada. Para isso, células Vero e BSC foram cultivadas com meio mínimo essencial de Eagle (MEM) (Gibco, USA) acrescido de glutamina (2mM), gentamicina (50 µg/mL), penicilina potássica (200 U/mL), anfotericina B (2,5 µg/mL) e 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil), e posteriormente incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Os subcultivos ou repiques foram realizados a cada 2 dias por lavagem da monocamada celular com solução tampão fosfato salina 1X (PBS 1X) (NaCl 137mM; KCl₂ 7mM; Na₂HPO₄ 1,4mM; pH 7,2) e tratamento com tripsina acrescida de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (NaCl 136mM; kCl 5mM; glicose 55mM; NaHCO₃ 69mM; 0,5g p/v tripsina 1:250 [Difco]; EDTA 0,5mM; 1% vermelho de fenol).

5.2. Vírus

Foi utilizada a amostra VACV-WR, originada de uma amostra do New York City Department of Health Laboratory (NYCBH), em 1876 (FENNER *et al.*, 1988) gentilmente cedida pelo Dr. C. Jungwirth, Universität Würzburg, Alemanha.

5.3. Multiplicação viral em células Vero

Para obtenção dos estoques virais foi feita a multiplicação em células Vero, cultivadas em garrafas de 150 cm² (TPP®), em estufa a 37°C com aporte de 5% de CO₂. Monocamadas de células Vero com cerca de 90% de confluência foram lavadas duas vezes com PBS e infectadas com multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01, diluído em 5 mL de MEM sem

adição de SFB. Após 1 hora de adsorção, a 37°C, foi acrescentado 25 mL de MEM suplementado com 1% SFB. Novamente, as células foram incubadas a 37°C e monitoradas diariamente ao microscópio óptico até a detecção de 90% de efeito citopático (ECP). Em seguida, o meio de cultivo foi desprezado, as células foram lavadas com PBS e desprezadas das garrafas com auxílio de um raspador e utilizando Tris-HCl 10mM, pH 8,0. A suspensão obtida foi centrifugada durante 10 minutos a 264g (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B) a 4°C e o sedimento obtido foi mantido a – 70°C para posterior purificação das partículas virais.

5.4. Purificação viral

O sedimento obtido durante a multiplicação viral (item 5.3) foi homogeneizado em 8 mL de Tris-HCl 10mM, pH 8,0 e centrifugado a 2.500 x g (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B) durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi mantido em banho de gelo e o sedimento celular foi lisado duas vezes em 10 mL de solução de lise (MgCl₂ 1mM; Tris10mM, pH 7,0; KCl 10mM). Após a adição desta solução, a suspensão foi incubada em banho de gelo, durante 10 minutos e as células lisadas mecanicamente em homogeneizador do tipo “Douncer” (Wheaton, USA) por 80 vezes. A suspensão viral resultante foi então centrifugada a 35.000 g, 4°C, por duas horas sobre um colchão de sacarose a 36% em Tris-HCl 10mM, pH 8,0 para separação dos restos celulares. Utilizando-se uma pipeta Pasteur, o sobrenadante e a interface foram coletados e desprezados e o restante foi descartado por inversão do tubo. Os sedimentos obtidos foram homogeneizados em até 500µL de Tris 10mM (pH 8,0), distribuídos em alíquotas de 2 µL em microtubos e estocados a – 70°C (Adaptado de JOKLIK,1962).

5.5. Titulação viral (CAMPOS & KROON, 1993)

A titulação foi realizada utilizando placas de seis poços com monocamada de células BSC-40 com aproximadamente 80-90% de confluência por poço incubadas a 37°C por 16-24 horas em MEM suplementado com 5% SFB (Cultilab, Brasil). O meio das placas foi desprezado e a monocamada lavada com PBS 1X. O vírus foi diluído na proporção de 1: 10 de forma seriada, para concentrações de 10⁻¹ a 10⁻⁹ em

MEM 0% e adicionado em cinco poços da placa, sendo que um poço foi utilizado como controle da viabilidade celular, onde apenas meio foi adicionado. As células foram incubadas a 37°C durante uma hora com homogeneização a cada dez minutos para a adsorção e posteriormente adicionado 2 mL de MEM contendo 1% de SFB (CAMPOS e KROON, 1993). As placas foram incubadas a 37°C, e após 48 horas fixadas com solução de paraformaldeído 3,7% e coradas com solução de cristal violeta 1%. Para cálculo do título viral, as placas de lise foram contadas na diluição que apresentou entre 30 e 100 placas de lise, multiplicada pelo inverso da diluição e convertido para o volume de 1 mL.

5.6. Cultivo do probiótico

O probiótico utilizado nesse estudo foi *L. paracasei* CNCM I-2116 (ST11) (LP T11) (GUÉNICHE *et al.*, 2010b) isolado do produto probiótico Innéov® Sensicap comercializado no Brasil pelas empresas L'oreal® e Nestlé®, gentilmente cedido pelo Professor Dr. Flaviano Martins . O conteúdo da cápsula deste produto foi transferido para um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo De Man, Rogosa & Sharpe (MRS, Difco, Sparks, EUA). Este tubo foi incubado a 37°C, durante 48 horas, em ambiente aeróbico para reativação do *L. paracasei*. Após a reativação, 100µL deste caldo contendo *L. paracasei* foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo MRS e incubado a 37°C, durante 24 horas, em ambiente aeróbico. Este processo foi repetido diariamente para manutenção da cultura, durante todo o experimento.

5.7. Inativação do probiótico

Para inativação do probiótico foi primeiramente realizada a centrifugação da cultura bacteriana em meio MRS obtida pelo procedimento descrito no item 5.6, a 264g por 5 minutos (Eppendorf®, 5430R, São Paulo, Brasil). Posteriormente o sobrenadante obtido foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 10mL de PBS 0,9%. Esta suspensão bacteriana possui uma concentração bacteriana equivalente a 10^9 UFC/mL e foi aliquoteada em 10 microtubos de 1,5mL (Eppendorf®). Os microtubos foram incubados a 75 °

C durante 20 min em termobloco (Eppendorf® Thermomixer confort). Uma das alíquotas foi transferida para caldo MRS (Himedia®), e esta cultura foi incubada a 37°C por 12 horas para certificação de que o probiótico foi inativado, perdendo assim sua capacidade multiplicação.

5.8. Quantificação do probiótico

A concentração de *L. paracasei* administrada nos camundongos foi quantificada pelo método spread-plate (BUCK & CLEVERDON, 1960), que consiste em sucessivas diluições da amostra com posterior plaqueamento e contagem das colônias crescidas após incubação. A amostra foi diluída na proporção de 1: 10 de forma seriada, para concentrações de 10^{-1} a 10^{-9} . Uma alíquota de 100µL de cada diluição foi inoculada em placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar MRS (Himedia®) e as placas foram incubadas a 37°C, durante 48 horas em ambiente aeróbico. Após a incubação, a contagem foi realizada na placa que apresentou entre 20 e 200 UFC. A quantificação do probiótico foi feita multiplicando o número de colônias contadas na placa, pelo fator de diluição da amostra e pelo inverso da diluição. Este ensaio foi realizado em triplicata.

5.9. Animais

Camundongos Balb/c machos com quatro semanas de idade foram utilizados como modelo animal, sendo adquiridos no Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG). Durante a realização dos experimentos os camundongos foram mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia da UFMG, em gaiolas com microisoladores e fluxo de ar individualizado. Para a vermifugação dos camundongos foi utilizado Albendazol 10% (Tortuga) na diluição 1:100 em H₂O, sendo a mamadeira contendo o vermífugo disponibilizada para os animais por 24 horas. Este procedimento foi repetido após três dias e os experimentos iniciaram dez dias após a vermifugação. Os experimentos foram previamente submetidos e aprovados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, protocolo n° 240/2010.

5.10. Desenho experimental

Os animais foram divididos em oito grupos de tratamento, contendo 5 animais em cada grupo (FIGURA 8):

Grupo PBS/não infectado: animais que receberam por gavagem diariamente 100 µL de PBS 0,9%, durante todo o experimento. Este grupo não foi infectado e receberam 10µL de PBS 0,9% por via intranasal.

Grupo Probiótico vivo/não infectado: animais que receberam por gavagem diariamente 100 µL de solução de *L. paracasei* vivo contendo 10^8 UFC do probiótico, durante todo o experimento. Este grupo não foi infectado e receberam 10µL de PBS 0,9% por via intranasal.

Grupo Probiótico morto/não infectado: animais que receberam por gavagem diariamente 100 µL de solução de *L. paracasei* morto contendo 10^8 UFC do probiótico, durante todo o experimento. Este grupo não foi infectado e receberam 10µL de PBS 0,9% por via intranasal.

Grupo VACV/infectado: animais que receberam por gavagem diariamente apenas 100 µL de PBS 0,9%, durante todo o experimento. A infecção foi feita administrando 10^6 PFU/10µL de VACV por via intranasal.

Grupo Pré-tratado morto/infectado: animais que receberam por gavagem diariamente 100 µL de solução de *L. paracasei* morto contendo 10^8 UFC do probiótico, durante todo o experimento. A infecção foi feita administrando 10^6 PFU/10µL de VACV por via intranasal.

Grupo Pré-tratado vivo/infectado: animais que receberam por gavagem diariamente 100 µL de solução de *L. paracasei* vivo contendo 10^8 UFC do probiótico, durante todo o experimento. A infecção foi feita administrando 10^6 PFU/10µL de VACV por via intranasal.

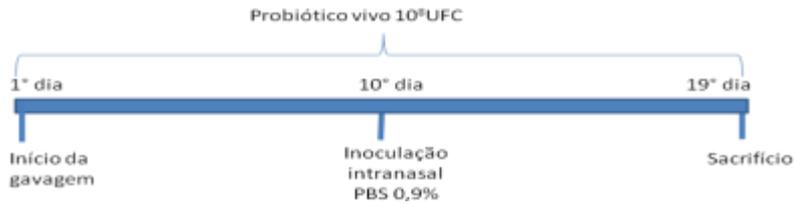
Grupo Pós-tratado vivo/infectado: animais que receberam por gavagem diariamente 100 µL de PBS 0,9% 10 dias antes da infecção e 100 µL de solução de *L. paracasei* vivo contendo 10^8 UFC do probiótico, por nove dias após a infecção. A infecção foi feita administrando 10^6 PFU/10µL de VACV por via intranasal.

Grupo Pós-tratado morto/infectado: animais que receberam por gavagem diariamente 100 µL de PBS 0,9% por dez dias antes da infecção e 100 µL de solução de *L. paracasei* morto contendo 10^8 UFC do probiótico, por nove dias após a infecção. A infecção foi feita administrando 10^6 PFU/10µL de VACV por via intranasal.

Grupo PBS/ não infectado



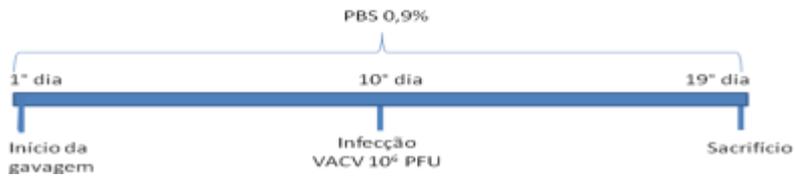
Grupo Probiótico vivo/ não infectado



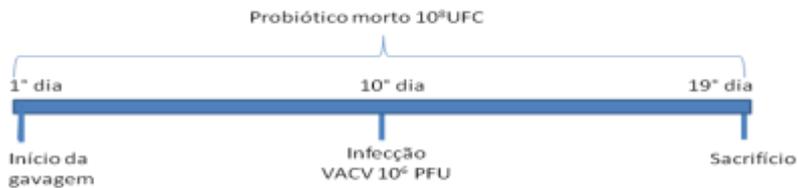
Grupo Probiótico morto/ não infectado



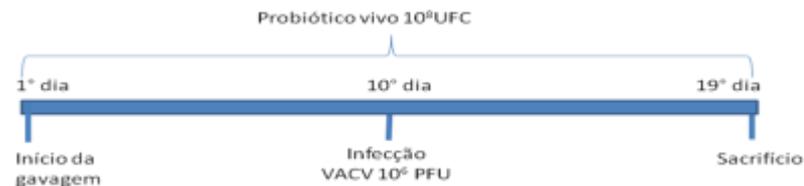
Grupo VACV/ infectado



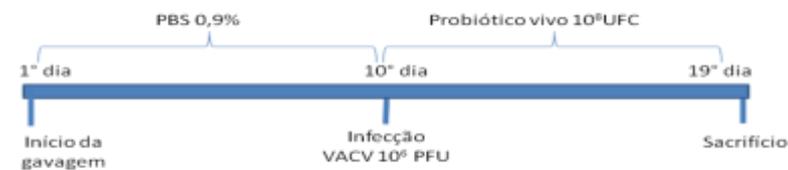
Grupo Pré-tratado morto/ infectado



Grupo Pré-tratado vivo/ infectado



Grupo Pós-tratado vivo/ infectado



Grupo Pós-tratado morto/ infectado

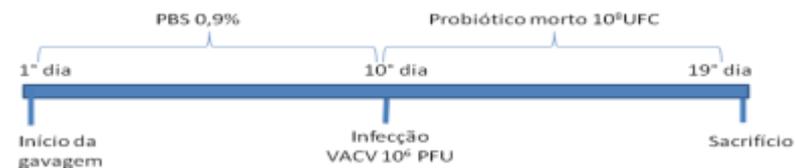


FIGURA 8: Desenho Experimental: Representação esquemática do modelo de infecção dos camundongos divididos em oito grupos de tratamento.

O período de tratamento, assim como a dose de probiótico administrada diariamente foram escolhidos baseados em outros estudos que avaliaram a influência da utilização de probióticos contra o *Influenza A virus* que, assim como o VACV por via intranasal, gera uma doença aguda de curta duração. Estes estudos também utilizaram uma dose diária de 10^8 UFC durante cerca de dez dias tratamento antes e após a infecção (LEE *et al*, 2013; PARK *et al*, 2013). A dose viral utilizada também foi determinada baseada em um estudo prévio que também utilizou 10^6 pfu da amostra VACV-WR para infectar camundongos Balb/C (Ferreira *et al.*, 2008).

5.11. Infecção dos animais

Cinco camundongos em cada grupo foram anestesiados utilizando injeção intraperitoneal de Ketamina e Xilasina (3.2 mg e 0.16 mg/animal, em tampão fosfato salina (PBS) 0,9%, respectivamente) e inoculados por via intranasal com um volume de 10 μ L, contendo 10^6 pfu da amostra viral purificada (item 5.4). Como controle negativo, animais foram inoculados com 10 μ L de PBS. Os animais foram acompanhados por 9 d.p.i, sendo registrada diariamente a evolução dos sinais clínicos: variação de peso dos animais, letalidade, piloereção, arqueamento de dorso e balanopostite (Ferreira *et al.*, 2008a).

Os animais foram sacrificados após 10 dias de observação, por meio da administração de 100 μ L da solução anestésica/analgésica seguida por deslocamento cervical. Posteriormente, foram coletados órgãos (baço, fígado, pulmão, cérebro e intestino) e o sangue (FERREIRA *et al.*, 2008a).

5.12- Titulação viral dos órgãos processados (CAMPOS & KROON, 1993 - modificado)

Após o sacrifício dos animais, o sangue, pulmão, intestino, fígado e o baço destes animais foram coletados e estocados a -70°C para análise do tropismo viral. Os órgãos coletados foram pesados e macerados em PBS 1X na proporção de 1:10 (p/v), com o auxílio de um graal. Posteriormente, foram congelados e descongelados três vezes para liberação de partículas virais

das células. Em seguida, centrifugados a 425 g por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante coletado para ser utilizado no ensaio de titulação viral dos órgãos processados. Para determinar os títulos de vírus presentes nos órgãos dos animais infectados foram feitos ensaios de titulação viral de acordo com protocolo descrito no item 5.5. O título do órgão foi dado em pfu por grama de tecido.

5.13- Dosagem de citocinas

5.13.1 Ensaio Imunoenzimático ligado a enzima (ELISA)

Para avaliar a expressão de citocinas (IL-10, INF- γ , TNF α , IL-17), fragmentos de 100mg do pulmão foram macerados com auxílio de um ultra turrax (IKA T 18 Basic) e ressuspendidos em 1mL de solução de extração de citocinas [PBS contendo um coquetel de anti-proteases (0,1 mM PMSF, 0,1 mM cloreto de benzetônio, 10 mM EDTA e 20 KI de aprotinina A) e 0,05% Tween-20]. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 4°C por 10 minutos a 10.621 g (Eppendorf 5430 R, São Paulo, Brasil). Os sobrenadantes foram imediatamente coletados e armazenados a -70°C para posterior dosagem das citocinas.

A dosagem das citocinas foi realizada pelo método de ELISA. Estes ensaios foram realizados em parceria com o Laboratório de Agentes Bioterapêuticos sob a supervisão do Professor Dr. Flaviano Martins e com o Laboratório de Biologia Molecular de Microorganismos sob a supervisão da Professora Dra.Daniele de Souza. Os kits para as citocinas e quimiocinas foram obtidos da R&D Systems (DuoSet) (R&D Systems, Minneapolis, USA). As instruções do fabricante para a realização dos ensaios foram seguidas (MARTINS *et al.*, 2011). Os resultados foram expressos como picogramas de quimiocinas / citoquinas (\pm SEM) normalizado para o tecido 100 mg ou 1 mL de sobrenadante de cultura.

5.13.2 PCR em tempo real

5.15.2.1 Extração de RNA total celular e transcrição reversa

A extração de RNA total celular foi feita a partir de alíquotas de pulmões macerados (item 4.11.1) utilizando o kit Rneasy (Qiagen, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante.

A obtenção de cDNA foi realizada tendo como molde 1 µg de RNA extraído do pulmão. As reações foram realizadas utilizando a enzima MMLV (Promega, Madison, WI, USA), tampão 5X, dNTPs, oligo Dt (0,5 µg) e DTT nas concentrações indicadas pelo fabricante e água q.s.p para 25 µl de reação. O RNA e oligo dT foram incubados a 70 °C por 5 minutos e depois incubados em gelo por 5 minutos. Os outros componentes da reação foram adicionados e os tubos incubados a 42 °C por uma hora. O cDNA resultante foi diluído em 50 µl de água.

5.13.2.2 PCR em tempo real

O cDNA obtido com a reação de transcrição reversa foi utilizado como molde nas reações de PCR em tempo real. Estas foram realizadas em placas de 48 poços, em duplicata, utilizando oligonucleotídeos específicos (200µM), SYBR Green Master Mix (1X) (Applied Biosystem, EUA), 1µ de cDNA e água em q.s.p. 10 µl. As reações foram feitas no aparelho StepOne (Applied Biosystem, EUA). Os resultados foram obtidos a partir de valores arbitrários dados a curva padrão e corrigidos utilizando normalização com os níveis do gene constitutivo beta actina.

Os resultados foram analisados com base no valor de *Cycle Threshold* (CT) ou ciclo limiar, sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atinge dado limiar, o que permite a análise quantitativa da expressão do fator em avaliação. Os valores de Ct obtidos nesses experimentos foram utilizados para o cálculo da expressão relativa de mRNA das citocinas em relação à do β- actina. Essa relação é denominada pelo Delta Ct (Δ Ct) e é calculada pela fórmula:

$$\Delta Ct = (Ct \text{ controle endógeno} - Ct \text{ gene-alvo})$$

Em função da característica logarítmica dessa variável, foi utilizado o parâmetro $2^{-\Delta Ct}$ para a análise dos dados conforme recomendado na literatura (Livak e Schmittgen, 2001).

Tabela 2. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR em tempo real (dados do Laboratório de Vírus).

Oligonucleotídeo	Sequência <i>Foward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
Beta actina	AAATCGTGCCTGACATCAAAGA	GCCATCTCCTGCTCGAAGTC
IFN $\alpha 2$	GGACAGGCAGGACTTTGGATT	GCCTTCTGGATCTGCTGGTTA
IFN β	ACACCAGCCTGGCTTCCATCA	AGGGCTGTCGTGGTGGAGAAGCAC
IFN $\lambda 2/3$	ACCCTGAAGGTCTGGGAGAAC	AAGAGGCTGGCCAGGAT
OAS1a	CCACACTCAAGGGCAAGTCA	CAAAGCTGGTGAGATTGTTAAGA
PKR	CCTCCTCAGTCTCCCGAACA	TGCTCGCTGGCAATCTCA
Mx2	TGAATGCCTACCGCCAAGA	AATACTGGATGATCAAGGGAACGT

5.13. Análises histopatológicas

Os tecidos foram fixados em formalina a 10% para avaliação histopatológica. Os tecidos fixados foram embebidos em parafina e seccionados em 5 a 6 μm em micrótomo rotatório padrão, e colocados sobre lâminas para coloração com hematoxilina e eosina (HE). As lesões histopatológicas observadas foram graduadas na escala de leve, moderada e grave, baseada na gravidade das lesões (FERREIRA *et al*, 2008). As análises histológicas foram feitas pela patologista Dra Camila Megale de Almeida Leite, Professora do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, que gentilmente aceitou contribuir neste trabalho.

5.13. Análises estatísticas

Os resultados obtidos referentes aos títulos virais encontrados em diferentes órgãos, porcentagens de médias de perda de peso dos diferentes grupos e letalidade foram analisados utilizando o teste ANOVA e pós teste Newman-Keuls, e para os dados de sobrevivência foi utilizado o teste Log-

Rank. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes (GraphPad Prism software, versão 5.0).

VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO PARCIAL

6.1. Multiplicação, purificação e titulação viral

A multiplicação da amostra VACV-WR em células Vero, purificação em colchão de sacarose e titulação em células BSC-40, permitiram a obtenção de um título viral de $2,57 \times 10^9$ PFU/ml. Título viral suficiente para infecção dos camundongos conforme o item 5.11.

6.2. Quantificação do probiótico

A quantificação do probiótico pelo método de spread-plate obteve uma concentração de 10^9 UFC/mL, 10 (colônias contadas) x 10 (fator de diluição da amostra) x 10^7 (inverso da diluição). Sendo assim, a gavagem foi feita utilizando 100 μ L de solução com o probiótico, para que uma concentração de 10^8 UFC/mL fosse administrada nos camundongos diariamente.

6.3. Infecção de camundongos Balb/C com VACV-WR e esquemas de tratamento

6.3.1 Tratamento utilizando probiótico vivo após a infecção

Com o intuito de investigar se a ingestão diária de *L. paracasei* exerceria alguma influência após uma infecção intranasal utilizando 100 vezes a LD_{50} de VACV-WR (10^6 pfu), quatro grupos de tratamento utilizando camundongos Balb/C foram utilizados: PBS/não infectado (não infectado com VACV e não tratado com o probiótico), Probiótico vivo/ não infectado (não infectado com VACV e tratado com probiótico vivo), VACV/ infectado (infectado com VACV e não tratado com probiótico), Pós-tratado vivo/ infectado (infectado com VACV e tratado com probiótico a partir do dia da infecção) foram utilizados conforme descrito no item 5.10 na Figura 8.

O acompanhamento feito durante nove dias após a infecção demonstrou que, conforme o esperado, os grupos controles não infectados, (PBS/não infectado e Probiótico vivo/ não infectado) não apresentaram qualquer sinal. Além disso, os animais ganharam peso, cerca de 13%, gradualmente até o 9ºd.p.i. (Figura 9A).

Todos os camundongos dos grupos infectados (VACV/infectado e o Probiótico vivo/ infectado) apresentaram arqueamento de dorso e pilo-ereção, do 3º ao 9ºd.p.i., ou até a data do óbito. Quatro animais de cada grupo apresentaram balanopostite, do 5º ao 9º d.p.i., sendo que três camundongos que apresentaram balanopostite no grupo VACV e um camundongo que apresentou balanopostite no grupo Probiótico vivo/Infectado morreram entre o 8º e 9º d.p.i.

Apesar dos camundongos dos grupos infectados demonstrarem perda de peso semelhante até o 9ºd.p.i., (Figura 9A) o tratamento com o probiótico foi capaz de reduzir a letalidade dos camundongos do grupo Probiótico vivo/infectado comparando com o grupo controle não tratado, VACV/infectado. Sendo que este último grupo apresentou letalidade de 44%, já que quatro animais infectados foram a óbito, dois no 8º e dois no 9ºd.p.i. (Figura 9B). O grupo Probiótico vivo/infectado, apresentou letalidade de 22%, no qual dois animais foram a óbito no 9º d.p.i. Esse resultado mostra que apesar do tratamento com probiótico não evitar a perda de peso e o aparecimento dos sinais clínicos em uma infecção com VACV, ele é capaz de diminuir a letalidade dos camundongos durante a infecção (Figura 9B).

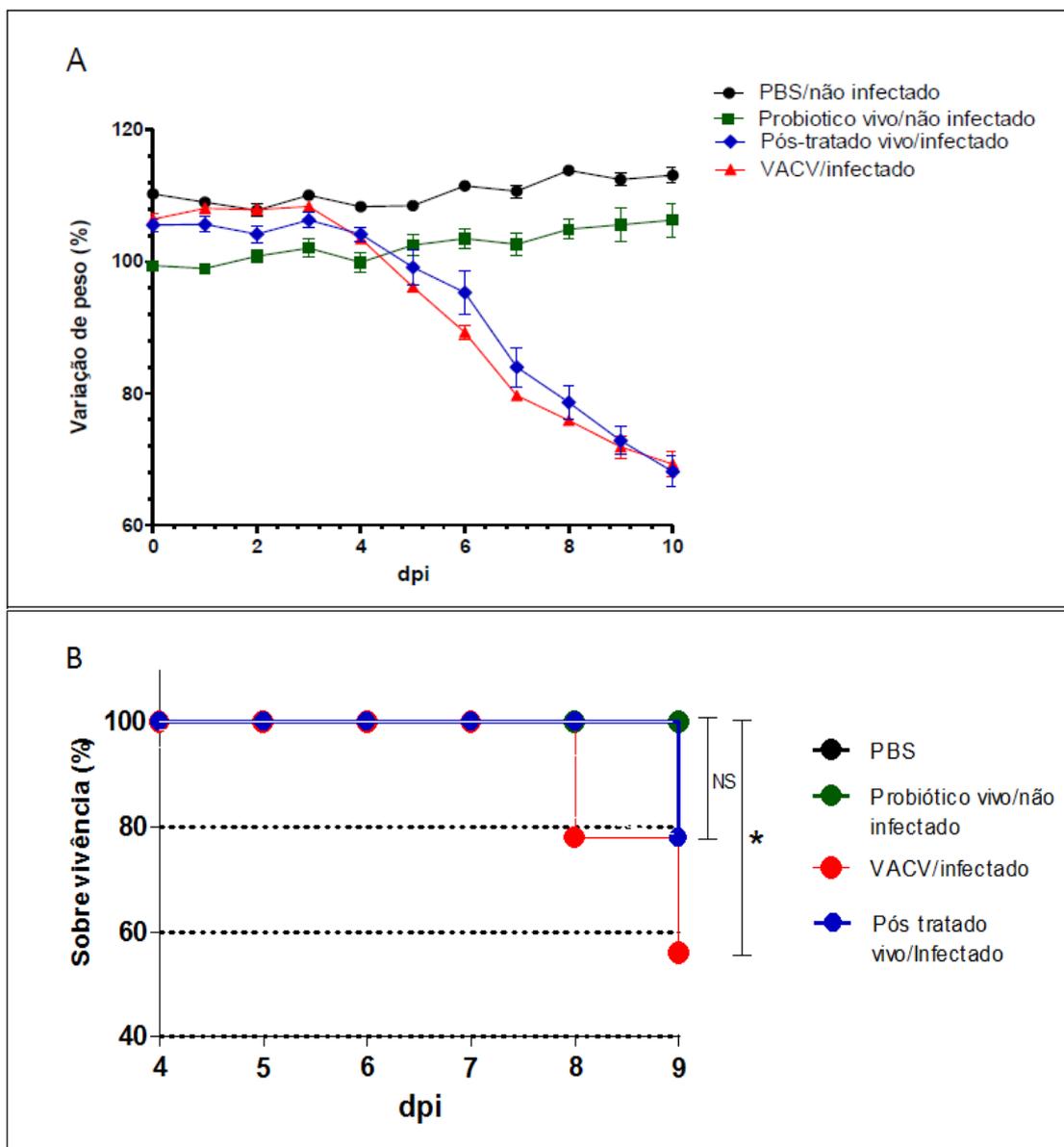


FIGURA 9: Variação percentual média diária do peso (A) e curva de sobrevivência (B) de camundongos Balb/c infectados. Dois grupos de camundongos Balb/c foram inoculados pela via intranasal com 10^6 PFU/10 μ L de VACV-WR (em vermelho o grupo não tratado com probiótico e em azul o grupo Pós-tratado/infectado). O grupo PBS/ não infectado (preto) e o grupo Probiótico vivo/ não infectado (verde) foram inoculado com PBS. As barras indicam desvio padrão. * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$ (teste Log-rank).

6.3.2. Tratamento com o probiótico antes da infecção

Com o objetivo de investigar se a atividade exercida pelo probiótico que resultou na diminuição da letalidade dos camundongos infectados com VACV-WR possuía natureza preventiva ou apenas curativa, um novo grupo de tratamento foi inserido na análise. Esse grupo, chamado Pré-tratado vivo/infectado, contendo 9 animais, recebeu diariamente por gavagem uma dose de 108 UFC/mL de probiótico vivo suspenso em PBS, durante nove dias antes e também durante nove dias após a infecção intranasal com VACV-WR, realizada como descrito anteriormente no item 5.10 e na Figura 8. Os grupos de tratamento descritos no tópico anterior também foram inseridos nesta análise.

Após acompanhar os camundongos durante 9 d.p.i foi demonstrado que todos os animais do grupo Pré-tratado/infectado apresentaram um curso de infecção muito semelhante ao grupo não tratado VACV/infectado. Os sinais clínicos foram os mesmos, assim como o período de manifestação. Arqueamento de dorso e pilo-ereção ocorreram do 3º ao 9ºd.p.i., ou até a data do óbito. Quatro animais de cada grupo apresentaram balanopostite, do 5º ao 9º d.p.i, sendo que a balanopostite apresentada pelo grupo de Pré-tratado/infectado foi mais exacerbada, como a que foi observada no grupo Pós-tratado/infectado (Figura 10).

A perda de peso também foi semelhante entre os grupos infectados como pode ser visualizado no (Figura 11A). Com relação à mortalidade, o grupo Pré-tratado/infectado apresentou a maior mortalidade (55%) entre os grupos infectados (44% do grupo VACV/infectado e 22% do grupo Pós-tratado vivo/ infectado) (Figura 11B). Esse resultado mostra que o tratamento com o probiótico antes da infecção não exerce efeito benéfico para os camundongos, diferentemente do que foi observado para esquema de tratamento que inicia após a infecção. O tratamento com o probiótico, portanto, exerceria um efeito apenas curativo e não preventivo.

A) Grupos não infectados (PBS/não infectado e Probiótico vivo/ não infectado)



B) Grupo infectado não tratado com probiótico VACV/infectado



C) Grupo de infectados e tratados com probiótico (Probiótico vivo/infectado)



D) Grupo infectado e pré- tratado (Pré-tratado vivo/infectado)



Figura 10: Manifestações clínicas decorrentes da infecção intranasal com VACV-WR em camundongos Balb/C no sexto d.p.i, tratados ou não com probiótico vivo. Os camundongos não infectados não apresentaram nenhum sinal clínico (A). Sinais clínicos como, piloereção, arqueamento de dorso e balanopostite apresentados pelos camundongos do grupo VACV/infectado (B) foram semelhantes aos apresentados pelos grupos Pós-tratado vivo/infectado (C) e Pré-tratado vivo/infectado (D). Entretanto os camundongos tratados com probiótico apresentaram balanopostite mais exarcebada como mostrado nesta figura.

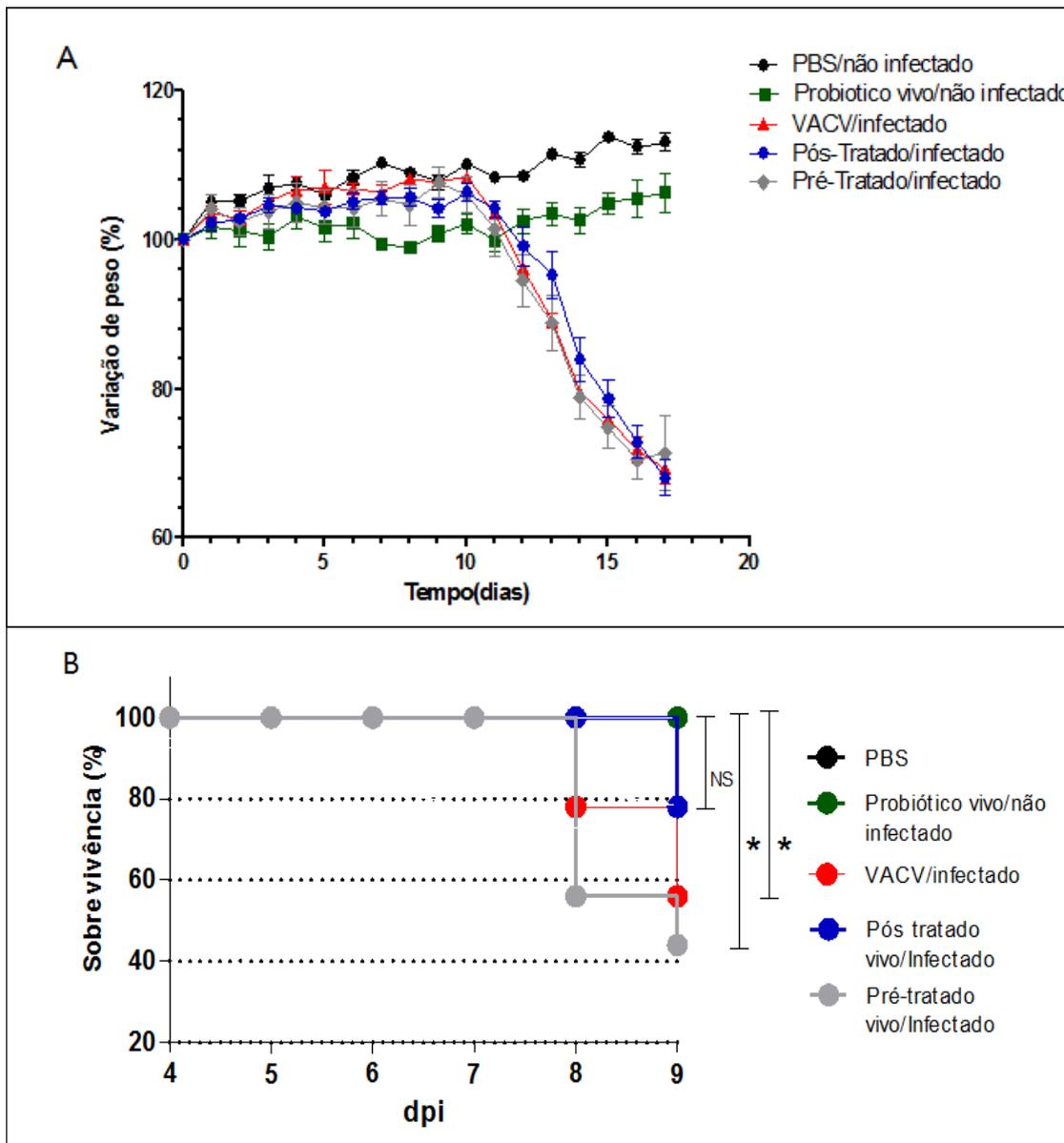


FIGURA 11: Variação percentual média diária do peso (A) e curva de sobrevivência (B) de camundongos Balb/c infectados com VACV. Três grupos de camundongos Balb/c foram inoculados pela via intranasal com 10^6 PFU/10 μ L das amostras VACV-WR (em vermelho o grupo não tratado com probiótico, em cinza o grupo Pré-tratado e em azul o grupo que recebeu probiótico apenas após a infecção). O peso dos animais foi monitorado por 15 dias. O grupo PBS/não infectado (preto) e o grupo Probiótico vivo/ não infectado (verde) foram inoculados com PBS. * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$ (teste Log-rank).

6.3.3. Tratamento com probiótico inativado pelo calor

A fim de investigar se a atividade exercida pelo probiótico após a infecção era decorrente apenas da presença da bactéria ou se era devido algum produto do seu metabolismo, foram feitos experimentos utilizando o probiótico inativado pelo calor. Para isso, três novos grupos de tratamento foram inseridos na análise. O grupo Probiótico morto/não infectado (n=4), possui função semelhante ao do Probiótico vivo/não infectado servindo como um controle para verificar como os camundongos reagem a ingestão do probiótico diariamente e para garantir que os efeitos adversos gerados nos demais grupos não sejam devido a ingestão do probiótico. Esse grupo recebeu apenas o probiótico inativado pelo calor diariamente.

Os grupos Pré-tratado morto/infectado (n=4) e Pós-tratado morto/infectado (n=5) receberam o mesmo esquema de tratamento descrito acima para os grupos Pré-tratado vivo/infectado e Pós-tratado vivo/infectado respectivamente. Porém, nesse caso foi administrado o probiótico inativado pelo calor. Os sinais clínicos gerados no decorrer da infecção foram os mesmos para todos os grupos infectados, como descrito no 6.3.1 e demonstrados na Figura 13.

A variação de peso entre os grupos infectados também foi semelhante, como mostrado no Figura 12A. Entretanto, no quesito letalidade é interessante notar que a mortalidade foi muito semelhante entre os grupos Pré-tratado vivo e Pré-tratado morto, 55% e 50% respectivamente. O mesmo foi observado quando comparamos os grupos Pós-tratado vivo e Pós-tratado morto em que a taxa de mortalidade foi de 22% e 20% respectivamente.

Estes resultados sugerem que os efeitos benéficos gerados no pós-tratamento são devido apenas a presença do probiótico e não devido a alguma substância produzida por ele. Além disso, podemos notar que o pré-tratamento mais uma vez não foi efetivo e que este probiótico apresenta apenas uma ação curativa e não preventiva em uma infecção com VACV.

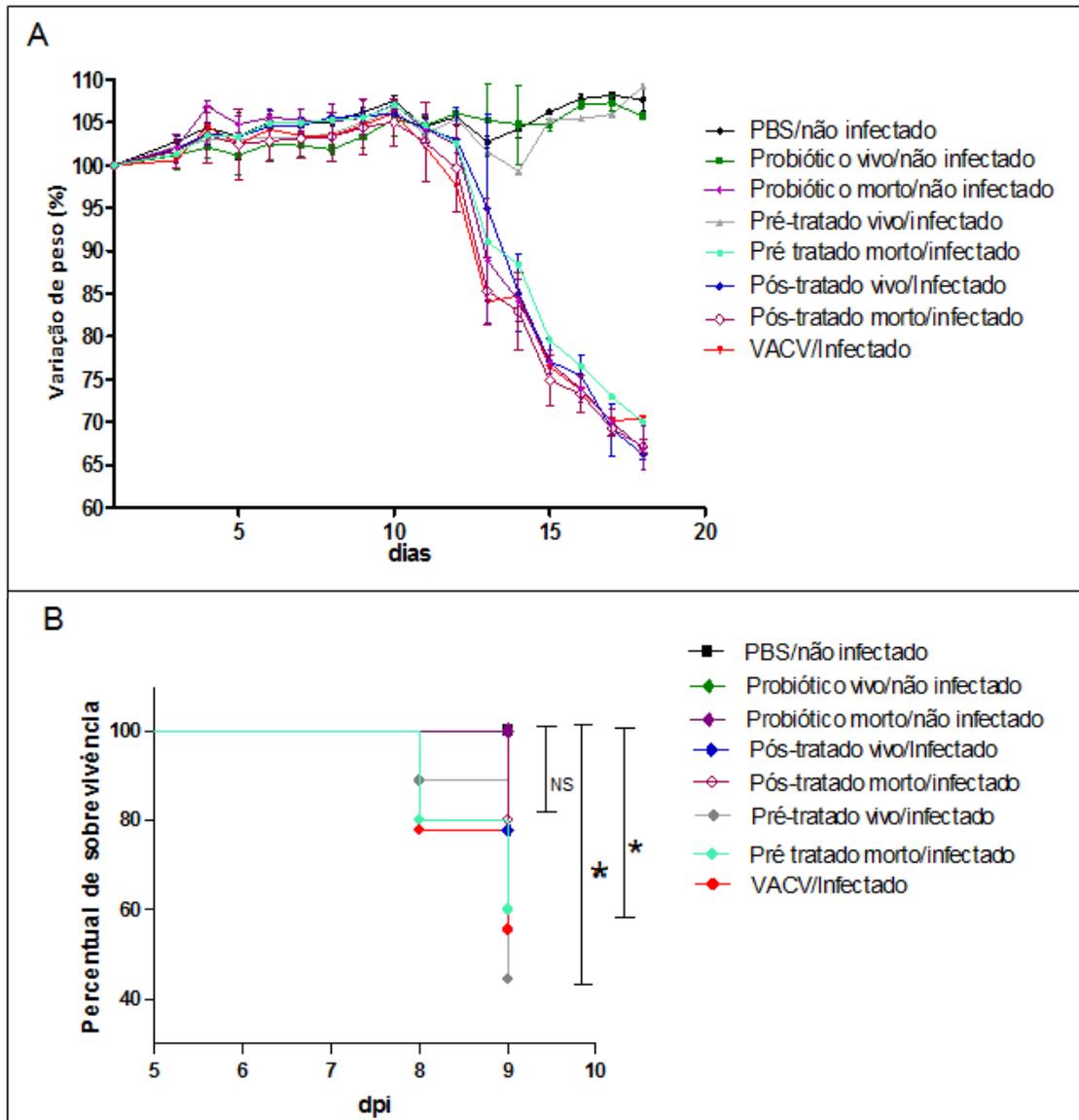


FIGURA 12: Variação percentual média diária do peso (A) e curva de sobrevivência (B) de camundongos Balb/c infectados com VACV. Cinco grupos de camundongos Balb/c foram inoculados pela via intranasal com 10^6 PFU/10 μ L das amostras VACV-WR: VACV/infectado (vermelho), Pré-tratado com probiótico vivo (cinza), Pré-tratado com probiótico morto (azul claro), Pós-tratado com probiótico vivo (azul escuro), Pré-tratado com probiótico morto (rosa). O peso dos animais foi monitorado por 15 dias. Os grupos PBS/não

infectado (preto), Probiótico vivo/ não infectado (verde) e Probiótico morto/infectado (roxo) foram inoculado com PBS. * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$ (teste Log-rank).



Figura 13: Manifestações clínicas decorrentes da infecção intranasal com VACV-WR em camundongos Balb/C no sexto d.p.i, tratados ou não com probiótico inativado. Sinais clínicos (piloereção, arqueamento de dorso e balanopostite) dos camundongos do grupo Pré-tratado

morto/infectado (B) e Pós-tratado morto/infectado (C). Camundongos do grupo Probiótico morto/ não infectado, não apresentaram nenhum sinal clínico de infecção (A).

6.3.4. Título viral em órgãos de camundongos infectados com *Vaccinia virus* tratados com probiótico

Objetivando identificar se o tratamento com o probiótico levou a alterações na disseminação viral nos órgãos dos camundongos infectados, foi feito a titulação viral do baço, fígado, cérebro, intestino e pulmão coletados no 9ºd.p.i, conforme descrito no item 5.5. Os títulos virais presentes no baço, cérebro, fígado e pulmão estão demonstrados no Figura 14. O título viral obtido no intestino, de todos os grupos, foi próximo de zero, portanto o resultado da titulação deste órgão não foi representada.

Os maiores títulos obtidos foram detectados no pulmão, variando de 106 a 107 pfu/g no grupo VACV/infectado, 105 no grupo Pós-tratado vivo/infectado, e entre 105 a 106 no grupo Pré-tratado vivo/infectado. As análises estatísticas mostraram que a diferença entre o grupo VACV/infectado e o grupo Pós-tratado é significativa (Figura 14B).

No cérebro o grupo VACV/infectado também apresentou o maior título viral, correspondente a 105 pfu/g, sendo que a diferença com relação ao título do grupo Pós-tratado vivo/infectado (entre 103 e 104 pfu/g) foi significativa (Figura 14A). No fígado foram detectados vírus apenas nos grupos VACV/infectado (102 pfu/g) e no grupo Pré-tratado vivo/infectado (103 pfu/g) sendo que a diferença observada entre o grupo VACV/infectado e Pós-tratado vivo foi significativa (Figura 14C). O baço foi o órgão que apresentou a menor carga viral que variou entre 103 e 104, sendo que não foi observado diferença estatística entre os grupos (Figura 14D).

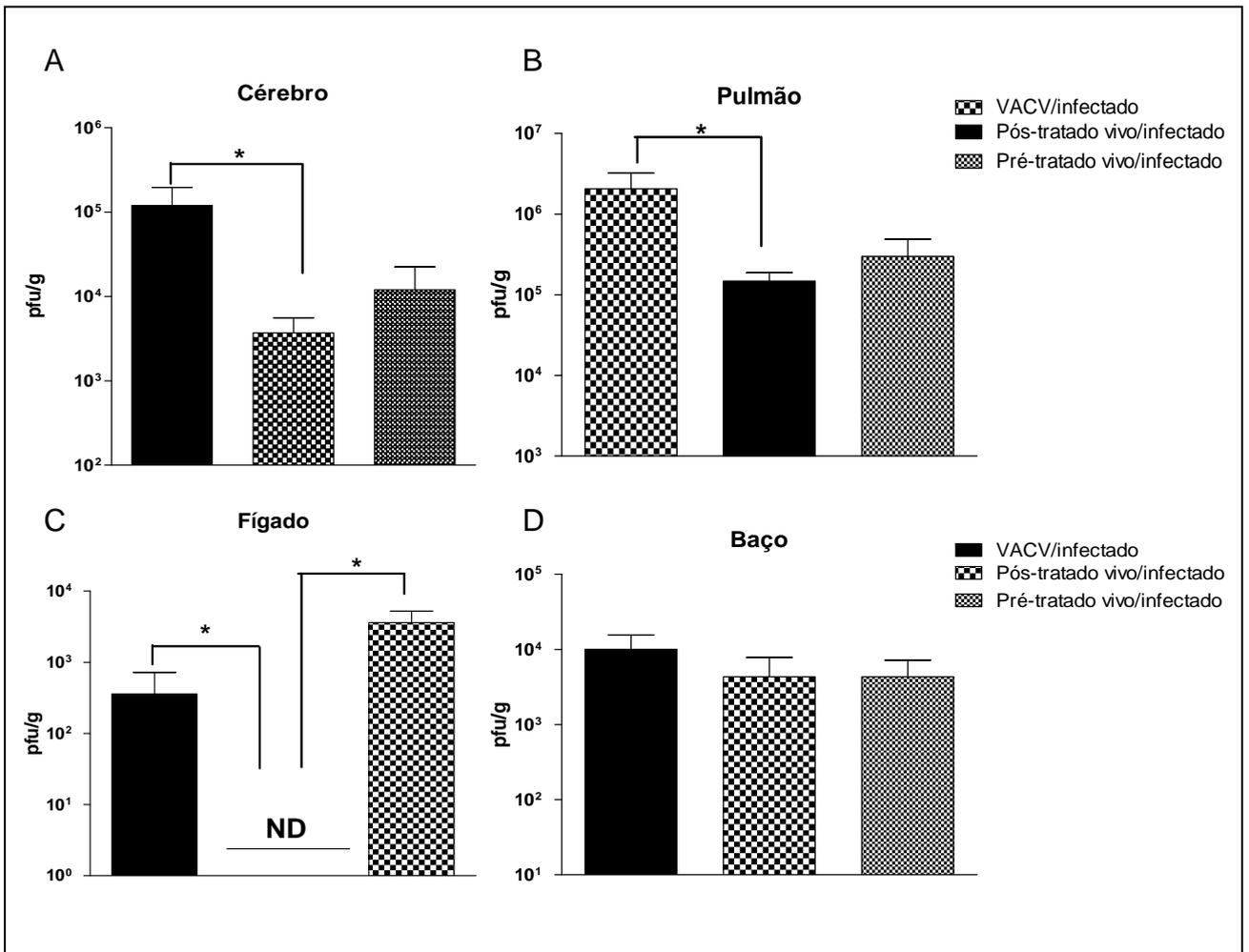


FIGURA 14– Títulos virais de VACV-WR em órgãos de camundongos infectados pre tratados e pos tratados com probiótico. Camundongos (n=5) foram infectados com amostras de VACV-WR (10⁶ pfu/10μL). Os órgãos foram coletados e a carga viral titulada no 9° d.p.i. Os órgãos titulados foram: A) Cérebro; B) Pulmão; C) Fígado e D) Baço. O título viral foi apresentado a partir da média obtida dos títulos de vírus nos órgãos foi calculado como pfu/g de tecido. * P< 0,05, ** P< 0,001, *** P< 0,0001 (ANOVA e pós teste Newman-Keuls). As barras indicam desvio padrão.

Considerando os resultados descritos acima, assim como o fato de que o pós tratamento com o probiótico foi capaz de reduzir de forma significativa o título viral no pulmão, cérebro e fígado, a atividade do probiótico nestes órgãos foi melhor investigada. Para isso, estes órgãos do grupo Pós-tratado morto/infectado também foram titulados. Além disso, um experimento paralelo foi realizado, no qual três grupos de camundongos foram submetidos ao mesmo esquema de tratamento descrito para os grupos VACV/infectado, Pós tratado vivo/infectado e Pré-tratado morto/ infectado, porém estes

camundongos foram sacrificados no início da infecção, 3° d.p.i., quando foi observado o primeiro sinal clínico, a piloereção. Este experimento foi feito para investigar se a atividade do probiótico é mais robusta no início da infecção.

Os resultados mostraram que o título viral no pulmão é maior no 3° d.p.i., para todos os grupos de tratamento. O título viral no cérebro foi semelhante tanto no terceiro quanto no 9° d.p.i, e no fígado não foram detectadas partículas virais no 3° d.p.i (Figura 15A). Como já foi descrito anteriormente, o título viral nos três órgãos testados do grupo Pós-tratado vivo diminuiu consideravelmente no 9 d.p.i (Figura 14). Fato que condiz com a menor letalidade apresentada por este grupo em relação aos demais (Figura 12B). Entretanto, o pós-tratamento utilizando o probiótico inativado não foi capaz de diminuir de forma significativa o título viral no pulmão e no cérebro dos camundongos infectados em relação ao grupo controle não tratado VACV/infectado. Este dado, ao contrário do que foi visto para a mortalidade (Figura 12B) informa que o probiótico ativo é mais eficiente na redução do título viral no pulmão.

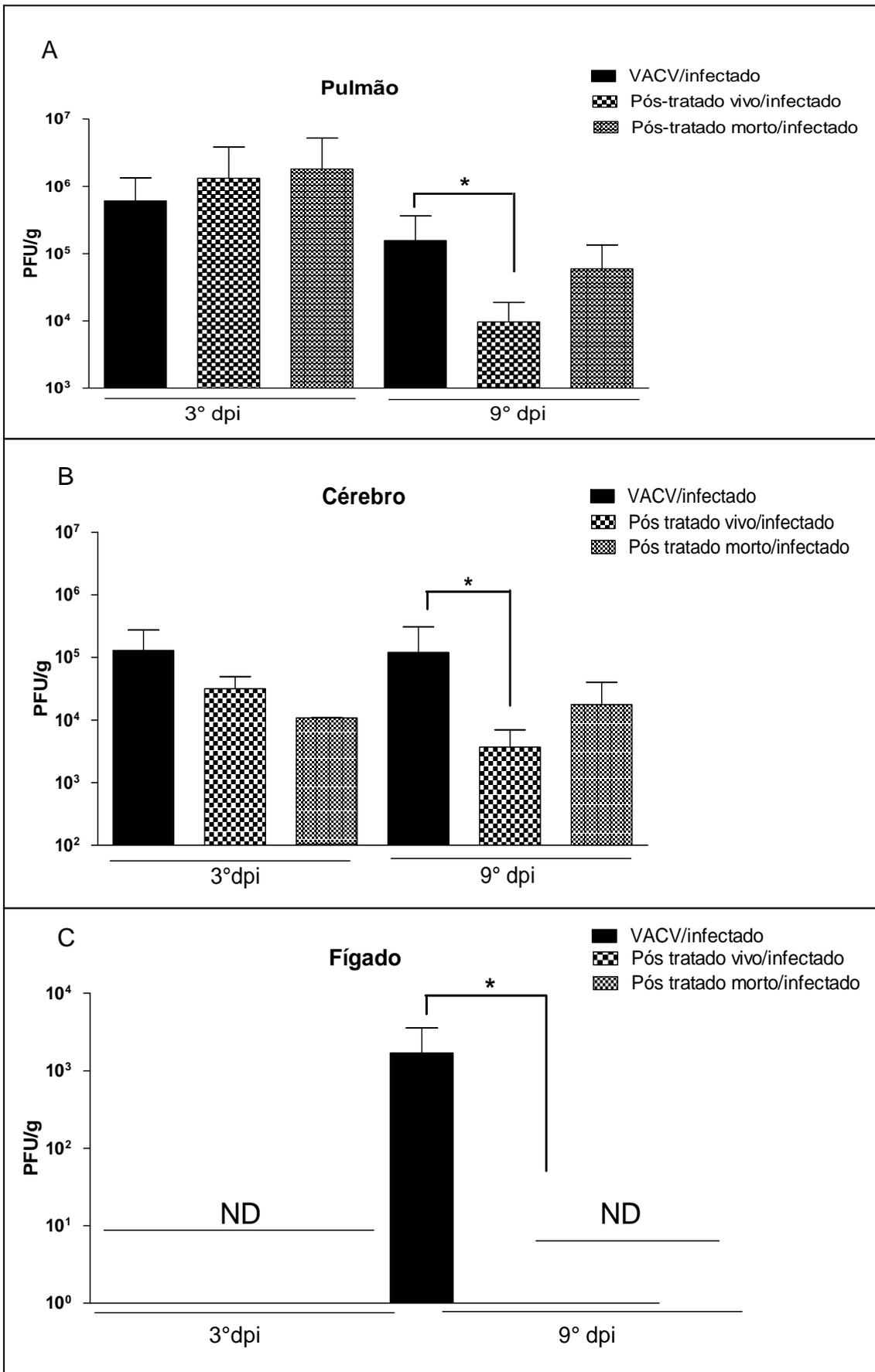


FIGURA 15: Título viral no pulmão(A), cérebro(B) e fígado(C) dos camundongos infectados com VACV- WR, tratados ou não com probiótico, no 3° e 9° d.p.i. Camundongos (n=5) infectados com amostras de VACV-WR (10^6 pfu/10 μ L). Os órgãos foram coletados e a carga viral titulada no 3° e 9° d.p.i. Os órgãos titulados foram: A) Pulmão; B) Cérebro; C) Fígado. O título viral foi apresentado a partir da média obtida dos títulos de vírus nos órgãos foi calculado como pfu/g de tecido. * P<0,05, ** P< 0,001, *** P< 0,0001 (ANOVA e pós teste Newman-Keuls). As barras indicam desvio padrão.

6.4. Avaliação do perfil de citocinas produzidas durante o tratamento com o probiótico

Para avançarmos na análise das alterações exercidas pelo probiótico frente a infecção por VACV-WR na letalidade foi realizada uma avaliação do perfil de citocinas dos diferentes grupos aqui propostos. As citocinas IFN γ , IL-10, IL-17 e TNF α foram dosadas pelo método de ELISA, conforme descrito no item 5.15.1. Enquanto que o RNAm das citocinas IFN α 2, IFN β e IFN λ 2/3, assim como os ISGs: OAS e PKR, foram dosadas utilizando PCR em tempo real como descrito no item 5.15.2.

A dosagem da citocina IFN γ , um potente indutor da atividade inflamatória, mostrou que os grupos Pós-tratados, tanto utilizando o probiótico vivo quanto o morto, tiveram uma redução significativa de 45% e 65% respectivamente, nos níveis de IFN γ produzidos no pulmão no 9° d.p.i (Figura 16). A citocina IL-17, que exerce importante papel no recrutamento de células inflamatórias para o local da infecção (Darling *et al.*, 2014) também apresentou menor expressão, com redução de 37,4% e 29,5% nos grupos pós-tratados com probiótico morto e vivo, respectivamente, comparando com o grupo VACV/infectado (Figura 17). A citocina pró-inflamatória, a TNF α também foi dosada. É possível notar uma diferença significativa (20%) nos níveis de TNF α entre os grupos Probiótico vivo/infectado e o grupo VACV/infectado, como mostrado na Figura 18.

Além das citocinas pró-inflamatórias, IFN γ , IL-17 e TNF α , também foi avaliada a citocina IL-10 que apresenta importante função de contenção da

resposta inflamatória (SARAIVA e O'GARRA, 2010). Não foi verificada diferença significativa entre os níveis de IL-10 produzidos pelos grupos Pós-tratados (vivo e morto) e o grupo VACV/infectado. Também não houve diferença significativa entre os grupos não infectados (PBS, Probiótico vivo e Probiótico morto) e o grupo VACV/infectado (Figura 19). Portanto, todos esses dados evidenciam que o probiótico pode estar exercendo uma atividade anti-inflamatória ao inibir os níveis de expressão de importantes citocinas que participam da resposta inflamatória como IFN γ , TNF α e IL-17.

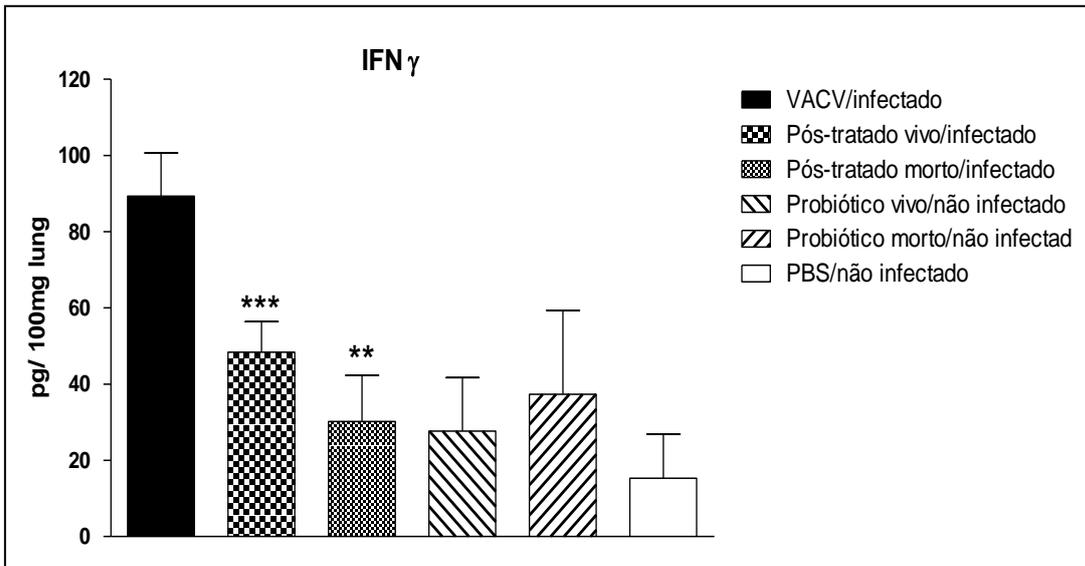


FIGURA 16: Níveis de IFN γ no pulmão: Dosagem ,no 9° d.p.i., de IFN γ no pulmão dos camundongos dos grupos: VACV, Pós-tratado vivo/infectado, Pós-tratado morto/infectado, Probiótico vivo/não infectado, Probiótico morto/não infectado e PBS.. * P<0,05, ** P< 0,001, *** P< 0,0001(ANOVA e pós teste Newman-Keuls). As barras indicam desvio padrão.

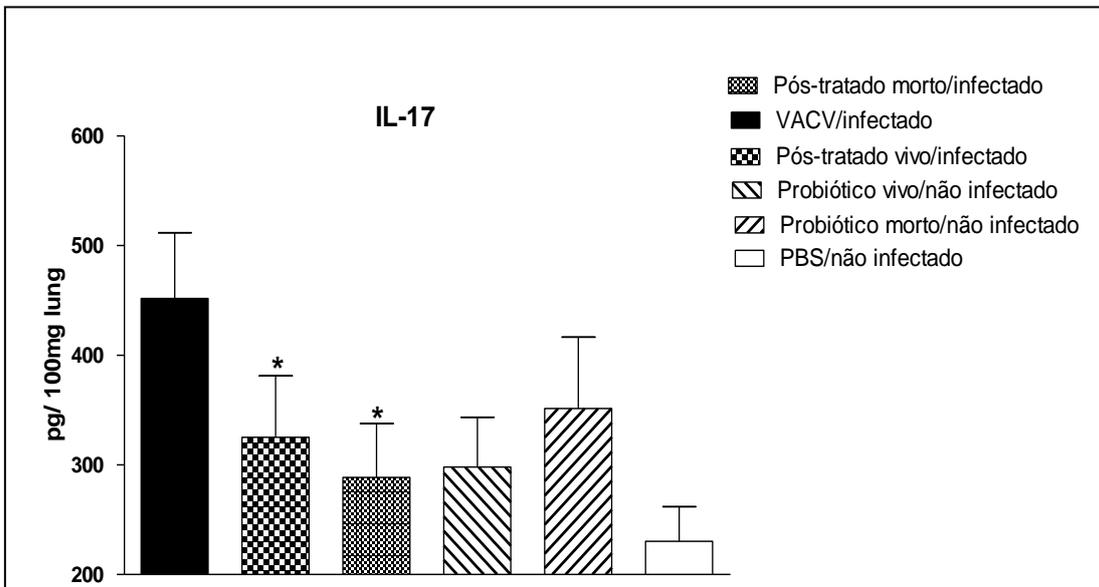


FIGURA 17: Níveis de IL-17 no pulmão : Dosagem , no 9° d.p.i., de IL-17 no pulmão dos camundongos dos grupos: VACV, Pós-tratado vivo/infectado, Pós-tratado morto/infectado, Probiótico vivo/não infectado, Probiótico morto/não infectado e PBS . * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$ (ANOVA e pós teste Newman-Keuls). As barras indicam desvio padrão.

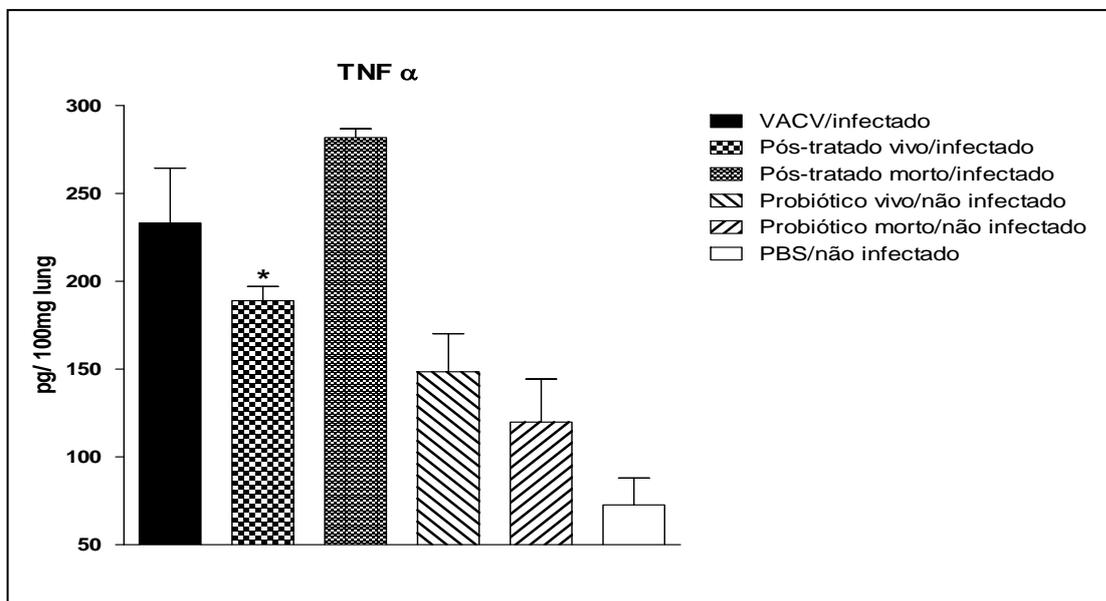


FIGURA 18: Níveis de TNFα no pulmão : Dosagem, no 9° d.p.i., de TNFα no pulmão dos camundongos dos grupos: VACV, Pós-tratado vivo/infectado, Pós-tratado morto/infectado, Probiótico vivo/não infectado, Probiótico

morto/não infectado e PBS.. * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$ (ANOVA e pós teste Newman-Keuls). As barras indicam desvio padrão.

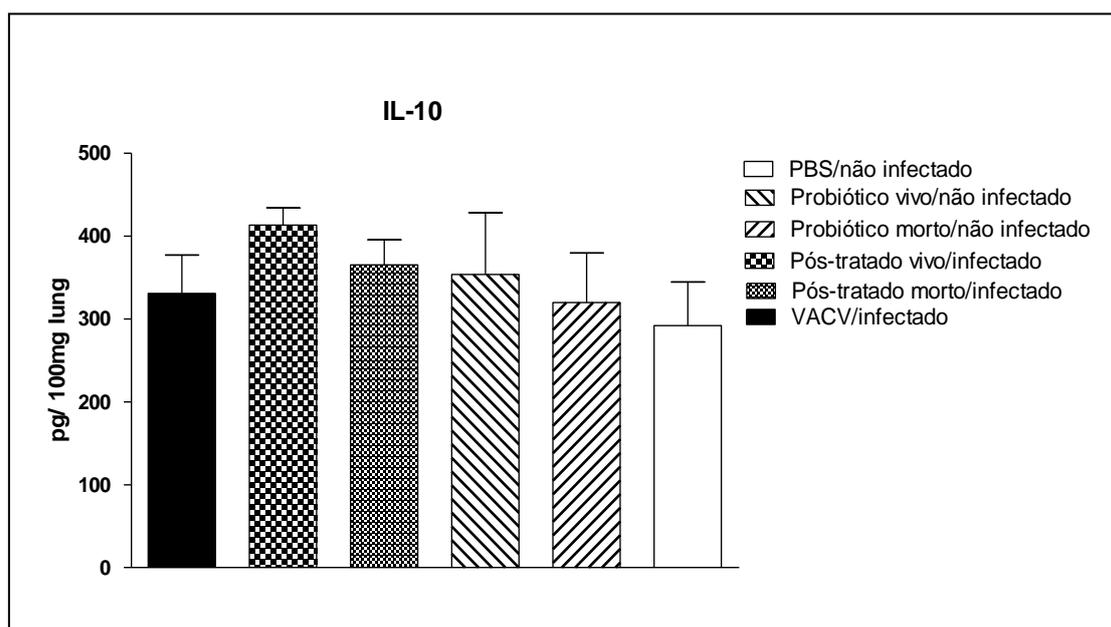


FIGURA 19: Níveis de IL-10 no pulmão : Dosagem, no 9º d.p.i., de IL-10 no pulmão dos camundongos dos grupos: VACV, Pós-tratado vivo/infectado, Pós-tratado morto/infectado, Probiótico vivo/não infectado, Probiótico morto/não infectado e PBS.* $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$ (ANOVA e pós teste Newman-Keuls). As barras indicam desvio padrão.

Dentre as diversas citocinas que compõe a resposta imune antiviral gerada contra os poxvírus os interferons do tipo I (predominantemente $IFN\alpha$ e $IFN\beta$) e do tipo III ($IFN\lambda$) exercem um importante papel. Estas citocinas estimulam a transcrição de genes específicos (ISGs), que codificam diversas proteínas com funções antivirais (*revisado por* BONJARDIM, FERREIRA, KROON, 2009). Portanto, como o propósito de elucidar melhor os resultados apresentados acima, a dosagem de $IFN\alpha 2$, $IFN\beta$, $IFN\lambda$, assim como de alguns ISGs (OAS, PKR, Mx2) foi determinada.

A dosagem de $IFN\alpha 2$ mostrou que os níveis de RNAm desta citocina estão cerca de 70% mais altos no pulmão dos grupos pós-tratados com o probiótico vivo e morto respectivamente, quando comparado com os níveis de RNAm produzido pelo grupo VACV/infectado (Figura 20). Além disso, os níveis de RNAm do grupo VACV/infectado foi 86% maior comparando com o grupo PBS/não infectado e semelhante aos demais grupos não infectados (Probiótico vivo e Probiótico morto) (Figura 20).

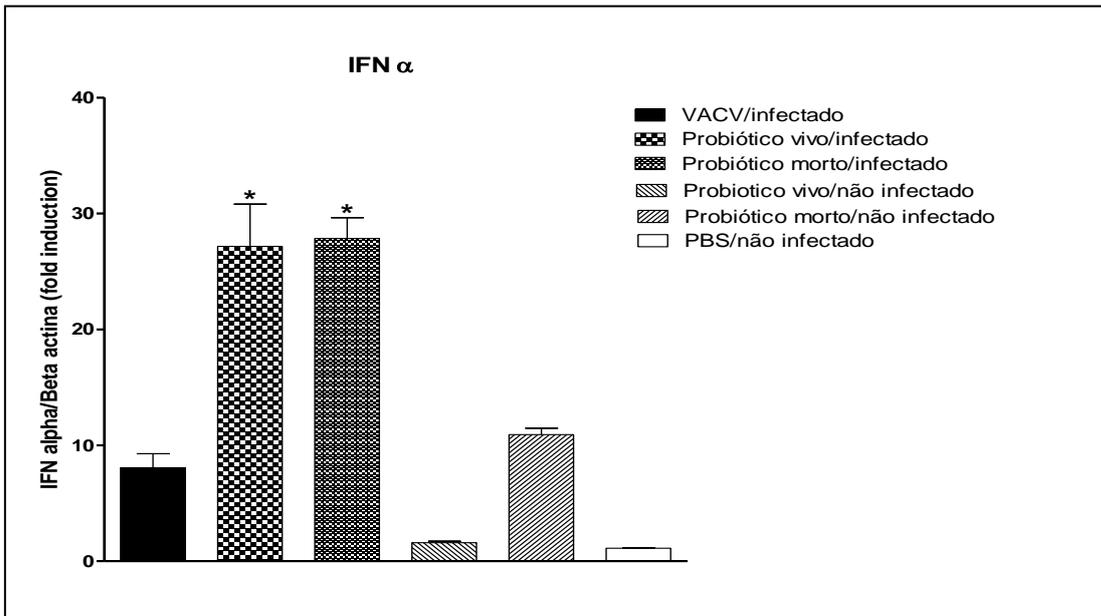


FIGURA 20: Níveis de IFN α 2 (RNAm) no pulmão : Dosagem, no 9º d.p.i., de IFN α 2 RNAm no pulmão dos camundongos dos grupos: VACV, Pós-tratado vivo/infectado, Pós-tratado morto/infectado, Probiótico vivo/não infectado, Probiótico morto/não infectado e PBS..* P<0,05, ** P< 0,001, *** P< 0,0001(ANOVA e pós teste Newman-Keuls). As barras indicam desvio padrão.

A dosagem de IFN β mostrou que o grupo Pós-tratado vivo apresenta uma concentração 81% maior de RNAm desta citocina no pulmão, em relação ao grupo VACV/infectado (Figura 21). A dosagem de IFN λ 1/2 (Figura 22) apresentou um perfil muito semelhante ao mostrado para IFN β (Figura 21), na qual o grupo Pós-tratado vivo também obteve concentração de RNAm 87,5% maior do que a obtida para o grupo controle não tratado, VACV/infectado. Assim como, ocorreu na dosagem de IFN β , as diferenças apresentadas nos níveis de IFN λ entre os demais grupos não foram significativas (Figura 22). É pertinente destacar que, ao contrário do que foi demonstrado no perfil das citocinas, IFN γ , IL-17 e IFN α , o grupo Pós-tratado morto não apresentou níveis de RNAm semelhante aos do grupo Pós-tratado vivo para as citocinas IFN β e IFN λ 2/3.

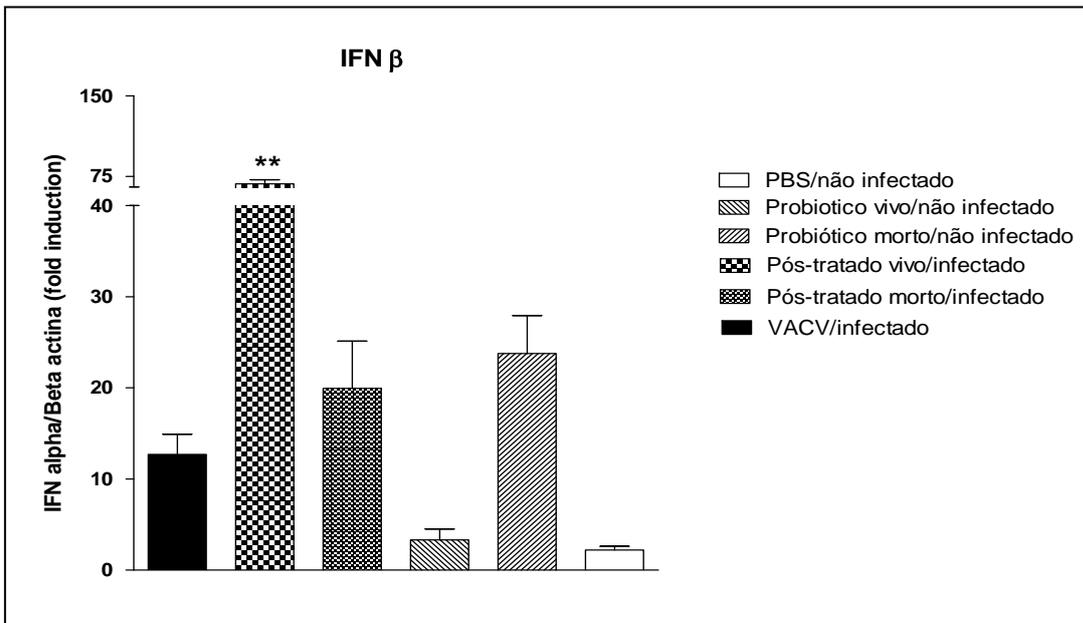


Figura 21: Níveis de IFNβ (RNAm) no pulmão : Dosagem, no 9º d.p.i., de IFNβ RNAm no pulmão dos camundongos dos grupos: VACV, Pós-tratado vivo/infected, Pós-tratado morto/infected, Próbiótico vivo/não infectado, Próbiótico morto/não infectado e PBS.* P<0,05, ** P< 0,001, *** P< 0,0001 (ANOVA e pós teste Newman-Keuls). As barras indicam desvio padrão

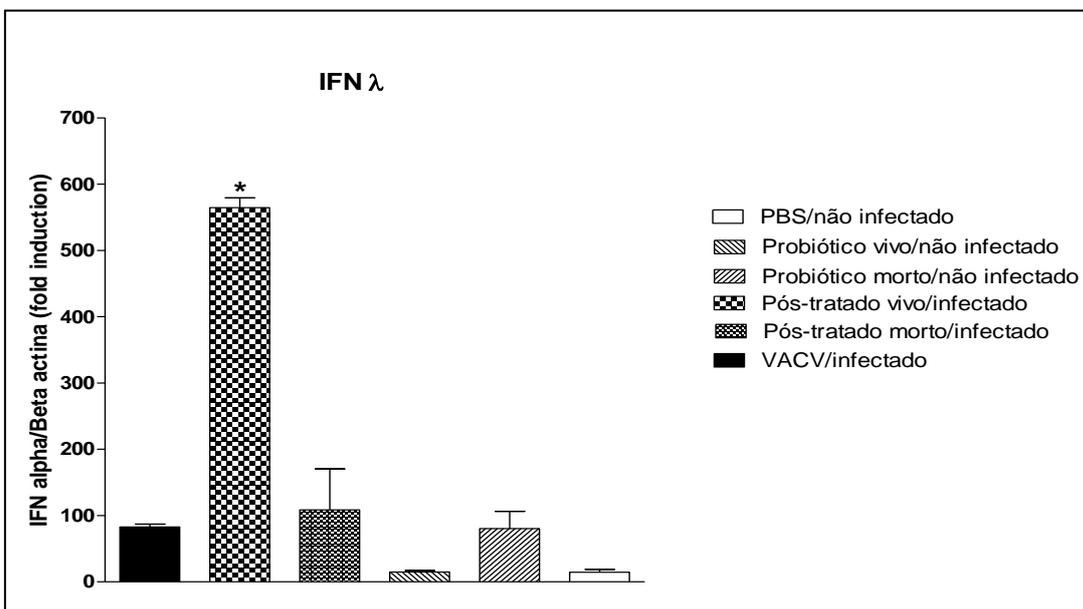


FIGURA 22: Níveis de IFNλ (RNAm) no pulmão : Dosagem, no 9º d.p.i., de IFNλ RNAm no pulmão dos camundongos dos grupos: VACV, Pós-tratado vivo/infected, Pós-tratado morto/infected, Próbiótico vivo/não infectado, Próbiótico morto/não infectado e PBS. * P<0,05, ** P< 0,001, *** P< 0,0001 (ANOVA e pós teste Newman-Keuls). As barras indicam desvio padrão.

6.5. Dosagem dos genes estimulados por interferon por PCR em tempo real

Diante das evidências de que o tratamento com probiótico é capaz de modular os níveis de IFN tipo I e III, fez-se importante investigar quais ISGs seriam os responsáveis pela atividade mediada por interferon nesse contexto. Para isso, a dosagem da expressão de três ISGs, dentre os quais OAS, PKR e Mx2 foi realizada. A quantificação de OAS mostrou que o grupo Pós-tratado vivo e o Pós-tratado morto apresentaram uma concentração de 56% e 52% maior, respectivamente, de RNAm desta citocina no pulmão, em relação ao grupo VACV/infectado (Figura 23).

A análise da expressão de PKR também mostrou que seus níveis de RNAm no grupo Probiótico vivo/infectado foi maior (62%) comparado ao grupo VACV/infectado. Entretanto, não houve diferença significativa na expressão de PKR entre os grupos Probiótico morto/infectado e VACV/infectado (Figura 24). Com relação a dosagem da expressão do gene Mx2, não foi obtido sucesso na amplificação cDNA correspondente a este gene,entretanto a amplificação do controle positivo demonstrou que a reação funcionou corretamente.

No modelo estudado a análise de componentes do sistema IFN demonstram ,em conjunto, que o tratamento com probiótico é capaz de estimular a expressão de IFNs do tipo I e III. O estímulo desses IFNs ativa mecanismos celulares de proteção antiviral, que neste caso são desempenhados principalmente por OAS e PKR.

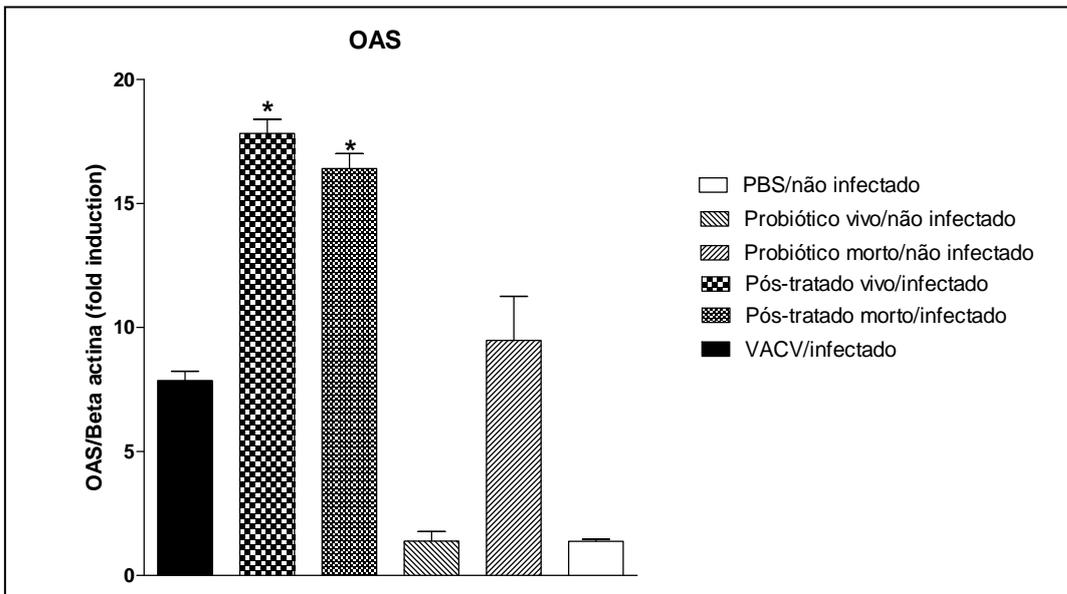


FIGURA 23: Níveis de OAS (RNAm) no pulmão : Dosagem, no 9º d.p.i., de OAS RNAm no pulmão (n=4) dos camundongos dos grupos: VACV, Pós-tratado vivo/infectado, Pós-tratado morto/infectado, Probiótico vivo/não infectado, Probiótico morto/não infectado e PBS. * P<0,05, ** P< 0,001, *** P< 0,0001 (ANOVA e pós teste Newman-Keuls). As barras indicam desvio padrão.

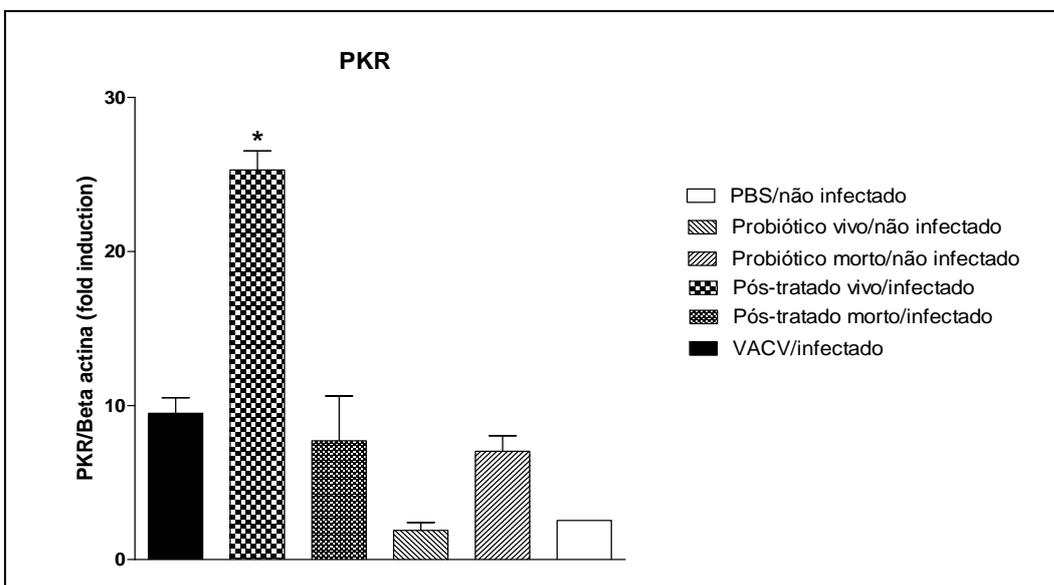


FIGURA 24: Níveis de PKR (RNAm) no pulmão : Dosagem, no 9º d.p.i., de PKR RNAm no pulmão dos camundongos dos grupos: VACV, Pós-tratado vivo/infectado, Pós-tratado morto/infectado, Probiótico vivo/não infectado, Probiótico morto/não infectado e PBS. * P<0,05, ** P< 0,001, *** P< 0,0001 (ANOVA e pós teste Newman-Keuls). As barras indicam desvio padrão.

6.6. Análises Histopatológicas

Para investigar se a diminuição das citocinas pró-inflamatórias, IFN- γ , TNF- α , e IL-17 apresentadas nos grupos pós-tratados com o probiótico resultou na diminuição da resposta inflamatória no pulmão, análises histológica foram realizadas nos pulmões dos camundongos, coletados no 9º d.p.i.

As análises dos grupos não infectados (PBS/não infectado, Probiótico vivo/não infectado, Probiótico morto/não infectado) revelaram que o tratamento com o probiótico não gera nenhuma modificação histopatológica no pulmão (Figura 25A). No entanto, os pulmões dos camundongos do grupo não tratado com probiótico (VACV/infectado) mostrou lesões pulmonares graves, com espessamento interalveolar, septos e inflamação intersticial. O colapso alveolar devido ao edema também pode ser observado, além de fibrina, hemorragia e infiltrado inflamatório. Pode ser observado também, de forma disseminada degenerações e necrose do epitélio bronquiolar (Figura 25B).

Os pulmões dos grupos que receberam o pós-tratamento com probióticos vivos (Figura 25C) ou mortos (Figura 25D) (Pós-tratado vivo/infectado e Pós-tratado morto/infectado) apresentaram lesões moderadas ou leves. As lesões pulmonares foram focais, apresentando espessamento menos proeminente dos septos interalveolares com preservação parcial dos espaços aéreos alveolares e menor inflamação intersticial, comparado ao grupo VACV/Infectado (Figura 25B).

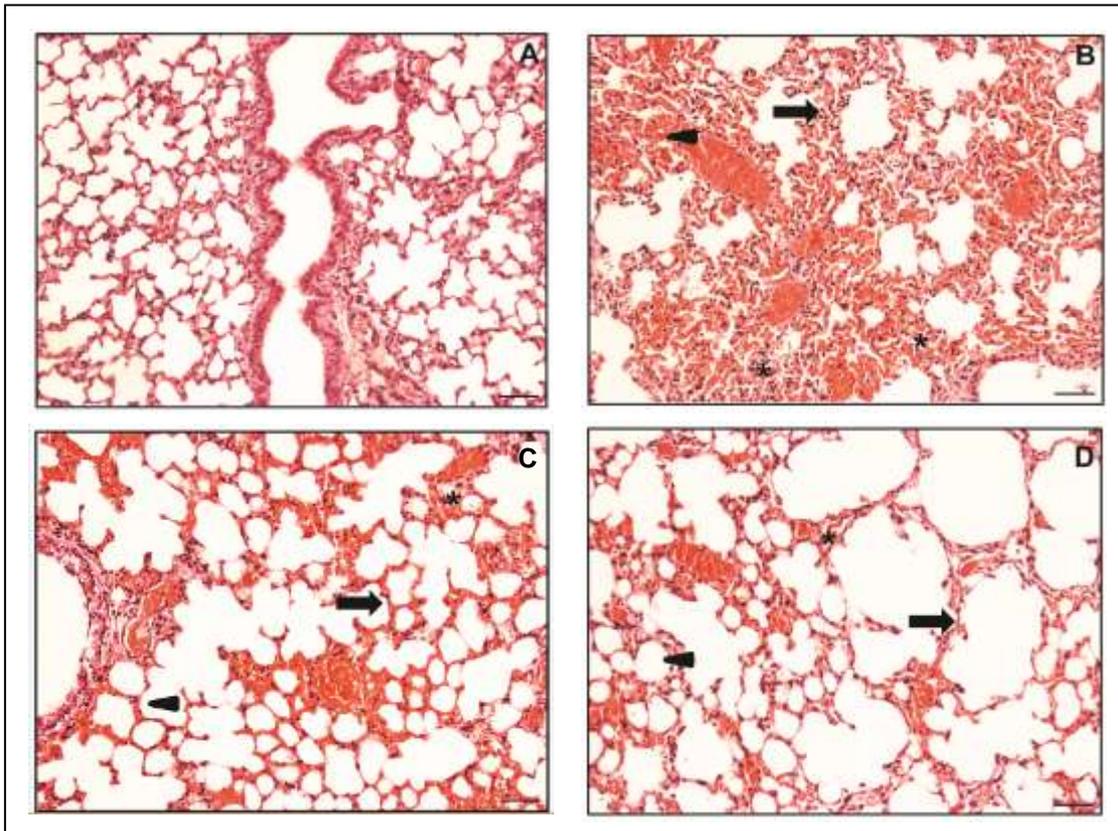


FIGURA 25: Análises histológicas dos pulmões de camundongos pós-tratados com o probiótico e dos grupos controle. Achados histológicos normais nos camundongos dos grupos não infectados (A) Lesões pulmonares graves em VACV camundongos infectados (B) mostrando espessamento dos septos interalveolares (seta), inflamação intersticial (*), colapso alveolar (seta) devido ao edema, fibrina, hemorragia e infiltrado inflamatório. Lesões moderadas a leves nos camundongos dos grupos Pós-tratado vivo/infectado (D) e Pós-tratado morto/Infectado (C), septos interalveolares conservados (seta), inflamação intersticial menos proeminente (*), e preservação de espaços de ar nos alvéolos (seta). Barra = 50 μ m. Coloração HE.

VI. DISCUSSÃO

Atualmente a utilização de probióticos tem sido proposta como uma possível abordagem terapêutica para diversas doenças virais. Recentemente, inúmeras publicações tem demonstrado que os probióticos são capazes de modular o sistema imune do hospedeiro favorecendo assim, a contenção da infecção viral. Dentre os gêneros de microrganismos que têm apresentado

potencial antiviral destaca-se o gênero *Lactobacillus* (KASAA *et al.*, 2014). Os lactobacilos já demonstraram atividade antiviral contra *Influenza A virus* (PARK, 2013), rinovírus (LUOTO *et al.*, 2013), rotavírus (VLOSOVA *et al.*, 2013) e VSV (IVEC *et al.*, 2007).

Entretanto, a possível interação entre os probióticos e os poxvírus ainda não foi descrita. Este fato demonstra a importância de estudos que visam descobrir se os probióticos são capazes de modular o sistema imune, gerando benefícios ao hospedeiro, durante infecções com estes vírus. Aliado a isso, é importante ressaltar que existem poucas opções de tratamento disponíveis para as infecções causadas pelos OPVs, apesar dos impactos que as infecções causadas por estes vírus apresentam (*revisado por* KROON *et al.*, 2011).

As primeiras análises feitas a fim de avaliar a influencia exercida por *L. paracasei* ST11 frente a infecção por VACV-WR demonstraram que o tratamento utilizando o probiótico vivo foi capaz de diminuir a letalidade dos camundongos, apesar de não evitar a perda de peso quando comparado ao grupo controle não tratado, VACV/infectado (Figura 9). Essa atividade observada na taxa de sobrevivência mas não na variação de peso também foi descrita em estudos anteriores, no qual a administração de lactobacillus em camundongos infectados com *Influenza A virus* foi capaz de prevenir a letalidade, mas não foi capaz de evitar a perda de peso de forma significativa (KISO, *et al.* 2013, LEE *et al.*, 2013).

Nesse contexto, é importante destacar que a dose viral utilizada na infecção dos animais (10^6 pfu/10 μ L) foi alta, correspondendo a 100 vezes a LD50 determinada para esta amostra viral neste modelo de infecção (FERREIRA *et al.*, 2008). Nesse contexto, é possível supor que se o mesmo tratamento com o probiótico proposto neste trabalho fosse aplicado em um modelo de infecção que utilizasse amostras menos virulentas, ou uma dose viral menor, a perda de peso dos camundongos poderia ter sido evitada. Os sinais clínicos apresentados pelos camundongos infectados neste trabalho, como perda de peso, piloereção, arqueamento de dorso, balanopostite, assim como o período em que eles se manifestaram, condizem com o que foi descrito previamente para este modelo de infecção (FERREIRA *et al.*, 2008).

Analisando os resultados de variação de peso (Figura 9A) e letalidade (Figura 9B) do grupo Probiótico vivo/não infectado, demonstramos que a

ingestão diária do probiótico se mostrou segura, uma vez que nenhum sinal de reação adversa foi observado durante todo o experimento. Este fato corrobora resultados obtidos por outros trabalhos publicados que utilizaram essa mesma linhagem de probiótico em camundongos e humanos não demonstrando nenhuma reação adversa (OLIVEIRA *et al.*, 2011; SCHABUSSOVA *et al.*, 2012, WASSENBERG *et al.*, 2011).

A análise realizada a fim de investigar se a influência exercida pelo probiótico possuía uma natureza preventiva ou curativa evidenciou que não é necessário que haja uma estimulação prévia, antes da infecção, para que o probiótico exerça seus efeitos benéficos, uma vez que o grupo pré tratado vivo infectado apresentou taxa de sobrevivência, variação de peso e manifestação de sinais clínicos (Figuras 10 e 11) semelhante ao grupo controle não tratado (VACV/infectado). Dessa forma, foi demonstrado que apenas o pós-tratamento foi capaz de gerar benefícios ao hospedeiro o que evidencia que a interação entre o probiótico e o VACV é bastante peculiar, já que os demais estudos que demonstraram atividades benéficas de probióticos em outras infecções virais obtiveram sucesso nos grupos pré-tratados (KISO *et al.*, 2013; PARK *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2013). Entretanto, relatos de atividades protetoras exercidas pelo pós-tratamento utilizando lactobacilos já foi demonstrado em infecção por *Salmonella* (HIGGINS *et al.*, 2007) e *Helicobacter pylori* (GOLDMAN *et al.*, 2006).

O potencial curativo que o *L. paracasei* ST11 apresenta durante uma infecção com VACV pode ser oportuno, caso o consumo desse probiótico seja, no futuro, indicado em casos de infecções geradas por OPV, já que o paciente poderá fazer uso do probiótico apenas quando infectado. Seria interessante que no futuro fosse melhor investigado até quantos dias após a infecção o tratamento com o probiótico é eficiente, já que na maioria das vezes o indivíduo não é capaz de determinar quando a infecção ocorreu. Geralmente, o paciente só percebe que foi infectado quando surge os primeiros sintomas, que são inespecíficos e muitas vezes confundidos com outras infecções virais (TRINDADE *et al.*, 2009; SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009). Uma futura aplicação mais interessante para o pós-tratamento utilizando este probiótico seria a tentativa de minimizar as reações adversas relacionadas com a vacinação utilizando o VACV atenuado, já que assim seria possível saber exatamente quando a exposição ao vírus ocorreu.

A utilização do probiótico inativado a fim de investigar se o efeito observado era resultado da ação de algum produto proveniente do metabolismo bacteriano ou devido a presença de algum componente morfológico, revelou que o tratamento com o probiótico inativado apresentou um perfil bastante semelhante ao dos grupos tratados com o probiótico vivo (Figura 12). Além disso, não houve mudança significativa na variação de peso (Figura 12) e manifestação de sinais clínicos dos camundongos tratados com o probiótico inativado assim como para grupos tratados com o probiótico vivo, comparando com o grupo VACV/infectado (Figura 13C).

A taxa de letalidade do grupo Pós-tratado morto/infectado e do grupo Pré-tratado morto/infectado foram semelhante a apresentada pelo grupo Pós-tratado vivo/infectado e Pré-tratado vivo/infectado respectivamente (Figura 12). Diante disso, foi possível constatar que o tratamento com o probiótico inativado também gera benefícios aos camundongos infectados e que não é necessário que o probiótico esteja metabolicamente ativo para exercer sua atividade aqui demonstrada. Semelhante ao aqui observado, revelando um efeito protetor exercido por um probiótico inativado em uma infecção viral. KISO e colaboradores em 2013 demonstraram que a espécie *Lactobacillus pentosus* inativada foi capaz de reduzir a letalidade de camundongos infectados com *Influenza A virus* (KISO *et al*, 2013).

A titulação viral dos órgãos dos animais pós-tratados revelou que o pós-tratamento com o probiótico foi capaz de alterar a distribuição viral, já que os títulos de VACV no pulmão, cérebro e fígado dos camundongos do grupo Pós-tratado vivo/infectado apresentaram uma redução significativa, comparando com o grupo não tratado VACV/infectado (Figura 14).

Ferreira e colaboradores em 2008 também descreveram a distribuição viral no pulmão, cérebro, fígado, sendo os títulos obtidos de 10^8 , 10^5 , 10^3 pfu/g, respectivamente. Fazendo uma comparação com os dados citados do estudo acima com os resultados apresentados pelo grupo não tratado VACV/infectado deste trabalho, podemos notar que o título detectado no cérebro foi o mesmo nos dois estudos (10^5 pfu/g); o título no pulmão e no fígado foram menores, 10^5 e 10^2 pfu/g, respectivamente, e 10^4 pfu/g foram detectados no baço, neste trabalho.

O pulmão apresentou maior título viral que os demais órgãos analisados (Figura 14). A presença de maior título viral no pulmão pode ser

justificada pelo fato de que, o pulmão é um dos sítios primários de multiplicação viral no modelo de infecção intranasal (*revisado por DAMON, 2013*). De uma forma geral podemos inferir pelas análises dos resultados de titulação viral nos órgãos que a ação do probiótico é sistêmica e não se restringe apenas ao sítio de colonização que é o intestino. Corroborando com os dados aqui obtidos, o efeito sistêmico já foi demonstrado em estudos anteriores nos quais a ingestão diária desta mesma linhagem de probiótico foi capaz de diminuir mediadores inflamatórios e sintomas alérgicos no sistema respiratório de camundongos e de humanos (*WASSENBERG et al., 2011; SCHABUSSOVA et al., 2012; PERRIN et al., 2014*). Além disso, estes resultados evidenciam que o pós-tratamento com probiótico pode estar interferindo na disseminação viral o que pode explicar a menor letalidade verificada para este grupo (Figura 9B).

Ao analisar os resultados referentes ao grupo pós-tratado morto/infectado observamos que o tratamento com o probiótico inativado não obteve sucesso na redução da disseminação viral, já que não houve diferença significativa entre o título viral obtido pelo grupo Pós-tratado morto/infectado comparando com o grupo VACV/infectado (Figura 15). Comparando os resultados obtidos na titulação dos órgãos dos grupos tratados com probiótico vivo (Pós-tratado vivo/infectado) e morto (Pós-tratado morto/infectado), mostrado no Figura 15, é possível notar que probiótico vivo é mais eficaz na contenção da disseminação viral. Possivelmente isso se deve ao fato de que, o probiótico vivo, quando administrado por gavagem pode se multiplicar no trato gastro-intestinal, aumentando assim a concentração desta bactéria no intestino e conseqüentemente a sua atividade. Portanto, os efeitos gerados pelo probiótico inativado pelo calor, podem ser comprometidos, uma vez que o processo de inativação impede a multiplicação desse probiótico no intestino.

O título viral dos órgãos coletados em etapas iniciais da infecção (3° dp.i) mostraram que o probiótico não foi capaz de conter a disseminação viral nesta etapa precoce da infecção, já que não houve redução significativa nos títulos virais nos órgãos, em nenhum dos grupos analisados (Figura 15). Além da titulação dos órgãos no 10° d.p.i., Ferreira e colaboradores também avaliaram o título viral no pulmão no 3° d.p.i. O título no pulmão no 3° dpi foi de 10^7 pfu/g, menor que o título apresentado no 10° d.p.i. No presente trabalho também foi avaliado o título viral no pulmão no 3° d.p.i., sendo que o

título obtido foi de 10^5 pfu/g. As diferenças nos títulos virais entre os dois estudos podem ser justificadas por algumas diferenças na metodologia empregada por Ferreira e colaboradores, como o fato de que a coleta dos órgãos ocorreu no 10º d.p.i, dos camundongos serem três semanas mais jovens, e da titulação ter sido realizada em outra linhagem celular (células Vero) (FERREIRA *et al.*, 2008).

A imunomodulação tem sido apontada como o principal mecanismo pelo qual os probióticos conferem benefícios durante as infecções virais (Ivec *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2013; Kumpu *et al.*, 2013). A linhagem *L.paracasei* ST11 já demonstrou propriedades imunomoduladoras em estudos anteriores. Von der Weid e colaboradores em 2001, ao avaliarem a influência do tratamento com *L. paracasei* ST11 na indução de linfócitos T CD4 *naives in vitro*, verificaram que este probiótico inibiu fortemente a produção de citocinas mediadoras da resposta inflamatória como IL-4, IL-5 e IFN γ , além de induzir o aumento na produção de IL-10. Resultados semelhantes foram obtidos neste trabalho, já que a dosagem de IFN γ apresentou-se reduzida nos grupos pós-tratados tanto com o probiótico vivo quanto com o morto.

Oliveira e colaboradores em 2011 mostraram que a utilização de *L. paracasei* ST11 resultou em uma redução significativa na infiltração de neutrófilos e expressão das citocinas pró-inflamatórias IL1 β , IL-6, e IL12 nos camundongos tratados. Essa atividade resultou na diminuição da inflamação intestinal em um modelo experimental de colite em camundongos (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Um estudo anterior publicado no mesmo ano demonstrou que as linhagens de *L. paracasei* possuem capacidade de estimular a maturação de células dendríticas, uma vez que um experimento *in vitro* revelou que quando estas células foram incubadas com o probiótico houve aumento da expressão de receptores (CD11, CD80 e CD86) específicos de células dendríticas maduras. Os resultados mostraram também que as propriedades de modular o sistema imune de cada uma dessas linhagens são diferentes. Enquanto algumas linhagens exercem interessante papel anti-inflamatório estimulando a produção de IL-10 pelas células dendríticas, outras exercem fraco ou nenhum potencial de inibição da resposta inflamatória, quando analisadas em um mesmo sistema *in vitro* (D'ARIENZO *et al.*, 2011). Estes resultados

exemplificam a grande especificidade das atividades biológicas exercidas pelos probióticos, o que inviabiliza a comparação dos efeitos biológicos exercidos por espécies e até mesmo por linhagens diferentes de probiótico.

Como citado anteriormente a linhagem ST11 já demonstrou ser capaz de induzir uma maior expressão da citocina IL-10, uma importante citocina com um papel crucial na prevenção de patologias inflamatórias e auto-imunes (SARAIVA E O´GARRA, 2010). A indução de IL-10 não foi detectada no presente trabalho já que não houve diferença significativa nos níveis de IL-10 produzidos no pulmão dos camundongos dos diferentes grupos de tratamento analisados (Figura 19). Provavelmente esse desacordo se deve as diferenças metodológicas apresentadas entre os diferentes estudos, bem como o fato de que o aumento na expressão dessa citocina pode não ocorrer no 9 d.p.i, mas pode ocorrer em outros momentos da infecção que não foram analisados no presente trabalho.

L. paracasei ST11 é capaz de inibir sintomas inflamatórios como vasodilatação, edema, degranulação de mastócitos e produção de TNF- α , uma importante citocina ativadora da resposta inflamatória (Gueniche *et al.*, 2010). Estes dados corroboram os resultados aqui obtidos referentes a dosagem de TNF- α nos pulmões dos grupos Pós-tratado vivo/infectado, que também apresentou uma redução significativa nos níveis dessa citocina comparado ao grupo não tratado VACV/infectado (Figura 18).

A citocina IL-17 exerce importante papel no recrutamento e ativação de neutrófilos para o local da infecção e a sua produção está relacionada com diversas doenças inflamatórias, dentre elas a dermatite atópica (DARLING *et al.*, 2014). Além disso, já foi descrito que a maior produção da citocina IL-17 está associada a uma maior susceptibilidade a infecções por VACV, sendo que um estudo mostrou que essa citocina inibe a atividade das células NK, que são importantes na contenção da infecção primária com VACV (KAWAKAMI *et al.*, 2009). Outro estudo demonstrou também que a inoculação de VACV em sítios cutâneos que apresentam dermatite atópica com elevada produção de IL-17, gera lesões maiores, mais numerosas e com maior carga viral quando comparado com a inoculação em tecido cutâneo sem dermatite. Além disso, este mesmo estudo mostrou que o tratamento com anticorpos anti-IL17 foi capaz de diminuir a tamanho, o número e a carga viral das lesões geradas pela infecção em camundongos (OYOSHI *et al.*, 2009).

Nesse estudo, foi demonstrado uma redução nos níveis da citocina IL-17 no grupo Pós-tratado com probiótico vivo comparado ao grupo não tratado VACV/infectado (Figura 17). Além disso, observamos ainda que o mesmo grupo que obteve menor expressão de IL-17 no pulmão (Pós-tratado vivo/Infectado) obteve também menor letalidade (Figura 9B) e título viral nos órgãos (Figura 14). Estes dados corroboram estudos anteriores citados acima que associam o aumento dessa citocina com a piora no prognóstico de infecções com VACV (KAWAKAMI *et al.*, 2009; OYOSHI *et al.*, 2009; DARLING *et al.*, 2014). O fato do pós-tratamento com o probiótico ser capaz de diminuir a produção de IL-17, pode ser uma das razões pela qual este tratamento consegue reduzir a letalidade e a disseminação viral em camundongos infectados com VACV.

A produção de IFN é uma importante resposta da imunidade inata frente às infecções virais. Isto tem sido demonstrado de diferentes maneiras, seja na atividade antiviral direta dos IFNs em cultura de células, ou a reduzida capacidade dos animais com deficiências genéticas na produção de IFNs em resistir às infecções virais, e no fato dos vírus produzirem inúmeras proteínas destinadas a antagonizar ou inibir a ação dos IFNs (*revisado por* BORDEN *et al.*, 2007). Os IFNs tipo I (IFN α/β) e II (IFN γ) apresentam não só atividade antiviral, mas também de indução a resposta imune adaptativa. O IFN γ particularmente, é um potente estimulador da resposta do tipo Th1, sendo esta resposta fundamental na eliminação dos vírus em diversas infecções. O IFN tipo III (IFN λ) é biologicamente bastante similar aos IFN tipo I, porém possuem receptores celulares distintos (*revisado por* BORDEN *et al.*, 2007).

Os resultados apresentados nesse estudo corroboram os dados obtidos por Bartlett e colaboradores, em que foi demonstrado que o aumento na expressão de IFN tipo III protegeu os camundongos dos sinais clínicos característicos de uma infecção intranasal com VACV. Além disso, no 7° d.p.i, o aumento da expressão de IFN tipo III, promoveu a redução nos níveis de IFN γ no lavado bronco-alveolar dos camundongos, a diminuição do título viral no pulmão e o bloqueio da disseminação viral para o cérebro (BARTLETT *et al.*, 2005). No presente estudo o grupo Pós-tratado vivo/infectado também apresentou um aumento na expressão dos IFNs do tipo III. A manutenção dos níveis de produção dessa citocina pode ter contribuído para redução da letalidade (Figura 9B), dos títulos virais no pulmão, cérebro e fígado (Figura

14), além de uma redução significativa da expressão de IFN γ no pulmão (Figura 16).

Apesar do fato de que a produção de IFN γ exerce importante papel na eliminação do VACV durante a infecção (Xu *et al*, 2004), houve uma redução na produção desta citocina no pulmão dos grupos pós-tratados, que apresentaram melhores prognósticos (Figura 16). É importante considerar o fato de que é possível que a produção de IFN γ tenha sido maior em uma fase mais precoce da infecção, porém é menos estimulada, no 9º d.p.i. Este menor estímulo para produção de IFN γ , pode ser devido a manutenção da atividade antiviral, mediada pelo aumento dos IFN tipo I e III, apresentada no grupo pós-tratado. Assim, essa atividade antiviral pode ser responsável por uma maior contenção da infecção, o que diminui a necessidade de uma intensa atividade inflamatória, mediada por IFN- γ .

A atividade antiviral apresentada pelos grupos pós-tratados é mediada pela produção de IFN tipo I (Figura 20 e 21) e III (Figura 22), no pulmão do grupo pós-tratado com o probiótico vivo comparado com o grupo controle não tratado (VACV/infectado). Além disso, a dosagem dos ISGs, OAS (Figura 23) e PKR (Figura 24), mostra que expressão dos genes induzidos por IFNs, que codificam as proteínas que de fato exercem as funções antivirais, é significativamente maior no grupo Pós-tratado vivo/infectado.

A redução nos títulos virais apresentada no pulmão, cérebro e fígado dos camundongos do grupo pós-tratado vivo pode estar relacionado com o fato de que neste grupo foi detectado a expressão de IFN tipo I e III, bem como dos ISGs. O grupo pós-tratado com probiótico morto não apresentou aumento significativo na produção de IFN β (Figura 21), IFN λ (Figura 22) e PKR (Figura 24), o que pode explicar a menor eficiência deste tratamento em inibir a disseminação viral (Figura 15).

As análises histológicas também mostraram que os grupos pós-tratados com probiótico apresentaram pulmões menos inflamados com lesões mais brandas e com menor comprometimento alveolar comparado ao grupo controle não tratado (VACV/Infectado) (Figura 25). Os resultados observados nas análises histológicas para o grupo VACV/Infectado estão de acordo com os achados de Ferreira e colaboradores, 2008, que também mostraram que a infecção intranasal com VACV-WR gera um quadro de pneumonia grave com danos teciduais no pulmão de camundongos Balb/C.

A redução da letalidade parece estar associada principalmente a redução da atividade inflamatória no pulmão, mediada pela citocina IFN- γ . A exacerbação da resposta inflamatória durante a infecção com VACV resulta em danos teciduais graves no pulmão como mostrado pelas análises histológicas (Figura 25). A expressão da citocina IFN- γ sofreu redução significativa no pulmão dos grupos pós-tratados tanto com o probiótico vivo, quanto com probiótico morto, sendo que ambos apresentaram também menor letalidade (Figura 12 e 16).

Apesar do fato de que a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-17, também demonstrarem redução no grupo Pós-tratado vivo/infectado, o mesmo não ocorreu no grupo Pós-tratado com probiótico morto, sendo que a redução da inflamação pulmonar e da letalidade em ambos os grupos foi semelhante. Esses resultados evidenciaram que estes efeitos observados não estão diretamente relacionados com a redução dessas citocinas.

Assim, a análise da expressão das citocinas revelaram que o tratamento com *L.paracasei* após a infecção com VACV induziu uma diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- γ , associado a manutenção da atividade antiviral, mediada pelos IFN- α , IFN- β e IFN- λ . Em conjunto, esses processos imunomoduladores resultam num panorama desfavorável a geração de uma resposta inflamatória danosa como a que ocorre na ausência do tratamento com o probiótico.

Os mecanismos pelos quais esse probiótico é capaz de regular de forma seletiva os mediadores inflamatórios e antivirais no pulmão dos camundongos durante a infecção com VACV ainda precisam ser elucidados. Entretanto, é provável que este probiótico esteja exercendo seus efeitos por meio da indução da maturação das células dendríticas, já que estas células são capazes de interagir com a microbiota intestinal (THAISS *et al.*, 2014). Além disso, já foi demonstrado que esta linhagem de probiótico é capaz de modular o padrão de citocinas produzido por essas células (CHRISTENSEN *et al.*, 2002; MILETI *et al.*, 2009; D'ARIENZO *et al.*, 2011).

Este trabalho, portanto, descreve pela primeira vez efeitos imunomoduladores que o probiótico *L.paracasei* exerce durante uma infecção com VACV. Em conjunto, demonstramos que os efeitos gerados pela ingestão diária deste probiótico resultaram na redução da disseminação viral,

atenuação do processo inflamatório pulmonar, bem como na diminuição da letalidade dos camundongos infectados. A elucidação dos mecanismos utilizados por esse probiótico durante a infecção com VACV, pode contribuir na busca por tratamentos alternativos que possam minimizar os danos causados por essas infecções. Além disso, esse trabalho abre portas para o estudo das interações entre OPV e probióticos, apresentando uma proposta inicial no que se refere a um modelo experimental para esses estudos, uma vez que foi realizado utilizando o protótipo do gênero além de se tratar do primeiro estudo envolvendo probióticos e OPV.

VIII- CONCLUSÕES

- O probiótico *L. paracasei ST11* foi capaz de influenciar de forma benéfica o curso da infecção intranasal por VACV em camundongos Balb/C.
- O pós-tratamento com o *L. paracasei ST11* vivo e inativado reduziu a letalidade dos camundongos infectados com VACV.
- O probiótico *L.paracasei ST11* apresenta uma atividade curativa e não preventiva, já que a tratamento com esse probiótico antes da infecção não gerou benefícios aos camundongos infectados com VACV.
- O pós-tratamento com probiótico vivo foi capaz de inibir a disseminação viral, já que reduziu os títulos do VACV no pulmão, cérebro e fígado.
- A expressão da citocina pró-inflamatória IFN- γ foi inibida nos pulmões dos camundongos pós-tratados com o *L.paracasei ST11*. Esta inibição parece estar associada a menor atividade inflamatória pulmonar.
- A expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-17 também foram inibidas no pulmão dos camundongos pós-tratados com o *L.paracasei ST11* vivo.
- Em paralelo a diminuição da expressão das citocinas pró-inflamatórias, o tratamento com *L.paracasei ST11* manteve a atividade antiviral, mediada pela expressão de IFN- α 2 e OAS nos grupos pós-tratados com probiótico vivo e morto e de IFN- β , IFN- λ 2/3 e PKR no grupo pós-tratado com probiótico vivo.
- A inibição da disseminação viral do grupo pós-tratado vivo pode estar relacionada com a expressão de IFN tipo I e III, bem como dos ISGs. O grupo pós-tratado com probiótico morto não apresentou aumento significativo na produção de IFN β , IFN λ e PKR, o que pode explicar a menor eficiência deste tratamento em inibir a disseminação viral.

- Análises histológicas mostraram que o pós-tratamento resultou na geração de menor atividade inflamatória no pulmão e lesões de menor gravidade, comparado com o grupo não tratado.
- A redução da letalidade nos grupos pós-tratados pode estar associada a uma menor atividade inflamatória pulmonar e desenvolvimento de lesões pulmonares, devido a menor expressão de citocinas inflamatórias, principalmente IFN- γ , associada a manutenção da resposta antiviral mediada por IFN tipo I e III.

IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABRAHÃO, J.S., GUEDES, M.I.M., et al. One More Piece in 10 the VACV Ecological Puzzle: Could Peridomestic Rodents Be the Link between Wildlife and Bovine Vaccinia Outbreaks in Brazil?. *Plos one*, v. 4, Is.10, p. 1-7, 2009a.

ABRAHÃO, J.S., OLIVEIRA, T.M., et al. Bovine vaccinia outbreaks: detection and isolation of vaccinia virus in milk samples. *Foodborne Pathog Dis.* v.6, n.9, p.1141-6, 2009b.

ABRAHÃO, J.S., TRINDADE, G. S., et al. Long-lasting stability of Vaccinia virus strains in murine feces: implications for virus circulation and environmental maintenance. *Arch Virol.* v.8, n.8, p.89-90, 2009c.

ALLEN, S. J., MARTINEZ, E. G., et al. Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Sao Paulo Medical Journal*, v.129, n.3, 2011.

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

AMANTANA, A., CHEN, Y., TYAVANAGIMATT, S.R., et al. Pharmacokinetics and Interspecies Allometric Scaling of ST-246, an Oral Antiviral Therapeutic for Treatment of Orthopoxvirus Infection. *Plos one*, v.8, n.4, p.1-10, 2013.

ANDREW, M. E., B. E. COUPAR e D. B. BOYLE. Humoral and cell-mediated immune responses to recombinant vaccinia viruses in mice. *Immunol Cell Biol*, v.67, p.331-7,1989.

ASSIS, F. L., BORGES, I. A., FERREIRA, P. C. P., et al. Group 2 Vaccinia Virus, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.18, n.12, 2012.

ASSIS, F. L., BORGES, I. A., MESQUITA, V. S., et al. Vaccinia Virus in Household Environment during Bovine Vaccinia Outbreak, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.19, n.12, 2013b.

ASSIS, F. L., VINHOTE, W. M., BARBOSA, J. D., et al. Reemergence of *Vaccinia virus* during Zoonotic Outbreak, Pará State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.19, n.12, 2013a.

BAKARI, M.; ABOUD, S.; NILSSON, C.; FRANCIS, J. Broad and potent immune responses to a low dose intradermal HIV-1 DNA boosted with HIV-1 recombinant MVA among healthy adults in Tanzania. *Vaccine*, v.29, n.46, p.8417-8428, 2011.

BART, T., DEANNA; L., BENTLEY J.; ANDERSON, K. W; et al. Evaluation of imiquimod for topical treatment of vaccinia virus cutaneous infections in immunosuppressed hairless mice. *Antiviral Research*, v. 90, n.3, p.126-133, 2011.

BARTLETT, N. W., BUTTIGIEG, K., KOTENKO, S. V., SMITH, J.L. Murine interferon lambdas (type III interferons) exhibit potent antiviral activity in vivo in a poxvirus infection model. *Journal of General Virology*, v.86, p.1589–1596, 2005.

BENGALI, Z., SATHESHKUMAR, P. S., MOSS, B. Orthopoxvirus species and strain differences in cell entry. *Virology*, v.433, p.506–512, 2012.

BERHANU, A., D.S. KING, S. MOSIER, R. JORDAN, K.F. JONES, D.E. HRUBY, D.W. GROSENBACH. ST-246 inhibits in vivo poxvirus dissemination, virus shedding, and systemic disease manifestation. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.53,p. 4999–5009, 2009.

BHANUPRAKASH, V., G. VENKATESAN, V. BALAMURUGAN, M., et al. Zoonotic infections of buffalopox in India. *Zoonoses Public Health*, v.57, p. 149–155, 2010.

BORDEN, E.C.; SEN, G.C.; UZE, G.; SILVERMAN, R.H.; RANSOHOFF, R.M.; FOSTER, G.R.; STARK, G.R. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nature reviews. Drug discovery*, Inglaterra, v.6, n.12, p. 975–90, 2007.

BOYER M, MADOU, M.A. Phylogenetic and Phyletic Studies of Informational Genes in Genomes Highlight Existence of a 4th Domain of Life Including Giant Viruses. *PLoS ONE*, v 5, n 12, 2010.

BRATKE, K. A., MCLYSAGHT, A., ROTHENBURG, S. A survey of host range genes in poxvirus genomes. *Infection, Genetics and Evolution*, v.14, p.406–425, 2013.

BREITBACH, C.J., BURKE, J., JONKER, D., STEPHENSON, J., et al. Diagnosis and management of smallpox. *N Engl J Med*. v.346, n.17, p.1300-8, 2002.

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

BRONSON e PARKER, J. *Bacteriol.*, v.41, n.1, p.56-57, 1941.

BROYLES, S.S., et al. Vaccinia virus transcription. *J Gen Virol*. v 84, p.2293-2303, 2003.

BRUNETTI, C. R. ; PAULOSE-MURPHY, M. ; SINGH, R, et al. A secreted high-affinity inhibitor of human TNF from Tanapox virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.100, n.8, p.4831-6, 2003.

BUCK, J. D., CLEVERDON, R. C. The spread plate as a method for the enumeration of marine bacteria. *Limnology and Oceanography*, n.5, p.78-80, 1960.

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

BULLER, R. M. & PALUMBO, G. J.. Poxvirus pathogenesis. *Microbiol Rev*, v.55, n.1, Mar, p.80-122, 1991.

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

BURNS, J., EVGIN, L., DE SILVA, N., CVANCIC, S., et al. Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature*, v.477, p.99-102, 2011.

BURSHTYN, D. NK cells and poxvirus infection. *Frontiers in immunology*, v.4 p. 1-9, 2013.

CAMPOS, M.A.S., KROON, E.G. Critical period of irreversible block of VACV replication. *Review Microbiology*, v.28, n.2, p.474-83, 1993.

CHA, M., LEE, D. Antiviral activity of Bifidobacterium adolescentis SPM1005-A on human papillomavirus type 16. *BMC Medicine*, v. 10, n.72, p. 1-6, 2012.

CHAUDHRI, G., V. PANCHANATHAN, R. M. BULLER, A., et al. Polarized type 1 cytokine response and cell-mediated immunity determine genetic resistance to mousepox. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.101, n.24, p.9057-62, 2004.

CORAS, B., S. ESSBAUER, M. PFEFFER, H. MEYER, J. SCHRODER, W. STOLZ, M. LANDTHALER e T. VOGT. Cowpox and a cat. *Lancet*, v.365, n.9457, p.446, 2005.

CORRÊA, N.B., PÉRET-FILHO, L.A., PENNA, F.J., et al. A randomized formula controlled trial of Bifidobacterium lactis and Streptococcus thermophilus for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v. 39, p.385-9, 2005.

CYRKLAFF M, RISCO C, et al. Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.9, n.2, p.420, 2005.

D'ANUNCIAÇÃO, L., GUEDES, M. I. M., OLIVEIRA, T. L., et al. Filling One More Gap: Experimental Evidence of Horizontal Transmission of Vaccinia Virus Between Bovines and Rodents. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, v.12, n.1, 2012.

DAMASO, C.R., ESPOSITO, J.J., et al. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo vírus may derive from brasilian smallpox vaccine. *Virology*. v.277, n.2, p.439-49, 2000.

DAMON, I.K. Poxviruses. In: Knipe DM , Howley PM, editors, *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 2947–75, 2013.

DARLING, A.R., FREYSCHMIDT, E.J., BURTON, O.T., et al. IL-10 suppresses IL-17-mediated dermal inflammation and reduces the systemic burden of Vaccinia virus in a mouse model of eczema vaccinatum. *Clinical Immunology*, v.150, n.2, p.153-160, 2014.

DAY, S.L., RAMSHAW, I.A., et al. Differential effects of the type I interferons α 4, β , and ϵ on antiviral activity and vaccine efficacy. *J Immunol*. v.180, n.11, p.7158-66, 2008.

DE CLERCQ, E., HOLY, A., ROSENBERG, I., et al. A novel selective broad-spectrum anti-DNA virus agent. *Nature*, v.323, p.464–467, 1986.

DE CLERCQ, E. Historical Perspectives in the Development of Antiviral Agents Against Poxviruses. *Viruses*, v.2, p.1322-1339, 2002.

DI GIULIO, D.B., ECKBURG, P.B. Human monkeypox: an emerging zoonosis. *Lancet Infect. Dis.*, v.4, p.15–25, 2004.

DOCEUL V, HOLLINSHEAD M, et al. Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread. *Science*, v.327, n.87, p.873-6, 2010.

DONATELE, D.M., TRAVASSOS, C.E.P.F., et al, Epidemiologia da poxvirose bovina no Estado do Espírito Santo, Brasil. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci*, v. 44, n.4, p. 275-282, 2007.

DRUMOND, B.P. Sequenciamento e análise das regiões terminais invertidas e repetidas e de genes relacionados ao tropismo e virulência de amostras brasileiras de Vaccinia virus e da amostra vacinal lister butantan. Tese de Doutorado. Departamento de Microbiologia-ICB-UFMG. 2007.

DRUMOND, B.P., LEITE, J.A., DA FONSECA, F.G., BONJARDIM, C.A., FERREIRA, P.C., et al. Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. *Microbes Infect* , v.10, p.185–197, 2008.

DURAFFOUR, S., MERTENS, B., MEYER, H. Emergence of cowpox: study of the virulence of clinical strains and evaluation of antivirals. *PLoS ONE*, v.8, n.2, p. 1-8, 2013.

DUNIHO, S. M., JEFFRY, M., FORSTER, S., CASCIO, M. B., MORAN, T.S., CARPIN, L.B., SCIUTO, A. M. Acute Changes in Lung Histopathology and

Bronchoalveolar Lavage Parameters in Mice Exposed to the Choking Agent Gas Phosgene. *Toxicologic pathology*, v.30, n.3, p. 339–349, 2002.

ENGLER, R. J. M., KENNER, J., LEUNG, D. Y. M. Smallpox vaccination: Risk considerations for patients with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.110, n.3, p.357-365, 2002.

ESSBAUER, S., MEYER, H., *et al.* Long-lasting stability of vaccinia virus (orthopoxvirus) in food and environmental samples. *Zoonoses Public Health*. v.54, n.3, p.118-24, 2007.

ESTEBAN, D. J. e BULLER, R.M. Ectromelia virus: the causative agent of mousepox. *J Gen Virol*, v.86, n.10, p.2645-59, 2005.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization / World Health Organization. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London, Ontario, Canada. 11p. April 30 and May 1, 2002.

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

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

FENNER, F., WITTEK, R., *et al.* The Ortopoxviruses. 1^a ed. Academic Press. San Diego, Califórnia, 1989.

FENNER, R., HENDERSON, D.A., JEKEK, A.Z e LADNYI, I.D. Smallpox and Its Eradication. Geneva: World Health Organization, 1988.

FERREIRA, J.M., DRUMOND, B.P. *et al.* Virulence in murine model shows the existence of two distinct populations of Brazilian Vaccinia virus strains. *PLoS One*, v.26, n.3, p.3043-50, 2008.

FERRIER-REMBERT, A., R. DRILLIEN, J. N. TOURNIER, D. GARIN e J. M. CRANCE. Intranasal cowpox virus infection of the mouse as a model for preclinical evaluation of smallpox vaccines. *Vaccine*, v.25, n.25, p.4809-17, 2007.

FOO, C. H, LOU, H., WHITBECK, J. C., PONCE-DE-LEÓN, M. Vaccinia virus L1 binds to cell surfaces and blocks virus entry independently of glycosaminoglycans. *Virology*, v.385, p.368–382, 2009.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 66, p. 365-378, 1989.

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

GOODBOURN, S.; DIDCOCK, L.; RANDALL, R.E. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *The Journal of general virology, Inglaterra*, v. 81, n. 10, p. 2341-64, 2000.

GOLDMAN, C. G., BARRADO, D A., BALCARCE, N.,et al. Effect of a probiotic food as an adjuvant to triple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* infection in children. *Nutrition*, v.22, n.10, p.984–988, 2006.

GROSENBACH, D.W., BERHANU, A., KING, D.S. et al. Efficacy of ST-246 versus lethal poxvirus challenge in immunodeficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.107, p. 838–843, 2010.

GUBSER C, HUE S, et al. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol*. v.85, n.1, p.105-17, 2004.

GUEDES, M. I. M. C., REHFELD, I. S., OLIVEIRA, T. M. L., et al. Detection of Vaccinia Virus in Blood and Faeces of Experimentally Infected Cows. *Transboundary and Emerging Diseases*, v.60, p.552–555, 2013.

GUÉNICHE, A.; BENYACOUB, J.; PHILIPPE, D. et al. *Lactobacillus paracasei* CNCM I- 2116 (ST11) inhibits substance P-induced skin inflammation and accelerates skin barrier function recovery *in vitro*. *European Journal of Dermatology*, v. 20, n. 6, p. 731-737, 2010.

HALLER, S. L., PENG, C., MCFADDEN, G., ROTHENBURG, S. Poxviruses and the evolution of host range and virulence. *Infection, genetics and evolution*, v. 21, p. 15-40, 2014

HAMMARLUND, E.; LEWIS, M. W.; HANSEN, S. G.; STRELOW, L. I.; NELSON, J. A.; SEXTON, G. J.; et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nature Medicine*, v.9, n.9, p.1131-37, 2003.

HAYASAKA, D., F. A. ENNIS e M. TERAJIMA. Pathogenesis of respiratory infections with virulent and attenuated vaccinia viruses. *Virology*, v.4, p.22. 2007.

HEMMI, H. T. KAISHO, O. TAKEUCHI, S. SATO, H. SANJO, K. HOSHINO, T. HORIUCHI, H. TOMIZAWA, K. TAKEDA, S. AKIRA. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.*, v.3, p. 196–200, 2002.

HENDERSON, D. A. Smallpox as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *Jama*, v.281, n.22, p.2127-37, 1999.

HENDERSON DA & MOSS B. Smallpox and vaccinia in vaccines. PLOTKIN, S.A. & ORESTEIN, W.A. 3rd ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia, PA-USA, 74-97, 1999.

Higgins, J. P., Higgins, S. E., Vicente, J. L. et al. Temporal Effects of Lactic Acid Bacteria Probiotic Culture on Salmonella in Neonatal Broilers. *Poultry Science*, v.86, p.1662–1666, 2007.

HRUBY D., JORDAN, R. An orally bioavailable antipoxvirus compound (ST-246) inhibits extracellular virus formation and protects mice from lethal orthopoxvirus challenge. *J. Virol.*, v.79, p.13139–13149, 2015.

HUGHES, A. L., FRIEDMAN, R. Poxvirus genome evolution by gene gain and loss. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.35, p.186–195, 2005.

HUGHES, A. L., IRAUSQUIN, S., FRIEDMAN, R. The evolutionary biology of poxviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, v.10, p. 50–59, 2010.

IBNOU-ZEKRI, N., BLUM S., SCHIFFRIN, E. J., et al. Divergent Patterns of Colonization and Immune Response Elicited from Two Intestinal Lactobacillus Strains That Display Similar Properties In Vitro. *Infection and Immunity*, v. 71, n.1, p. 428–436, 2003.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV) 2014. The big picture Book of Viruses: Poxviridae (<http://www.ncbi.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>).

ISAACS, A.; LINDENMANN, J. VIRUS interference. I. The interferon. Proceedings. Biological sciences / The Royal Society, Inglaterra, v.147, n. 927. p.258-67, 1957.

IVEC, M., TANJA, B., KOREN, S. Interactions of macrophages with probiotic bacteria lead to increased antiviral response against vesicular stomatitis virus. *Antiviral Research*, v.75, p. 266–274, 2007.

JACKSON, R. J.; RAMSAY, A. J.; CHRISTENSEN, C. D.; BEATON, S.; HALL, D. F.; RAMSHAW, A. A. Expression of Mouse Interleukin-4 by a Recombinant Ectromelia Virus Suppresses Cytolytic Lymphocyte Responses and Overcomes Genetic Resistance to Mousepox. *Journal of Virology*, v.75, n.3, p.1205–1210, 2001.

JACOBS, B. L., LANGLAND, J. O., KIBLER, K. V., et al. Vaccinia virus vaccines: Past, present and future. *Antiviral Research*, v.84, p.1–13, 2009.

JACOBS, N., R. A. CHEN, C. GUBSER, P. NAJARRO e G. L. SMITH. Intradermal immune response after infection with Vaccinia virus. *J Gen Virol*, v.87, n.5, p.1157-61, 2006.

JOHNSTON, J.B., MCFADDEN, G. Poxvirus immunomodulatory strategies: current perspectives. *J Virol*, v.77, n.11, p.6093-100, 2003.

JOHNSTON JB, MCFADDEN G. Technical knockout: understanding poxvirus pathogenesis by selectively deleting viral immunomodulatory genes. *Cell Microbiol.*, v.6, n.8, p.695-705, 2004.

JOKLIK W. K. The purification of four strains of poxvirus. *Virology*, v.18, n.56, p.9-18, 1962.

KAEVER, T., MENG, X, MATHO, M.H., et al. Potent neutralization of vaccinia virus by divergent murine antibodies targeting a common site of vulnerability in L1 protein. *Journal of Virology*, v.88, n.19, p.11339-13355, 2014.

KASSAA, A. I., HOBER, D., HAMZE, M., CHIHIB, N. E., DRIDER, D. Antiviral Potential of Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins. *Probiotics & Antimicro. Prot.* v.6, p.177–185, 2014.

KAWAKAMI, Y., TOMIMORI, Y., YUMOTO, K., et al. Inhibition of NK cell activity by IL-17 allows vaccinia virus to induce severe skin lesions in a mouse model of eczema vaccinatum. *The Journal of Experimental Medicine*, v.206, n.6, p.1219-1225, 2009.

KECKLER, M. S., REYNOLDS, M.G., DAMON, I.K., et al. The effects of post-exposure smallpox vaccination on clinical disease presentation: Addressing the data gaps between historical epidemiology and modern surrogate model data *Vaccine*, v. 31, p.5192–5201, 2013.

KHANI, S.; HOSSEINI, H. M.; TAHERI, M. et al. Probiotics as an alternative strategy for prevention and treatment of human diseases: a review. *Inflammation & Allergy -Drug Targets*, v. 11, 5 p. 79-89, 2012.

KISO, M., TAKANO, R., SAKABE, S. Protective efficacy of orally administered, heat-killed *Lactobacillus pentosus* b240 against influenza A virus. *Scientific reports*, v.3, p.1-8, 2013.

KLIGLER, B., COHRSEN, A. Probiotics. *American Family Physician*, v.78, n. 9, p.1073-1078, 2008.

KROON, E.G., MOTA, B.E., et al. Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: From field to therapy. *Antiviral Research*, v 92 p 150–163, 2011.

KUMPU, M., LIISA, L., MERJA, R., et al. The Use of the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and Viral Findings in the Nasopharynx of Children Attending Day Care. *Journal of Medical Virology*, v. 85, p.1632–1638, 2013.

LANIER, R., TROST, L., TIPPIN, T., et al. Development of CMX001 for the Treatment of Poxvirus Infections. *Viruses*, v.2, p. 2740–2762, 2010.

LAROCQUE, L.; BLIU, A.; XU, R.; DIRESS, A.; WANG, J.; LIN, R.; HE, R.; GIRARD, M.; LI, X. Bioactivity Determination of Native and Variant Forms of

Therapeutic Interferons. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, E.U.A., v. 2011, p. 1-11, 2011.

LEE, Y., YOUN, H., et al. Sublingual administration of *Lactobacillus rhamnosus* affects respiratory immune responses and facilitates protection against influenza virus infection in mice. *Antiviral Research*, v.98, p.284–290, 2013a.

LEE, D. K., KANG, J. Y., SHIN, H. S. Antiviral activity of *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212 against Hepatitis B virus. *Arch. Pharm. Res.*, v. 36, p. 1525–1532, 2013 b.

LEHTORANTA, L, KALIMA, K. Specific probiotics and virological findings in symptomatic conscripts attending military service in Finland. *Journal of Clinical Virology*, p.1-6, 2014.

LEITE J.A., DRUMOND B.P., et al. Passatempo virus: A novel VACV isolated during a zoonotic outbreak in Brazil. *Emerging Infections Disease*, v.11, n.12, p.1935- 8, 2005.

LEVY, D.E.; MARIÉ, I.J; DURBIN, J.E. Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. *Current opinion in virology*, v. 1, n. 6, p. 476-86, 2011.

LEW, L.; LIONG, M. Bioactives from probiotics for dermal health: functions and benefits. *Journal of Applied Microbiology*, v. 12137, p.1-13, 2013.

LEY, R. E., PETERSON, D. A. & GORDON, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, v.124, p. 837–848, 2006.

LILLEY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, v. 147, p. 747-748, 1965.

LIVAK K.J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*, v.25, n.4, p.402-8, 2001.

LOBATO ZIP, TRINDADE GS, *et al.* Surto de vaccínia bovina causada pelo vírus Vaccinia na região da Zona da Mata Mineira. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.32, n.54, p.45-52, 2005.

LUOTO, R., RUUSKANEN, O., MATTI, W., *et al.* Prebiotic and probiotic supplementation prevents rhinovirus infections in preterm infants: A randomized, placebo-controlled trial. *Journal Allergy Clinical Immunology*, v.1, p. 1-9, 2013.

MAIBORODA , A. D. Experimental infection of Norwegian rats (*Rattus norvegicus*) with ratpox virus. *Acta Virol.* v.2, n.65, p.106-9, 1982.

MARAGKOUDAKIS, A. P., CHINGWARU, W., *et al.* Lactic acid bacteria efficiently protect human and animal intestinal epithelial and immune cells from enteric virus infection. *International Journal of Food Microbiology*, v.141, p.91–97, 2010.

MARQUES, M. L., NOGUEIRA, L. C., MENDES, A. S., *et al.* Araçatuba virus: a vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle. *Emerg Infect Dis*, v. 9, p. 155 – 160. 2003.

MARTINS, F.S.; BARBOSA, F.H.F. ; NICOLI, J.R. . O probiótico *Saccharomyces boulardii*. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 9, p. 1-12, 2009.

MARTINS, F. S.; DALMASSO, G.; ARANTES, R. M. *et al.* Interaction of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection. *PLoS One*, v. 5, p. 8925, 2010.

MARTINS, F. S.; ELIAN, S. D. A.; VIEIRA, A. T. *et al.* Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. *International Journal of Medical Microbiology*, v.301, p. 359-364, 2011.

MCFADDEN, G. Poxvirus Tropism. *Nature Reviews*, v.3, n.3, p.201-13, 2005.

MCFARLAND, L. V., DUBLIN, S. Meta-analysis of probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome. *World Journal of Gastroenterology*, v.14, n.17, p. 2650-2661, 2008.

MCLENNAN AG. Decapitation: poxvirus makes RNA lose its head. *Trends Biochemical Science*. v.32, n.7, p.297-9, 2007.

MEDAGLIA ML, PESSOA LC, *et al.* Spread of cantagalo virus to northern Brazil. *Emerg Infect Dis*. v.15, n.7, p.1142-3, 2009.

MEGID J, APPOLINÁRIO CM, *et al.* Vaccinia virus in humans and cattle in southwest region of Sao Paulo state, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. v.79, n.5, p.646, 2008.

MERCER, J., KNÉBEL, S., SCHMIDT, F. I., CROUSE, J. Vaccinia virus strains use distinct forms of macropinocytosis for host-cell entry. *PNAS*, v.107, n. 20, 2010.

MESEDA, C. A., GARCIA, A. D., KUMAR, A., *et al.* Enhanced immunogenicity and protective effect conferred by vaccination with combinations of modified vaccinia virus Ankara and licensed smallpox vaccine Dryvax in a mouse model. *Virology*, v.339, n.2, p.164-75, 2005.

MOSS, B. Poxviridae: The Viruses and Their Replication. *Fields Virology*, 5th Edition. v. 2, c. 22, p. 2906 – 45, 2007.

MOSS, B. Poxviridae: The viruses and their replication in FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. & GRIFFIN, D.E. *Fields virology*, 4th ed (Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins), 2001.

MOSS, B. Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology*, v.344, n.1, p.48-54, 2006.

MUCKER, E. M.; GOFF, A. J.; SHAMBLIN, J. D.; *et al.* Efficacy of Tecovirimat (ST-246) in Nonhuman Primates Infected with Variola Virus (Smallpox). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n.12. p.6246–6253, 2013.

MURGUÍA-PENICHE, T., WALTER, A., et al. Intestinal Mucosal Defense System, Part 2. Probiotics and Prebiotics. *The Journal of Pediatrics*, v. 162, n. 3, p. 64-71, 2013.

NARAYAN, S. S.; JALGAONKAR, S.; SHAHANI, S. Probiotics: current 5 trends in the treatment of diarrhoea. *Hong Kong Medical Journal*, v. 16, p. 213-218, 2010.

NETHERTON, C.L., SIMPSON, J., HALLER, O., WILEMAN, T.E., et al. Inhibition of a large double-stranded DNA virus by MxA protein, *Journal of virology*, E.U.A., v. 83, n. 5, p. 2310-20, 2009.

NEWMAN, F.K., FREY, S.E., BLEVINS, T.P., et al. Improved assay to detect neutralizing antibody following vaccination with diluted or undiluted vaccinia (Dryvax)vaccine. *J Clin Microbiol*, v.41, n.7, p. 3154-7, 2003.

NEYTS, J. P. LEYSSEN, E., VERBEKEN, E., DE CLERCQ, E. Efficacy of cidofovir in a murine model of disseminated progressive vaccinia. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.48, p. 2267–2273, 2004.

OLIVEIRA, D. B., ASSIS, F. L., FERREIRA, P. C. P. Short Report: Group 1 Vaccinia virus Zoonotic Outbreak in Maranhão State, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.89, n.6, p. 1142–1145, 2013.

OLIVEIRA, G. P., FERNANDES, A. T. S., ASSIS, F. L., et al. Short Report: Intrafamilial Transmission of Vaccinia virus during a Bovine Vaccinia Outbreak in Brazil: A New Insight in Viral Transmission Chain. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 90, n. 6, p. 1021–1023, 2014.

OLIVEIRA, M., BOSCO, N., PERRUISSEAU, G., et al. *Lactobacillus paracasei* Reduces Intestinal Inflammation in Adoptive Transfer Mouse Model of Experimental Colitis. *Clinical and Developmental Immunology*, v.11, p.1-13, 2011.

OYOSHI, MK ; ELKHAL, A ; KUMAR, L., et al. Vaccinia virus inoculation in sites of allergic skin inflammation elicits a vigorous cutaneous IL-17 response *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of Ame*, v.106, n.35, p.14954-14959, 2009.

PARK, M., VU, N. G. O., KWON, Y., LEE, Y. *Lactobacillus plantarum* DK119 as a Probiotic Confers Protection against Influenza Virus by Modulating Innate Immunity. *Plos One*, v. 8, p. 1-10, 2013.

PARKER, S., HANDLEY, L., BULLER, R. M. Therapeutic and prophylactic drugs to treat orthopoxvirus infections. *Future Virol.*, v.3, p. 595–612, 2008.

PERRIN, Y., NUTTEN, S., AUDRAN, R., BERGER, B. et al. Comparison of two oral probiotic preparations in a randomized crossover trial highlights a potentially beneficial effect of *Lactobacillus paracasei* NCC2461 in patients with allergic rhinitis. *Clinical and Translational Allergy*, v.4, n.1, p.1-12, 2014.

PRICHARD, M.N.; KERN, E. R. Orthopoxvirus targets for the development of new antiviral agents. *Antiviral Research*, v.94, n.2, p.111-125, 2012.

QIN, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, v.464, p.59–65, 2010.

QUENELLE, D.C., D.J. COLLINS, E.R. KERN. Cutaneous infections of mice with vaccinia or cowpox viruses and efficacy of cidofovir. *Antiviral Res.*, v.63, p. 33–40, 2004.

READING, P. C. e G. L. SMITH. Vaccinia virus interleukin-18-binding protein promotes virulence by reducing gamma interferon production and natural killer and T-cell activity. *J Virol*, v.77, n.18, p.9960-8, 2003.

RITCHIE, M.L., ROMANUK, T. N. A Meta-Analysis of Probiotic Efficacy for Gastrointestinal Diseases. *PLoS One*, v.7, n.4, p. 1-11, 2012.

RIVETTI, A. V., GUEDES, M. I. M. C., REHFELD, I. S. Bovine vaccinia, a systemic infection: Evidence of fecal shedding, viremia and detection in lymphoid organs. *Veterinary Microbiology*, v.162, p.103–111, 2013.

ROBERTS, K. L., SMITH, G. L. Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Cell Trends in Microbiology*, v.16, n.10, 2008.

SARAIVA, M., O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, v. 10, p.170-181, 2010.

SARKAR JK, MITRA AC, *et al.* Virus excretion in smallpox. 2. Excretion in the throats of household contacts. *Bull World Health Organ*, v.48, n.5, p.523-7, 1973.

SAZAWAL S, HIREMATH G, DHINGRA U, MALIK P, DEB S, BLACK RE. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebocontrolled trials. *Lancet Infectious Disease*, v.6 n. 6, p.374-382, 2006.

SCHABUSSOVA, I., HUFNAGL, K., TANG. M. L. K., *et al.* Perinatal Maternal Administration of *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 Prevents Allergic Inflammation in a Mouse Model of Birch Pollen Allergy. *Plos One*, v.7, n.7, p.1-10, 2012.

STEFAN, R. H., WILFRIED, V., LOTHAR, H. W., *et al.* Timely approaches to identify probiotic species of the genus *Lactobacillus*. *Gut Pathogens*, v.5, p.27, 2013.

STEVENSON, N.J., MURPHY, A.G., BOURKE, N.M., *et al.* Ribavirin enhances IFN- α signalling and MxA expression: a novel immune modulation mechanism during treatment of HCV. *PLoS ONE*, v. 6, n. 11, p.266-278, 2011.

SAMARAJIWA, S.A.; FORSTER, S.; AUCHETTL, K.; HERTZOG, P.J. Interferome: the database of interferon regulated genes. *Nucleic Acids Research*, v. 37, p. 852-57, 2009.

SCHATZMAYR, H.G., ROMJIN, P.C., *et al.* An outbreak of vesicopustular disease in humans and dairy cattle in the state of Rio de Janeiro in 2006. *Virus Reviews & Research*, v 10 p 61-3, 2005.

SCHATZMAYR, H.G., COSTA, R.V.C., *et al.* Human and animal infections by vaccinia-like viruses in the state of Rio de Janeiro: A novel expanding zoonosis. *Vaccine*, v.29, n.4, p.65-9, 2011.

SCHMIDT, F. I., BLECK, C. K. E., MERCER, J. Poxvirus host cell entry. *Current Opinion in Virology*, v. 2, p.20–27, 2012.

SEN, G.C. Viruses and interferons. *Annual Review of Microbiology*, v. 55, p. 255-81, 2001.

SHORT, J.A.L. Viral evasion of interferon stimulated genes. *Bioscience Horizons*, v. 2, n. 2, p. 212-24, 2009.

SILVA-FERNANDES, A., TRAVASSOS, C.E., *et al.* Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. *J Clin Virol*, v.44, n.4, p.308-13, 2009.

SIMONETTI, B.R., *et al.* Animal infections by vaccinia-like viruses in the State of Rio de Janeiro: 1- northwestern region. *Virus Reviews & Research*, v.12, n.1, p. 32-6, 2007.

SMITH, G. L., CAMILLA T. O. B., MOTES, C. M. *et al.* *Vaccinia virus* immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. *Journal of General Virology*, v. 94, p.2367–2392, 2013.

SMITH GL, MCFADDEN G. Smallpox: anything to declare? *Nat Rev Immunol*, v.2, n.7, p.521-7, 2002.

SMITH, G. L., MURPHY, B. J., LAW, M. *Vaccinia virus* motility. *Annual Review Microbiology*, v.57, p.323–342, 2003.

SMITH, S. K., SELF, J., WEISS, S. *et al.* Effective Antiviral Treatment of Systemic Orthopoxvirus Disease: ST-246 Treatment of Prairie Dogs Infected with Monkeypox Virus. *Journal of virology*, v.85, n.17, p. 9176–9187, 2011.

SMITH G. L, VANDERPLASSCHEN A., *et al.* The formation and function of extracellular enveloped VACV. *Journal of General Virology*, v.86, n.5, p.1279-90, 2002.

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

SMOKVINA,T., WELS, M., POLKA, J. *et al.* *Lactobacillus paracasei* Comparative Genomics: Towards Species Pan-Genome Definition and Exploitation of Diversity. *Plos One*, v.8, n.7, p. 1-18, 2013.

STEFE, C.A., ALVES, M.I.R., RIBEIRO, R.L. Probióticos, prebióticos e simbióticos: artigo de revisão. *Saúde & Ambiente em Revista*, v.3, p.16-33, 2008.

THAISS, C. A.; LEVY, M.; SUEZ, J.; ELINAV, E. The interplay between the innate immune system and the microbiota. *Current Opinion in Immunology*, v.26, p.41-48, 2014.

THOMAS, C., MORAGA, I., LEVIN, D., et al. Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by type I interferons. *Cell*, v. 146, n. 4, p. 621–32, 2011.

TRINDADE GS, DRUMOND BP, et al. Zoonotic vaccinia virus infection in Brazil: clinical description and implications for health professionals. *J Clin Microbiol.*, v.45, n.4, p.1370-2, 2007.

TRINDADE GS, DA FONSECA FG, et al. Araçatuba virus, a vaccinia-like virus associated with infections in humans and cattle. *Emerg Infect Dis.* v.9, n.2, p.155-60, 2003.

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

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

VASILJEVIC, T., SHAH, N.P. Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, v.18, p.714– 728, 2008.

VIEIRA, L.Q.; OLIVEIRA, M.R.; NEUMANN, E. and NICOLI, J.R. Parasitic infections in germfree animals. *Braz J Med Biol Res.* v.31, n.1, p. 105-110, 1998.

VLASOVA, N. A., KULDEEP, S., CHATTHA, S. K. Lactobacilli and *Bifidobacteria* Promote Immune Homeostasis by Modulating Innate Immune Responses to Human Rotavirus in Neonatal Gnotobiotic Pigs. *Plos One*, v. 8, p.1-14, 2013.

VON DER WEID, T., BULLIARD, C., SCHIFFRIN, E. J. Induction by a Lactic Acid Bacterium of a Population of CD41 T Cells with Low Proliferative Capacity That Produce Transforming Growth Factor b and Interleukin-10. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, v.8, n. 4, p. 695–701, 2001.

VORA S, DAMON I, et al. Severe eczema vaccinatum in a household contact of a smallpox vaccine. *J. Clin Infect Dis.*, v.15, n.54, p.1555-61, 2008.

WASSENBERG, J., NUTTEN, S., AUDRAN, R. et al. Effect of *Lactobacillus paracasei* ST11 on a nasal provocation test with grass pollen in allergic rhinitis. *Clinical & Experimental Allergy*, v.41, p.565–573, 2011.

WILLIAMSON, J. D., R. W. REITH, L. J. JEFFREY, J. R. ARRAND e MACKETT, M. Biological characterization of recombinant vaccinia viruses in mice infected by the respiratory route. *J Gen Virol*, v.71, p.2761-7, 1990.

WHITBECK, J. C., CHWAN-HONG, F., LEON, M. P., EISENBERG, R. J., COHEN, G. H. Vaccinia virus exhibits cell-type-dependent entry characteristics. *Virology*, v.385, p.383–391, 2009.

YANG, G., PEVEAR, D. C., DAVIES, M. H., et al. Effect of Probiotics on the Treatment of Children with Atopic Dermatitis. *Ann Dermatol Venereol*, v. 24, n. 2, 2012.

XU, R.; JOHNSON, A. J.; LIGGITT, D.; BEVAN, M. J. Cellular and humoral immunity against vaccinia virus infection of mice. *The Journal of Immunology*, v.172, p.626571, 2004.

ZUCCOTTI, G.V.; MENEGHIN, F.; RAIMONDI, C. et al. Probiotics in clinical practice: 10 an overview. *The Journal of International Medical Research*, v. 36, p. 1-53, 2008.

ANEXOS

1) Participação em eventos científicos durante a realização do Mestrado:

I Simpósio de Microbiologia da UFMG – A microbiologia e a sociedade. Belo Horizonte, 01 e 02 de setembro de 2014.

XXV Congresso Brasileiro de Virologia & IX Encontro de Virologia do Mercosul. Ribeirão Preto, 28 de setembro a 01 de outubro de 2014.

2) Trabalhos apresentados em eventos científicos durante a realização do Mestrado:

ANDRADE, A. C. S. P., LIMA, M. T., OLIVEIRA, G. P., CALIXTO, R. S., MARTINS, F. S., KROON, E. G, FERREIRA, J.M.S., ABRAHÃO, J. S. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA EXERCIDA POR MICRORGANISMO PROBIÓTICO DURANTE INFECÇÃO PELO Vaccinia virus. In: I SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG, 2014, Belo Horizonte.

ANDRADE, A. C. S. P., OLIVEIRA, G. P., LIMA, M. T., CALIXTO, R. S., MARTINS, F. S., FERREIRA, J.M.S., KROON, E. G, ABRAHÃO, J. S. EVALUATION OF THE INFLUENCE EXERCISED BY A MICROORGANISM PROBIOTIC DURING VACCINIA VIRUS INFECTION BALB/C MICE In: XXV Brazilian Congress of Virology & IX Mercosur Meeting of Virology (XXV CBV), 2014, Ribeirão Preto.

LIMA, M. T., ANDRADE, A. C. S. P., CALIXTO, R. S., OLIVEIRA, G. P., MARTINS, F. S., KROON, E. G, ABRAHÃO, J. S. EVALUATION OF INFLUENCE FROM NORMAL MICROBIOTA ON VACCINIA VIRUS INFECTION IN GNOTOBIOTICS AND CONVENTIONALS SWISS MICE BY TWO DIFFERENT INOCULATION FORMS. In: XXV Brazilian Congress of Virology & IX Mercosur Meeting of Virology (XXV CBV), 2014, Ribeirão Preto.

LIMA, M. T., ANDRADE, A. C. S. P., CALIXTO, R. S., OLIVEIRA, G. P., MARTINS, F. S., KROON, E. G, ABRAHÃO, J. S. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA NORMAL NA INFECÇÃO INTRANASAL COM Vaccinia virus EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS. In: I SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG, 2014, Belo Horizonte.

3) Disciplinas cursadas durante o mestrado

Período	Nome da atividade	Frequência	Nota	Conceito	Créditos
2014/1	TOP. ESP. EM MICROBIOLOGIA	S	92	A	03
2014/1	BIOLOGIA MOLECULAR DE MICROORGANISMOS	S	90	A	03
2014/1	BIOSSEGURANCA E BIOETICA	S	97	A	02
2014/2	TOPICOS ESPECIAIS EM VIROLOGIA I	S	90	A	10
2014/2	ECOLOGIA MICROBIANA DO TRATO DIGESTIVO	S	100	A	02
2014/2	TREINAMENTO DIDATICO EM MICROBIOLOGIA I	S	100	A	02
2014/2	A IMUNIDADE INATA A INFEC. MICROBIANAS	S	90	A	04
2014/2	ANTIMICROBIANOS	S	93	A	02
2015/1	SEMINARIOS EM MICROBIOLOGIA	S	100	A	02

4) Artigos completos submetidos em periódicos indexados