

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia

POXVIRUS E SUA UTILIZAÇÃO COMO FERRAMENTA BIOTECNOLÓGICA

LEANDRO CIESIELSKI VIDA

E037

Belo Horizonte

2008

LEANDRO CIESIELSKI VIDA

POXVIRUS E SUA UTILIZAÇÃO COMO FERRAMENTA BIOTECNOLÓGICA

Monografia apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do Título de Especialista em Microbiologia.

Orientação: Professor Dr. Flavio Guimarães da Fonseca
Laboratório de Virologia Comparada

E037

UFMG

2008

RESUMO

Os Poxvirus são complexos vírus DNA capazes de multiplicação no citoplasma das células de hospedeiros. Estes vírus são envelopados com forma ovóide ou de tijolo, cujas dimensões podem variar entre 220-450nm X 140-260nm. Dentre os vírus de mais destaque da família *Poxviridae* pode-se citar o *Variola virus*, responsável por milhões de mortes ao curso de mais de três mil anos de história. E também o *Vaccinia virus* (VV) que foi utilizado em uma campanha de vacinação global que resultou na erradicação da varíola em 1980. Coincidentemente, este ano marca o início da utilização do VV como vetor de expressão, diversas características destes vírus são vantajosas neste tipo de estratégia como: A simplicidade dos métodos de construção e manipulação genéticos baseados no fenômeno de recombinação homóloga; O tropismo celular a capacidade de suportar a inserção de enormes quantidades de DNA exógeno; A expressão de proteínas recombinantes ocorre naturalmente no citoplasma e as proteínas resultantes são biologicamente ativas; A síntese protéica ocorre em níveis relativamente altos; E o vírus vaccínia é contido dentro de padrões de bio-segurança de nível 2. Estas vantagens têm levado a geração e teste de vacinas utilizando vetores que expressam genes de antígenos de vírus, bactérias, parasitas patogênicos e até mesmo tumores. A existência de vetores não replicativos, como Vaccinia Ankara Modificado (MVA), NYVAC e *Avipoxvirus*, vem a aumentar a segurança das vacinas utilizando poxvírus como vetores. Também tem se utilizado estes vetores na geração de bibliotecas genômicas e na tecnologia de fermentação. A soma das características intrínsecas a estes vetores e o sucesso obtido até o momento em suas aplicações apontam para um futuro promissor, e até mesmo a geração de um novo paradigma em técnicas de vacinação.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	I
RESUMO	III
1. A FAMÍLIA <i>POXVIRIDAE</i>	4
1.1. Morfologia dos poxvírus	6
1.2. Estrutura do Genoma dos poxvírus	7
2. CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DOS POXVÍRUS	9
2.1 Adsorção	9
2.2 Penetração e Desnudamento	10
2.3 Expressão de Genes Virais	11
2.4 Replicação do Genoma	12
2.5 Morfogênese	13
2.6 Liberação	13
3. INTERAÇÃO VÍRUS-HOSPEDEIRO	16
3.1 Patogênese	16
3.2 Resposta imune do hospedeiro	17
4. HISTÓRICO DE VACINAÇÃO	20
5. POXVÍRUS COMO VETORES	23
5.1 Histórico de Poxvírus como vetores	23
5.2 Utilização de Poxvírus como vetores	23
5.3 Mecanismos para Produção de Vetores	25
5.4 Vetores para biblioteca genômica	28
5.5 Vetores atenuados e não replicativos	30
5.6 Vetores na terapia contra o câncer	34
5.7 Poxvirus como vetores Vacinais	37

5.7.1 Vacinas de uso veterinário	37
5.7.2 Vetores vacinais e doenças infecciosas humanas	39
6. BIBLIOGRAFIA	44

LISTA DE ABREVIATURAS

kpb	Mil pares de bases
DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido ribonucléico
IMV	Vírus maduro intracelular
EEV	Vírus envelopado extracelular
ITR's	Repetições terminais invertidas
ORFs	Janela aberta de leitura
VV	<i>Vaccinia virus</i>
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
MV	Vírus Myxoma
mRNA	RNA mensageiro
OH	Hidroxila
IV	Vírus imaturo
CEV	Vírus extracelular associado à célula
IEV	Vírus envelopado intracelular
ERGIC	Compartimento Intermediário entre o Retículo Endoplasmático e o Complexo de Golgi
ATI	corpúsculos de inclusão
DC	Células dendríticas
IL-12	Interleucina 12
TNF α	Fator de necrose tumoral
IFN	Interferon
IL-4	Interleucina 4
VIG	Imunoglobulina contra <i>Vaccinia virus</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
CDC	Centro de Controle de Doenças
<i>tk</i>	gene da Timidina Kinase
CTLs	linfócitos T citotóxicos
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
FPV	<i>Fowlpox Virus</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
CTLTE	CTLs Tumor Específicos
CEF	Fibroblastos Embrionários De Frango
MVA	vaccinia Ankara modificado
WR	<i>Western reserve</i>
AAT	Antígenos Associados a Tumores
CEA	antígeno carcioembriônico

GM-CSF	Fator de Estimulação de Colônia de Granulócitos e Macrófagos
VGF	Fator de Crescimento do Vaccinia
VRG	Vaccinia-Raiva Recombinante
NDV	Vírus da Doença de Newcastle
PRV	Vírus da Pseudorraiva
FelV	vírus da leucemia felina
SARS-CoV	coronavírus da síndrome respiratória aguda grave
SARS-CoV S	proteína "Spike" de SARS-CoV
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
SIV	vírus da imunodeficiência símia

1. A FAMÍLIA *POXVIRIDAE*

Os maiores e mais complexos vírus DNA, que infectam células de hospedeiros animais, estão compreendidos na família *Poxviridae*. Eles são capazes de multiplicação no citoplasma das células de hospedeiros, sendo estes tanto vertebrados quanto invertebrados. Estes vírus se caracterizam como grandes vírus envelopados com forma ovóide ou de tijolo, cujas dimensões podem variar entre 220-450nm X 140-260nm. Possuem genoma composto de uma molécula de Ácido desoxirribonucléico (DNA) dupla fita linear que varia de 130 a 300 kpb, sendo que, as extremidades encontram-se covalentemente unidas em alça (ESPY *et al.*, 2002; MOSS, 2001).

A família se divide em duas subfamílias, a subfamília dos vírus que infectam invertebrados é denominada *Entomopoxvirinae*. Os membros desta subfamília são encontrados em insetos das ordens Diptera, Coleoptera, Orthoptera e Lepidoptera e apresentam os maiores genomas da família (MOSS, 2001). Esta subfamília é muito divergente geneticamente, o que pode ser apontado como indício de que foi a primeira a divergir (GUBSER *et al.*, 2004). Já os vírus que infectam vertebrados são agrupados como *Chordopoxvirinae*, e se subdividem em oito gêneros: *Parapoxvírus*, que contém, dentre outros, os vírus *Orf* e *Pseudocowpox*; gênero *Avipoxvírus*, que contém alguns vírus aviários como *Fowlpox* e *Canarypox*; gênero *Capripoxvírus*, contendo vírus de animais ungulados que podem ser transmitidos por artrópodes; gênero *Leporipoxvírus*, contendo vírus de esquilos e coelhos como *Myxoma vírus*; gênero *Suipoxvírus*, que contém vírus de suínos com estreito espectro de hospedeiro; *Molluscipoxvírus*, que contém o vírus *Molluscum contagiosum*, que infecta seres humanos causando displasias celulares; gênero *Yatapoxvírus*, que contém vírus de roedores e primatas e, por último, o gênero *Orthopoxvírus*, que contém vírus que infectam humanos, animais de interesse veterinário e animais silvestres, sendo também o gênero protótipo da família e portanto, o mais profundamente estudado e conhecido (BÜCHEN-OSMOND, 2003).

Os membros de um gênero são agrupados conforme suas similaridades antigênicas, genéticas e morfológicas (FENNER, 2000). No entanto, nota-se que vírus de espectro restrito, como o *Variola vírus*, são encontrados agrupados no

mesmo gênero que vírus de amplo espectro de hospedeiros, como os *Vaccinia virus* e *Cowpox virus*. Pouco se sabe sobre os mecanismos que governam esta especificidade. Porém, acredita-se hoje que o tropismo dos poxvírus em nível celular é determinado por eventos intracelulares que ocorrem após à adsorção e penetração dos vírus. Isto contrasta com o que é observado para a maioria dos outros vírus, nos quais disponibilidade de receptores celulares específicos é o fator determinante do tropismo viral (McFADDEN, 2005). Apesar desta característica, a família *Poxviridae* apresenta apenas duas espécies que são patógenos humanos específicos, o *Variola virus* (gênero *Orthopoxvirus*) e o *Molluscum contagiosum virus* (gênero *Molluscipoxivirus*), porém três outras espécies de *Orthopoxvirus* – *Monkeypox virus*, *Cowpox virus* e *Vaccinia virus* - também podem vir a causar doença em humanos (MOSS, 2001; TRINDADE *et al*, 2003).

1.1. Morfologia dos poxvírus

As partículas virais maduras intracelulares (IMV) dos poxvírus apresentam forma ovóide ou de tijolo, e medem em torno de 200 a 320 nm, aproximando-se do limite de definição do microscópio óptico (BULLER & PALUMBO, 1991). Ao microscópio eletrônico, pode ser observado um envelope externo, circundando um cerne na forma de disco ovalado, bicôncavo e envolto por uma camada composta de pequenas subunidades protéicas cilíndricas, denominada paliçada. Nas concavidades do cerne, encontramos estruturas de natureza protéica (devido à sensibilidade ao tratamento com tripsina) denominadas corpúsculos laterais. Estas estruturas são heterogêneas, sem nenhuma forma definida (CYRKLAFF *et al*, 2005). No interior do cerne encontra-se o DNA viral complexado a quatro grandes polipeptídios em uma estrutura denominada nucleossoma, dada sua semelhança àquelas encontradas nas células de eucariotos, além de enzimas virais (SODEIK & KRIJNSE-LOCKER, 2002; MALKIN *et al.*, 2003 e CYRKLAFF *et al*, 2005). Já as partículas extracelulares (EEV) possuem um envelope lipídico adicional, também adquirido da célula hospedeira e que dão a esta forma certas características únicas em relação ao IMV, tais como maior resistência à neutralização por anticorpos e à ação do sistema complemento (revisado por SMITH & LAW, 2004).

1.2. Estrutura do Genoma dos poxvírus

Os poxvírus apresentam um genoma composto por uma molécula de DNA dupla fita que varia de 130 Kpb (parapoxivírus) a 300 Kpb (avipoxivírus) que é unido por alças de fita simples em suas extremidades. Todos os poxvírus possuem seqüências denominadas ITR's (*inverted terminal repetitions* – repetições terminais invertidas). Estas seqüências são idênticas, porém orientadas em sentidos diferentes nas extremidades do genoma. As ITR's das duas fitas de DNA são ligadas covalentemente formando alças de fita simples, ricas em adenina e timina, denominadas alças terminais. A região, de cerca de 100pb, adjacente às alças é altamente conservada e contém seqüências necessárias para a formação dos concatêmeros durante replicação do DNA e um conjunto de pequenas seqüências repetidas em *tandem* (revisado por MOSS, 2001).

Os genes da região central do genoma são geralmente conservados entre todos os poxvírus. Estes genes estão relacionados a funções essenciais, como replicação do DNA, transcrição, enzimas e proteínas estruturais (Revisado por SMITH & McFADDEN, 2002 e por SEET & JOHNSTON, 2003). Nas porções terminais do genoma existem regiões que codificam genes que estão envolvidos na interação com o hospedeiro e que, em sua maioria, não são essenciais para a multiplicação do vírus em cultivo celular. Estudos demonstram que estas regiões sofrem freqüentes rearranjos genéticos como duplicação de genes, transposição e provavelmente transferência horizontal de genes do hospedeiro, tais como os análogos de citocinas e quimiocinas e seus receptores solúveis (MOSS, 2001 e HUGHES & FRIEDMAN, 2005). Desta forma, estas regiões possuem importância na co-evolução destes vírus com seus hospedeiros, uma vez que lhes permitem codificar uma gama de proteínas para evasão da resposta imune destes, auxiliando na sua disseminação dentro do organismo e na sua dispersão no ambiente natural (GUBSER *et al*, 2004).

É importante ressaltar que a expressão gênica nos poxvírus é regulada temporalmente, sendo a replicação do DNA o marco que divide as fases precoces e tardias. Diferentes promotores e fatores virais e celulares são utilizados para se

alcançar esta divisão temporal e otimizar a produção da progênie viral (revisado por BROYLES, 2003).

As ORFs (*open reading frame* – janela aberta de leitura) dos *orthopoxvírus* são nomeadas de acordo com a sua localização no perfil de restrição obtido após a digestão do genoma com a enzima de restrição *HindIII*, com a sua posição e com o sentido da leitura do gene. Cada ORF é denominada pela letra do fragmento gerado pela digestão com *HindIII* em que se localiza, seguida do número da ORF e da letra L ou R, dependendo do sentido da leitura do gene, para esquerda ou direita, respectivamente (exemplo - B5R: quinta ORF no fragmento B do perfil de restrição *HindIII*, codificado na fita *plus* – leitura orientada para a direita) (MOSS, 2001).

2. CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DOS POXVÍRUS

O ciclo de multiplicação dos poxvírus é bastante complexo devido à existência de várias formas infecciosas e possui uma peculiaridade dentre os vírus DNA de animais, pois ocorre inteiramente no citoplasma, característica compartilhada apenas com a família *Asfarviridae*. O ciclo necessita de apenas de alguns fatores de transcrição do núcleo celular para otimização da transcrição dos genes virais. De fato, a multiplicação destes vírus já foi observada em células anucleadas (revisado por MOSS, 2001). A duração do ciclo de multiplicação pode variar de acordo com o vírus e a célula infectada. Por exemplo, para o VV a duração do ciclo de multiplicação varia de 12 a 24 horas em células de linhagem contínua derivadas de rim de macaco verde (Vero). As informações que se seguem são relativas ao ciclo de multiplicação do *Vaccinia virus*, porém, uma vez que este é o vírus protótipo da família, refletem também os mecanismos que ocorrem durante o ciclo de multiplicação da grande maioria dos poxvírus (MOSS, 2001 e revisado por SODEIK & KRIJNSE-LOCKER, 2002).

2.1 Adsorção

Assim como acontece para outros vírus, a infecção dos poxvírus inicia-se com a adsorção da partícula viral à superfície celular. Porém, os poxvírus diferem da maioria dos vírus por não possuírem um ligante único específico de interação com receptores celulares. Desta forma, a possibilidade de utilização de diferentes receptores, bem como a existência de duas formas infectivas com topologias distintas, IMV e EEV, tornam difícil o entendimento do processo de ligação dos poxvírus às células hospedeiras. Sendo assim, hoje se sabe que as formas IMV e EEV ligam-se a diferentes receptores, isto devido à presença de diferentes proteínas em suas superfícies. No entanto, a natureza destes receptores continua pouco conhecida (Revisado por SMITH & MURPHY, 2003).

Estudos, demonstrando que o VV se ligaria ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e que o vírus Myxoma (MV) utilizaria receptores de quimiocinas, foram refutados (MOSS, 2001; revisado por SMITH & MURPHY, 2003). Trabalhos mais recentes demonstraram que proteínas de superfície do IMV têm

capacidade de interação com a célula através da ligação à glicosaminoglicanos (GAGs) da superfície celular. As proteínas H3L e A27L se ligam a sulfato de heparina, enquanto a proteína D8L se liga a sulfato de condroitina (Revisado por CHUNG *et al.*, 2005). Porém, CARTER e colaboradores (2005) demonstraram que ligação de IMV à GAGs ocorre de maneira célula-específica e não é essencial para a penetração viral. Para o EEV, quatro proteínas distintas codificadas pelo vírus (A33R, A34R, A56R e B5R) estão presentes na superfície do vírus, contudo, ainda não foi demonstrada interação física entre proteínas específicas do EEV e antígenos de superfície celular (Revisado por SMITH & MURPHY, 2003).

2.2 Penetração e Desnudamento

Muitos mecanismos de penetração vêm sendo propostos para poxvírus, isto ocorre em decorrência da falta de um consenso a respeito do número de membranas lipídicas que envolvem as formas infectivas dos poxvírus (Revisado por SODEIK & KRIJNSE-LOCKER, 2002 e por SMITH & MURPHY, 2003). Porém, assumindo-se que a partícula de IMV possui apenas uma membrana lipídica, um simples processo de fusão de membranas seria capaz de explicar sua penetração (SMITH & MURPHY, 2003). Esta hipótese parece ser correta, uma vez que CARTER e colaboradores (2005) demonstraram de maneira clara, através de microscopia eletrônica e análise de inclinação seriada, que esta partícula possui apenas uma membrana lipídica e que sua penetração se dá pela fusão desta com a membrana celular. Estudos recentes apontam para participação das proteínas de superfície de IMV A28, A21, H2 e L5 neste processo fusogênico (revisado por MOSS, 2006).

No entanto, para a forma EEV, o mecanismo de penetração não seria tão simples, devido ao fato de que mesmo que se assuma que o IMV possua realmente apenas uma membrana, o EEV ainda seria envolvido por uma segunda membrana. LAW e colaboradores (2006) demonstraram que a forma EEV tem seu envelope mais externo rompido em uma reação não-fusogênica dependente da ligação com poliânions presentes na superfície celular. A dissolução do envelope mais externo seria dependente das proteínas A34 e B5. Tal dissolução permitiria a liberação de uma forma IMV na superfície celular, que penetraria por fusão através do mecanismo descrito por CARTER e colaboradores (2005).

Independentemente do modo exato de entrada do vírus na célula, o resultado final do processo é a liberação do cerne viral, contendo o genoma do vírus e enzimas associadas no citoplasma (MALLARDO *et al.*, 2002). Após este processo, o cerne é degradado, o que é denominado de desnudamento secundário. Uma vez que o uso de inibidores transcricionais e traducionais interrompe o ciclo de multiplicação dos poxvírus nesta etapa, torna-se aparente que ela é dependente de uma proteína viral ou de alguma proteína celular induzida pelo vírus (revisado por MOSS, 2001). Acredita-se que durante esse processo, o genoma permanece inserido no cerne até que ocorra a síntese das proteínas precoces, necessárias para induzir a liberação do DNA viral. Após o desnudamento do cerne, o DNA se associa com a membrana do retículo endoplasmático rugoso, formando um sitio de replicação para onde proteínas precoces envolvidas na síntese de DNA são recrutadas (MALLARDO *et al.*, 2002).

2.3 Expressão de Genes Virais

Como ressaltado anteriormente, existe um controle da expressão gênica em poxvírus que atua através de um mecanismo em cascata e ocorre na etapa de iniciação da transcrição. Neste mecanismo, os fatores transcricionais de uma etapa são transcritos pela anterior gerando um controle temporal, desta forma os fatores transcricionais necessários para a expressão dos genes intermediários são codificados por genes precoces; já os fatores necessários para a expressão de genes tardios são, por sua vez, produtos de genes intermediários, e aqueles fatores responsáveis pela transcrição de genes precoces são produtos de genes tardios, que são encapsidados no interior da partícula viral para serem utilizados no próximo ciclo de multiplicação (BALDICK *et al.*, 1992; MOSS, 2001; revisado por CONDIT & NILES, 2002 e por BROYLES, 2003). No entanto, deve se lembrar da existência de genes virais que são expressos durante todo o tempo da infecção. Geralmente, isto ocorre devido ao fato destes genes, geralmente possuírem um arranjo de promotores precoces e intermediários ou tardios em *tandem*, a montante de uma ORF (MOSS, 2001 e BROYLES, 2003).

Aproximadamente metade dos genes virais conhecidos corresponde a genes precoces. Eles codificam para proteínas relacionadas a diversos processos como a biossíntese de nucleotídeos, evasão imune, replicação do DNA, fatores de

crescimento e transcrição dos genes intermediários (CONDIT & NILES, 2002 e BROYLES, 2003). Embora existam outros, somente alguns genes do VV pertencentes à classe dos genes intermediários, foram identificados. Estes são os genes A1L, A2L, e G8R, que codificam para os fatores transcricionais tardios, I8R, que codifica para a RNA helicase NPH II, I3L, que codifica para uma proteína de ligação a DNA fita simples e que interage com a ribonucleotídeo redutase e o gene K2L, que codifica para uma proteína pertencente à superfamília dos inibidores de serina proteases. Estes dois últimos genes também possuem promotores precoces e são expressos durante o início da infecção. Os genes tardios codificam a maioria dos polipeptídeos estruturais, enzimas e fatores de transcrição precoces que farão parte da partícula viral e correspondem, praticamente, à outra metade dos genes virais (revisado por MOSS, 2001).

2.4 Replicação do Genoma

A replicação do DNA viral ocorre entre 2 e 3 horas após infecção, dependendo do vírus, multiplicidade de infecção e do tipo de célula hospedeira (MOSS, 2001). Ela ocorre exclusivamente no citoplasma em regiões granulares, eletrodensas denominadas “fábricas virais” ou virossomos. Acredita-se que estas fábricas sejam derivadas de membranas e organelas celulares (MAKLIN *et al.*, 2003). Sendo assim, este processo parece ser independente do núcleo celular e a maioria (se não todas) as proteínas necessárias à replicação do DNA viral são codificadas pelo vírus. Ao contrário do completo sistema de transcrição dos mRNAs precoces que faz parte da partícula viral, as proteínas envolvidas na replicação do DNA são sintetizadas nos estágios precoces da infecção, no entanto, algumas destas proteínas podem fazer parte da partícula viral. A princípio, proteínas celulares necessárias à síntese de DNA viral poderiam ser recrutadas do núcleo, embora nenhuma tenha ainda sido encontrada (FENNER, 1989 e MOSS, 2001).

A replicação do DNA viral inicia-se com um corte em um sítio específico no DNA parental em uma ou ambas as regiões das ITR do genoma. Isto é, considerando-se que um corte ocorra em uma ou ambas as alças da fita, é produzido um iniciador com uma extremidade 3'-OH livre. É importante lembrar, no entanto, que esta etapa inicial jamais foi demonstrada experimentalmente, e nenhuma enzima envolvida no

processo de quebra inicial do DNA foi identificada. Em seguida, as alças terminais são desfeitas e extremidades 3' OH expostas servirão como iniciadores para a fita complementar. O DNA recém sintetizado volta a se dobrar através do pareamento das ITRs, formando novas alças, dando continuidade à replicação da fita-nascente, formando então moléculas concatêmeras que serão posteriormente clivadas em moléculas maduras de DNA, as quais serão, posteriormente, empacotadas nas novas partículas virais (Revisado por MOSS, 2001). Este processo resulta na geração de aproximadamente 10000 cópias do genoma viral por célula, porém, destas apenas a metade será empacotada nas partículas virais durante a morfogênese (FENNER, 1989).

2.5 Morfogênese

A morfogênese ou montagem dos poxvírus começa 5 a 6 horas após a infecção. Durante a morfogênese pode-se observar a formação de diversas estruturas: vírus crescentes, vírus imaturo (IVs), vírus maduro intracelular (IMV), vírus envelopado intracelular (IEV), vírus extracelular associado à célula (CEV) e finalmente o vírus envelopado extracelular (EEV) (MOSS, 2001 e SMITH & McFADDEN, 2002). Neste processo a primeira estrutura visível são estruturas circunscritas, em forma de lua crescente, constituídas de proteínas virais e lipídios do hospedeiro. Essas estruturas contêm espículas ligadas em sua superfície convexa e se estendem para formar vírions imaturos esféricos (IV). Embora as partículas dos IV contenham o genoma viral, elas não são infecciosas. Os IVs maturam a IMVs através de várias clivagens das proteínas do capsídeo viral, o que promove condensação do cerne viral e garante a forma característica de tijolo da forma IMV (Revisado por SODEIK & LOCKER, 2002, por SMITH & McFADDEN, 2002 e por SMITH & MURPHY, 2003).

2.6 Liberação

A partícula IMV representa a maioria da progênie infecciosa de cada célula, porém só são liberadas da célula em caso de lise. Devido a sua alta resistência no ambiente, estas partículas virais desempenham um papel importante na transmissão entre hospedeiros. O número de membranas que circundam uma partícula IMV ainda é discutido, porém um estudo de CARTER e colaboradores (2005) indica fortemente que a hipótese da existência de uma membrana única esteja correta. Esta

membrana teria sua origem em vesículas oriundas do compartimento intermediário entre o Retículo Endoplasmático e o Complexo de Golgi (ERGIC) (Revisado por SODEIK & LOCKER, 2002 e por SMITH & MURPHY, 2003).

Uma parte dos IMVs deixa as fábricas virais transportada por microtúbulos e são envolvidos por duas membranas intracelulares derivadas do complexo *trans*-Golgi ou de endossomos, formando os IEVs. Esta membrana lipídica adicional torna as partículas virais envelopadas menos sensíveis a ação do complemento e de anticorpos, devido à presença de proteínas específicas do CEV/EEV, virais e celulares (Revisado por SMITH & McFADDEN, 2002). Os IEVs são ativamente transportados pelo citoesqueleto, novamente envolvendo microtúbulos, devido à interação entre a proteína viral de envelope A36 com kinesinas celulares. Ao alcançar a membrana celular, a membrana mais externa dos IEVs se funde com esta, expondo no meio extracelular os vírus envelopados. As partículas que permanecem na superfície celular são chamadas CEVs e, quando liberados no meio extracelular, são denominados EEVs (revisado por WARD 2005). A exposição de formas CEV na superfície celular permite a interação de proteínas virais de envelope com um receptor celular desconhecido. Esta interação leva ao recrutamento de um complexo de proteínas celulares (NEWSOME *et al.*, 2004) que induz a formação de filamentos de actina que direcionam o vírus às células vizinhas. Os CEVs importantes são para a propagação célula-célula em monocamada celular, isto é devido à propulsão fornecida pela cauda de actina que fornece um eficiente mecanismo para este tipo de propagação (revisado por JOHNSON & HUBER, 2002). Devido à maior resistência à eliminação pelo sistema imune, os EEV's são importantes para a disseminação do vírus dentro do hospedeiro ao permitirem disseminação do vírus para células distantes (MOSS, 2001; Revisado por SMITH & McFADDEN, 2002 e por SMITH & MURPHY, 2003). Os IMVs, que não são convertidos em IEV, CEV ou EEV, podem permanecer no citoplasma da célula como partículas livres ou ficarem retidos dentro de corpúsculos de inclusão (ATI), que são estruturas protéicas bem definidas e grandes (FENNER, 1989 e MOSS, 2001). A maioria dos orthopoxvírus, incluindo o VV, não forma ATI, mas outros o fazem, como Cowpox, Raccoonpox e Ectromelia (FENNER, 1989; MOSS, 2001 e SMITH & McFADDEN, 2002). O ATI aumenta a estabilidade do IMV após a morte celular e ajuda na transmissão viral entre

hospedeiros, devido ao aumento na resistência no ambiente (Revisado por SMITH & McFADDEN, 2002).

3. INTERAÇÃO VÍRUS-HOSPEDEIRO

3.1 Patogênese

Os membros da família *Poxviridae* causam um amplo espectro de manifestações clínicas dependendo da espécie viral e do seu hospedeiro. Estas manifestações podem abranger de uma infecção localizada, geralmente auto-limitada, até uma infecção sistêmica, com comprometimento de vários órgãos e alta morbidade/mortalidade. A patogênese dos *Orthopoxvírus* é bem conhecida, principalmente devido ao uso de modelos experimentais, tais como o *Ectromelia vírus* em camundongos de laboratório e *Vaccinia vírus* em diversos modelos animais (revisado por FENNER *et al.*, 1989). O sítio de entrada do vírus no hospedeiro pode variar conforme a espécie do vírus e o hospedeiro envolvido. Por exemplo, em camelos e seres humanos, o trato respiratório é a porta de entrada do *Camelpox vírus* e do *Variola vírus*, respectivamente. O trato gastrointestinal, em camundongos de laboratório, pode ser porta de entrada para o *Ectromelia vírus*. Enquanto pequenas abrasões na pele servem de porta de entrada para o *Vaccinia vírus*, *Variola vírus* e *Cowpox vírus* no hospedeiro.

Nas infecções localizadas, como as do *Vaccinia vírus* em seres humanos, o vírus se multiplica no local da infecção e se espalha para os linfonodos adjacentes, gerando uma linfadenopatia local, que é característica nas infecções por *Orthopoxvírus*. As lesões, tanto nas infecções localizadas ou nas sistêmicas, tendem a evoluir de forma semelhante. De início ocorre uma vaso dilatação dos capilares na derme na região acometida. Este processo é seguido por uma formação de vesículas que representam a maior fonte de infecção por contato devido aos altos títulos virais encontrados nessas regiões. A subsequente migração de células polimorfonucleares para a região da vesícula a transforma em uma pústula. Esta última, geralmente sofre um processo de ulceração que posteriormente gera uma crosta. E, por fim, observa-se a formação de uma cicatriz (revisado por FENNER *et al.*, 1989). Esta restrição da infecção localizada pode ser atribuída, pelo menos em parte, à resposta imune do hospedeiro, pois, em pacientes imunocomprometidos, o *Cowpox vírus* pode evoluir para uma infecção sistêmica muitas vezes fatal (revisado por SMITH & KOTWAL, 2002).

Já nas infecções sistêmicas a multiplicação do vírus se dá no local de entrada, a infecção então atinge o sistema linfático e após isto a corrente sanguínea, vindo a causar a viremia primária. Através do sangue, o vírus atinge os órgãos ricamente vascularizados, como baço e fígado, ele então se multiplica nestes órgãos e é novamente liberado na corrente sanguínea resultando em viremia secundária. Os vírus podem ser disseminados pela corrente sanguínea como partículas livres, porém, quando associados às células sanguíneas, possivelmente, ficam protegidos da ação dos anticorpos e das proteínas do complemento. Com a viremia secundária, outros órgãos, como rins, intestino, pulmões e pele, são atingidos pelo vírus causando as lesões típicas. Este modelo foi observado em *Ectromelia virus* utilizando-se anticorpos marcados com fluoróforos na infecção de camundongos de laboratório (revisado por FENNER *et al.*, 1989).

3.2 Resposta imune do hospedeiro

Toda a resposta imune contra patógenos é gerada por um ramo celular (Th1) e um ramo humoral (Th2), e a resposta aos poxvírus não é exceção. A polarização da resposta em Th1 ou Th2 parece ter como fator determinante o perfil de citocinas produzidas por diversas células como, por exemplo, as dendríticas (DC) e as T CD4⁺. Este perfil de citocinas tem como principais determinantes a natureza do patógeno e sua carga infectante (revisado por KOURILSKY & TRUFFA-BACHI, 2001). A resposta Th1 é desencadeada principalmente pelas células dendríticas e macrófagos, através da produção de citocinas como a interleucina 12 (IL-12) e fator de necrose tumoral (TNF α), após o reconhecimento por receptores do tipo PRR (*pattern recognition receptors*) de padrões moleculares conservados do patógeno. Estas citocinas servem como estímulo para a diferenciação das células T auxiliares (CD4⁺) quiescentes em células ativas produtoras de IFN γ . Esta citocina é de suma importância para plena ativação dos macrófagos. A IL-12 e os interferons do tipo I (IFN's α/β) ativam as células T citotóxicas (CD8⁺) importantes na eliminação de células infectadas (revisado por JANKOVIC *et al.*, 2001). Os estudos nesta área têm demonstrado que a resposta Th1 é de grande importância na eliminação dos poxvírus (revisado por SEET & JOHNSTON, 2003), em especial na fase precoce de infecção (FANG & SIGAL, 2005 e CHAUDHRI *et al.*, 2006). Esta resposta é mediada

por células do sistema imune adaptativo, como as células T CD8⁺ citotóxicas, e também por células do sistema imune inato como as células matadoras naturais (NK). A importância da resposta Th1 para resolução da infecção pelos poxvírus é ressaltada por resultados que mostram que *Ectromelia virus* recombinante expressando a interleucina 4 (IL-4) murina, uma citocina central para a geração de uma resposta Th2, é letal em camundongos C57/BL6, que são resistentes à infecção com o vírus selvagem (JACKSON *et al.*, 2001).

A resposta humoral também é crucial na eliminação dos poxvírus, porém foi, durante muito tempo, subestimada e sua importância foi atribuída somente a infecções recorrentes. É fato que a susceptibilidade de pessoas vacinadas a reinfeção é tanto maior quanto menor é o título de anticorpos neutralizantes no soro (HAMMARLUND *et al.*, 2003). Também se pode ressaltar a importância da resposta humoral pela eficácia da administração profilática de anticorpos monoclonais contra IMV e EEV em camundongos Balb/c que, desta forma, são parcialmente protegidos de um desafio intranasal com doses letais de *Vaccinia virus* (LUSTIG *et al.*, 2005). Adicionalmente, podem ser observadas melhoras no quadro clínico após administração de imunoglobulina contra *Vaccinia virus* (VIG) em casos de infecção pelo *Vaccinia virus* (LEWIS *et al.*, 2006) e mesmo infecções pelo *Variola virus* (revisado por SEPKOWITZ, 2003). Porém, estudos recentes têm demonstrado que a resposta humoral também desempenha um papel de importância significativa em infecções primárias, especialmente nas fases tardias da infecção (FANG & SIGAL, 2005 e CHAUDHRI *et al.*, 2006). Nestes estudos, camundongos C57/BL6 deficientes na elaboração de uma resposta imune humoral (μ MT e CD40^{-/-}) são infectados com o *Ectromelia virus*. Nestes camundongos a infecção se torna persistente levando a morte do hospedeiro. Por outro lado, camundongos C57/BL6 selvagens apresentam resistência total à infecção por este vírus. Além disto, quando se transferem células B selvagens ou soro imune contra *Orthopoxvirus* para os camundongos geneticamente deficientes, estes conseguem resolver a infecção e sobreviver (FANG & SIGAL, 2005 e CHAUDHRI *et al.*, 2006). Adicionalmente, têm sido propostas teorias de que os anticorpos seriam uma das principais forças seletivas para os vírus, desta forma, moldando a co-evolução com seus respectivos hospedeiros (revisado por HANGARTNER *et al.*, 2006).

Os membros do gênero *Orthopoxvirus* possuem imunidade cruzada, ou seja, a infecção por um deles, seja esta natural ou por vacinação, gera imunidade contra a infecção por membros do mesmo gênero. Estudos avaliando tanto células T CD4 e CD8 positivas, quanto anticorpos neutralizantes têm demonstrado que a imunidade fornecida pela vacinação é duradoura (HAMMARLUND *et al.*, 2003; VINER & ISAACS, 2005 e HATAKEYAMA *et al.*, 2005). De fato, anticorpos podem ser detectados até 75 anos após a vacinação, mesmo com a queda do número de células T de memória contra o vírus (HAMMARLUND *et al.*, 2003). Porém, a avaliação apenas da presença de anticorpos não revela se a população está protegida ou não, isto apenas fica aparente na avaliação de surtos (KAREM *et al.*, 2005 e HAMMARLUND *et al.*, 2005).

Os diversos mecanismos descritos acima atuam exercendo uma formidável pressão evolutiva, esta selecionou os poxvírus que possuem um vasto espectro de genes dedicados à evasão do sistema imune. Dentre as estratégias para evasão do sistema imune pode se destacar a expressão de genes que codificam receptores solúveis ou mesmo proteínas que possuem a capacidade de mimetizar citocinas e quimiocinas (revisado por ALCAMI *et al.*, 1998) ou de inibir cascatas intracelulares, tais como do sistema interferon (revisado por SMITH *et al.*, 1998) e de apoptose (revisado por MCFADDEN & BARRY, 1998). Os vírus desta família também possuem uma gama de proteínas de inibição da resposta imune Th1 (revisado por SEET & JOHNSTON, 2003), fator que vem a corroborar a importância desta na eliminação dos vírus (JOHNSTON & MCFADDEN, 2003).

4. HISTÓRICO DE VACINAÇÃO

Os poxvírus representaram um importante marco no desenvolvimento da virologia, imunologia e vacinologia. No século dezoito, a varíola (doença causada pelo *Variola virus*) era prevalente em todo o mundo e estima-se que, somente na Europa, 500.000 pessoas morriam por ano vítimas da doença. Porém, as primeiras medidas de controle realizadas contra a varíola foram desenvolvidas na Índia e na China, e envolviam o processo de variolação, que consistia em inocular o *Variola virus* no braço de uma pessoa não infectada. No entanto, este era um procedimento arriscado devido aos muitos efeitos adversos e taxa de mortalidade de aproximadamente 1%. Esta taxa se tornava aceitável quando era levado em consideração que a infecção pelo sítio natural, as vias respiratórias, tinha uma taxa de mortalidade de mais de 40% (revisado por FENNER *et al.*, 1989). Este processo foi levado à Europa por Lady Wortley Montagu, esposa do embaixador Britânico na Constantinopla, no ano de 1723 e foi amplamente utilizado até quase o final do século XVIII.

Em 1776, Edward Jenner, um médico do exército britânico notou que ordenhadores ou pessoas em contato íntimo com lesões características em tetas de vacas desenvolviam lesões nas mãos e braços, e que não mais eram susceptíveis à infecção pelo *Variola virus*. O médico então coletou o material da lesão de uma mulher chamada Sarah Nelmes e inoculou no braço de um menino chamado James Phipps. Posteriormente, desafiou o menino com o *Variola virus* sem que este último contraísse a doença. Jenner denominou o material inoculado de *vaccine*, nome derivado do termo latino *vacca* (vaca, em português) (revisado por FENNER *et al.*, 1989). Depois que Jenner publicou seu trabalho, o processo inoculação de *Cowpox virus* em humanos, denominado vacinação, foi promovido por toda a Europa e durante o século XIX, se espalhou pelo mundo. As amostras dos vírus vacinais tinham como fonte crostas de lesões em vacas ou cavalos e sua manutenção era realizada pela vacinação braço a braço ou inoculação em bezerros. Em 1939, quase um século e meio depois, Downie, ao analisar o vírus contido nas amostras vacinais percebeu que este não era o *Cowpox virus* original, sendo pertencente a uma espécie não encontrada na natureza. Esta nova espécie de poxvírus foi denominada *Vaccinia virus* (do latim *vacca*) (Revisado por SMITH & McFADDEN, 2002).

Apesar da disseminação da técnica de vacinação de Jenner, esta não foi eficaz na erradicação da doença devido a problemas de produção e conservação. Somente em 1959, uma campanha global de erradicação da varíola viria a ser proposta pela União Soviética à Organização Mundial de Saúde (OMS) e, apesar da proposta ter sido aceita, o progresso foi pouco até 1967. Neste ano uma Unidade de Erradicação da Varíola foi criada, seu objetivo era erradicar a doença no mundo em uma década, o que foi tornado possível por uma modificação da política da campanha de vacinação, que passou a dar uma ênfase maior ao controle e vigilância. O programa de vacinação em massa atingiu seu objetivo em 1977, quando foi relatado o último caso natural de varíola, na Somália. Cerca de dois anos após, depois de uma intensiva vigilância ao redor do mundo, a Organização Mundial de Saúde anunciou que a varíola havia sido erradicada do globo. Em 1980, a OMS recomendou que a vacinação fosse interrompida, exceto para trabalhadores de laboratório e membros das forças armadas de alguns países, e autorizou a manutenção de estoques do vírus da varíola em dois laboratórios de referência: o Centro de Controle de Doenças (CDC) em Atlanta nos Estados Unidos e o Instituto para Preparações Virais em Moscou na Rússia. Até hoje, a varíola permanece sendo a única doença erradicada devido à ativa intervenção humana. Porém, além dos esforços da OMS, diversos fatores desempenharam um importante papel neste êxito. Um dos marcadamente decisivos foi o fato do *Variola virus* ser um patógeno exclusivamente humano e não possuir reservatórios naturais conhecidos. (Revisado por FENNER, 2000; por SMITH & McFADDEN, 2002 e por McFADDEN, 2005).

Apesar de o vírus utilizado ser menos virulento do que o *Variola virus*, foram observados, nos pacientes que receberam a vacina, alguns efeitos adversos. Dentre estes efeitos, pode ser destacada uma reação local e geral, com produção de lesões típicas, *eczema vaccinatum*, uma reação sistêmica à vacinação e também alguns casos de encefalite com taxa de mortalidade alta (revisado por FENNER *et al.*, 1989). A transmissão do vírus vacinal para animais domésticos, pacientes, profissionais de saúde e pessoas da mesma família também deve ser ressaltada (revisado por SEPKOWITZ, 2003). Na verdade, alguns isolados de *Vaccinia virus* no Brasil aparentam ter sido derivados de amostras vacinais que se estabeleceram em

animais silvestres (DAMASO *et al.*, 2000; DA FONSECA *et al.*, 2002 e LEITE *et al.*, 2005).

5. POXVÍRUS COMO VETORES

5.1 Histórico de Poxvírus como vetores

As bases para a utilização de poxvírus como vetores para expressão de genes exógenos foram estabelecidas no mesmo ano em que a vacinação contra varíola foi descontinuada pela OMS, e os primeiros vetores virais recombinantes foram construídos apenas dois anos depois (PANICALI & PAOLETTI, 1982; MACKETT *et al*, 1982). Desta forma, o fim da primeira e mais bem sucedida campanha de vacinação, serve como marco para um novo capítulo na longa história de utilização dos poxvirus. Esta nova era foi marcada pelo desenvolvimento de diversos poxvirus expressando genes de antígenos de vírus, bactérias e parasitas patogênicos. Estes vetores foram avaliados em modelos animais e nas espécies alvos (revisado por PAOLETTI, 1996 e por MOSS, 1996). Hoje, relativo sucesso comercial foi atingido na geração de vacinas para o campo veterinário (YOKOYAMA *et al*, 1997) e existem vacinas em teste clínico para a utilização em humanos (WEBSTER *et al*, 2005). Além desta sua utilização na indução imune, novos campos estão sendo contemplados como a utilização na construção de bibliotecas genômicas (SMITH *et al*, 2001) e até mesmo imunoterapia do câncer (MASTRANGELO, & LATTIME, 2002).

5.2 Utilização de Poxvírus como vetores

Quando são considerados vetores para sistemas de terapia gênica, os candidatos costumam ser adenovirus e retrovírus. Estes vetores têm sido escolhidos segundo critérios como tropismo, duração de expressão e capacidade de integração com o genoma do hospedeiro. Diversas características do ciclo de multiplicação dos poxvírus os tornam fracos candidatos para uma expressão de longo prazo, isto tem levado estes virus a terem sua pesquisa negligenciada. Porém estes vírus podem vir a ser ideais em aplicações de imunoterapia, incluindo sua capacidade de utilização como agente replicativo voltado diretamente contra tumores sólidos. Eles também podem ser utilizados como vetores recombinantes para vacinas e na expressão de genes *in situ* que expressam a produção de citocinas, estas que levam ao

reconhecimento e rejeição de tumores (revisado por MASTRANGELO *et al*, 2000 e por PAOLETTI, 1996).

O potencial dos poxvirus como vetores é reflexo de diversas características. Dentre elas pode ser destacado o amplo tropismo celular, que, como discutido anteriormente, nos poxvirus não é regido pela disponibilidade de receptores celulares específicos e sim, por eventos intracelulares que ocorrem após a adsorção e penetração dos vírus. Isto permite que os vírus infectem de maneira eficiente uma gama variada de tipos celulares, esta característica também gera a possibilidade de células infectadas serem parcialmente permissivas, o que permite que ocorra a expressão dos genes virais sem ativa multiplicação do vírus, esta possibilidade será discutida mais afundo adiante (revisado por MASTRANGELO *et al*, 2000; McFADDEN, 2005).

A morfologia dos vírus da família *Poxviridae* também apresenta diversas características muito interessantes: o grande tamanho da partícula viral e do genoma permite a inserção estável de grandes fragmentos de DNA podendo chegar a até vinte e cinco mil pares de base, muito acima do esperado para diversos outros vetores (revisado por MOSS, 1996; revisado por MOSS, 2001). Além da capacidade de tolerar a inserção de grandes fragmentos, o genoma dos poxvirus é transcrito no citoplasma, desta forma não requer processamento nuclear e o RNA não precisa ser transportado a partir do núcleo. Também pode se ressaltar que a tradução dos genes alvo em proteínas ocorre em níveis relativamente altos. Estes vírus também apresentam grande potencial ao se analisar o modo como interagem com o sistema imune do hospedeiro. Uma vez que a expressão dos genes alvo ocorre mesmo que o hospedeiro possua imunidade específica contra o vetor (revisado por MASTRANGELO *et al*, 2000).

O trabalho com microorganismos não ocorre sem uma parcela de risco para os indivíduos que entram em contato com estes. Desta forma, os laboratórios devem ser equipados com medidas de segurança compatíveis ao nível de risco dos microorganismos estudados dentro deles (Lei no. 11.105 – Lei da Biossegurança - http://www.planalto.gov.br/CCIVIL/_Ato2004-2006/2005/Lei/L11105.htm). Levando-se isto em consideração, os vetores poxvirais possuem a vantagem de sua manipulação ser relativamente segura, por exemplo, o vírus vaccínia pode ser

contido em laboratórios com nível de bio-segurança dois (revisado por MASTRANGELO *et al*, 2000).

Outro fator de importância é a relativa simplicidade empregada nos métodos para a construção e manipulação destes vetores, que são baseados na recombinação homóloga, um processo que ocorre naturalmente dentro das células infectadas. Também se pode ressaltar que as proteínas são expressas, processadas e transportadas seguindo as vias de produção celular naturais, gerando ao fim proteínas biologicamente ativas com características iguais as geradas no ambiente original (revisado por MOSS, 1996 e por MASTRANGELO *et al*, 2000). Os poxvirus também possuem grande estabilidade na forma de vacina liofilizada, sendo que esta possui custos baixos de produção, é de fácil produção e administração. A vacina produzida pode ser administrada por diversas vias, sendo que a inoculação intranasal e/ou oral, gera resposta específica nas mucosas (PASTORET & VANDERPLASSCHEN, 2003)

5.3 Mecanismos para Produção de Vetores

O processo de geração de vetores poxvirais, como citado anteriormente, utiliza técnicas de recombinação homóloga do DNA viral. O gene de interesse é inserido em um plasmídeo contendo um promotor do poxvirus, este último, geralmente derivado do gene viral P7.5, é ativo tanto na fase precoce quanto na tardia, desta forma permitindo uma expressão contínua do gene exógeno. Este cassete é flanqueado por duas seqüências de DNA homólogas as encontradas nos poxvirus, e desta forma dirigem a recombinação ao locus desejado. O locus mais utilizado é o do gene da Timidina Kinase (*tk*), pois este ao ser interrompido vem a servir como marcador para recombinação. Esta é atingida pela infecção de células com o vírus selvagem, e então transfectando-as com o plasmídeo (revisado por MOSS, 1996). Os vírus recombinantes estarão presentes com uma freqüência de 0,1%, e podem ser selecionados via triagem de placas por hibridação por DNA ou via detecção da presença do produto gênico exógeno, e purificados em passagens subseqüentes (EARL *et al*, 1998; revisado por MOSS, 1996). Para o aumento da eficiência, SMITH e colaboradores (2001) desenvolveram um método mais eficiente

e amplo empregando o vírus vaccínia recombinante que será discutido mais adiante (ver vetores de biblioteca genômica).

Deve se ressaltar que, ao se alterarem os promotores, podem ser obtidos níveis de expressão variando de quase indetectáveis à extraordinariamente altos (revisado por MASTRANGELO *et al*, 2000). Também foram desenvolvidos sistemas híbridos com polimerases de bacteriófagos. Nestes sistemas, são construídos poxvirus recombinantes contendo o gene que codifica a RNA polimerase de bacteriófago como, por exemplo, a do fago T7, e este gene é regulado por um promotor de poxvirus. Existem três versões básicas destes sistemas. Em uma delas, as células são infectadas pelo vírus recombinante e então é transfectado um plasmídio que contém o gene alvo sendo regulado por um promotor do bacteriófago. A outra estratégia envolve inserir o gene alvo regulado com promotor de bacteriófago em um segundo poxvirus e coinfectar com o poxvirus contendo o gene para a RNA transcriptase do bacteriófago com o primeiro vírus ou infectar células que produzam transcriptase do fago constitutivamente. A última estratégia envolve infectar as células com poxvirus contendo tanto o gene para a RNA polimerase do fago regulado por um promotor de poxvirus e o gene alvo regulado por um promotor do fago, desta forma se elimina a necessidade de protocolos de dupla infecção (revisado por MOSS, 1996).

Os sistemas de dupla infecção e indutíveis são apropriados quando se trabalha com grandes volumes de células. Em uma modificação do sistema indutível, o poxvirus recombinante contém: o gene do repressor de *lac* de *E. coli* sob o controle de um promotor precoce/tardio poxviral para uma síntese contínua do repressor; O gene da RNA polimerase do fago T7 sob controle de um promotor tardio de poxvirus e do operador *lac* de *E. coli*; E o gene a ser expresso sob controle de um promotor de T7 e do operador de *lac*. Devido ao fato de tanto a polimerase de T7 quanto os genes controlados por promotores de T7 estarem sendo regulados por operadores de *lac*, o controle fica muito estrito, promovendo uma indução de mais de dez mil vezes. Outra modificação deste sistema emprega um repressor termolábil, desta forma a expressão não está ligada à inserção de um indutor e sim a uma variação de temperatura o que é muito positivo quando se considera a tecnologia de fermentação (revisado por MOSS, 1996).

Os sistemas citados acima possuem um nível de expressão mais alto do que o observado em sistemas eucarióticos de transfecção e têm diversas aplicações como a análise da interação entre proteínas, mapeamento de epitopos de anticorpos monoclonais, estudos de fusão celular e expressão de canais iônicos. Até mesmo estruturas complexas como partículas de vírus RNA infectivas foram produzidas com a transfecção de múltiplos plasmídeos (revisado por MOSS, 1996). Além disto, estes sistemas oferecem meios para a triagem funcional de bibliotecas de cDNA, como demonstrado por FENG e colaboradores (1996), na pesquisa onde se identificou o gene do correceptor da fusina do vírus da imunodeficiência humana (HIV).

Também tem se utilizado vetores poxvirais com sucesso na prospecção de alvos para resposta imunológica celular e humoral. Se vírus *Vaccinia* que expressam um ou mais genes de outros microorganismos são utilizados na imunização de animais, a atividade neutralizante do soro pode ser testada. Desta forma se elimina a necessidade de se purificar uma proteína no seu estado nativo, o que é especialmente difícil no caso das que se encontram inseridas em membranas. Também pode ser empregada engenharia genética para induzir um aumento na resposta imune, por exemplo, ao se converter uma proteína secretada em uma que é ancorada à membrana. A imunização com *Vaccinia vírus* recombinantes também é um método conveniente para produzir anticorpos monoclonais contra produtos gênicos naturais, sem ter de purificá-los (revisado por MOSS, 1996).

Os *Vaccinia vírus* recombinantes têm sido utilizados extensamente na indução de linfócitos T citotóxicos (CTLs) contendo CD8 em animais ou para determinar alvos de CTLs *in vitro*. A expressão das proteínas de forma intracelular faz com que os antígenos sejam processados e apresentados para reconhecimento em associação com complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I. Para a determinação de alvos as células são infectadas por vírus recombinantes contendo o gene que expressa a proteína de interesse, este gene, preferencialmente, está sobre o controle de um promotor precoce e tardio. Também, como alternativa, o vírus pode expressar a molécula de MHC apropriada. As células são carregadas com cromo e a liberação deste elemento é medida após a incubação destas com linfócitos efetores oriundos de animais experimentalmente estimulados ou mesmo de humanos que tiveram contato com o antígeno sob estudo. Os vetores poxvirais também podem ser

utilizados para induzir CTL contendo CD4 e analisar a apresentação de antígenos endógenos por MHC de classe 2 (revisado por MOSS, 1996).

5.4 Vetores para biblioteca genômica

A eficiência das estratégias descritas acima é suficiente para recuperar um clone recombinante específico, porém é baixa demais para que uma biblioteca representativa seja construída. Sendo assim, para a geração de vírus recombinantes em uma alta frequência e altos títulos outra estratégia deve ser empregada. SMITH e colaboradores (2001) utilizaram uma nova técnica para a construção de uma biblioteca de cDNA a partir do RNA de células tumorais. Esta se baseia na infecção de células com o DNA defectivo do *Vaccinia vírus*, que somente pode ser empacotado mediante recombinação. Realiza-se isto ao se cortar o DNA viral no meio do gene *tk*, como não há homologia entre os dois fragmentos do gene *tk*, os dois “braços” gerados só podem ser unidos por recombinação homóloga através de uma “ponte” utilizando as duas seqüências homólogas ao gene *tk*, que flanqueiam o incerto no plasmídeo recombinante de transferência (SMITH *et al*, 2001). Devido ao fato do DNA do *Vaccinia* não ser infeccioso por si só, para a geração de partículas infecciosas é necessária a coinfeção com um vírus Helper. Este, geralmente, é o *fowlpox vírus* (FPV), que não se replica em células de mamíferos, mas realiza as funções requeridas para replicação e empacotamento das partículas recombinantes (MERCHLINSKY *et al*, 1997; SOMOGYI *et al*, 1993).

Construiu-se então, v7.5/*tk*, um vetor *Vaccinia* utilizando o promotor 7.5k e os sítios de restrição NotI e Apal a jusante do promotor. A digestão com as enzimas de restrição NotI e Apal resulta em dois fragmentos grandes de aproximadamente 80 e 100 Kb, respectivamente. Cada uma das porções geradas inclui um fragmento que não se sobrepõe do gene *tk*, que podem ser unidos posteriormente por um plasmídeo de transferência. Através da marcação de resistência à BrdU, pode se determinar que quase todos os vírus VV infecciosos, gerados pela transfeção tripla das duas porções genômicas do VV e do plasmídeo de transferência específico em células pré-infectadas pelo FPV, são recombinantes. A recombinação dos clones

individuais também foi confirmada por análise de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se iniciadores que flanqueiam o gene *tk* (SMITH *et al*, 2001).

Os vírus desta biblioteca foram titulados e utilizados para infectar células antígeno negativas. Aguardou-se um tempo de 12 horas para que as células tivessem tempo para expressar, processar e exibir os antígenos associados à MHC de classe um. Após este período, foram adicionados à monocamada CTLs tumor específicos (CTLTE), produzidos pela sensibilização de camundongos com células tumorais. Os CTLTEs reconhecem e lisam as células que possuem os antígenos alvo em sua superfície e liberam os vírus que infectam estas células no sobrenadante. Este foi utilizado para infectar uma nova monocamada e, ao se repetir este processo algumas vezes, obtém-se um enriquecimento exponencial dos vírus que expressam antígenos reconhecidos pelos CTLTEs (SMITH *et al*, 2001).

Após a seleção dos vírus, foi realizada a sua caracterização. Para isto, monocamadas em meio semi-sólido foram infectadas com o sobrenadante enriquecido e os vírus foram isolados a partir das placas formadas. Estes isolados foram amplificados e purificados, e o intervalo do gene *tk* foi então seqüenciado para identificação dos genes que expressavam os epítomos antigênicos (SMITH *et al*, 2001).

5.5 Vírus vacinais atenuados e não replicativos

A erradicação da varíola foi um triunfo do programa de vacinação global, porém este sucesso não ocorreu sem risco associado à vacina. Foram associados à vacina efeitos adversos, que tiveram conseqüências severas ou letais. Estes efeitos adversos podiam apresentar uma distribuição generalizada, ou mais específica com taxas mais altas em certas populações, com certas linhagens vacinais ou preparações. Em crianças jovens o *eczema vaccinatum* e a encefalite eram complicações sérias, mas infreqüentes, já em adultos podiam ocorrer casos de vaccinia progressiva ou disseminada mediante imunodeficiência. As tentativas iniciais de manufaturar o vaccinia em condições mais definidas e reguladas foram abandonadas com o sucesso da erradicação. Desta forma, a conhecida capacidade do vaccinia de gerar efeitos adversos, foi um problema a ser resolvido quando se propôs que estes vírus fossem utilizados como vetores. Diversas abordagens foram desenvolvidas para aumentar a segurança do *Vaccinia vírus*, e, durante a era da varíola, diversas linhagens atenuadas destes vírus foram desenvolvidas com este intuito (revisado por PAOLETTI, 1996 e por MOSS, 1996).

Uma destas linhagens foi gerada a partir de um isolado de uma lesão poxviral, em um equino, na região de Ankara na Turquia. Este isolado sofreu 572 passagens seriais em culturas primárias de fibroblastos embrionários de frango (CEF) (SUTTER & STAIB, 2003). A seleção gerada por este processo resultou em seis deleções de aproximadamente trinta e um mil pares de bases, o que corresponde à cerca de quinze por cento do genoma da linhagem selvagem (MEYER *et al*, 1991; ANTOINE *et al*, 1998). A maior parte dos genes deletados ou truncados demonstrou estar envolvida com atividades imunoregulatórias ou com o espectro de hospedeiros, sendo que múltiplos defeitos genéticos teriam de ser corrigidos para que ocorresse a reversão ao tipo selvagem. A este vírus foi dado o nome de vaccinia Ankara modificado (MVA). (ANTOINE *et al*, 1998; BLANCHARD *et al*, 1998; WYATT *et al*, 1998; SUTTER & MOSS, 1992; MOSS, 1996).

O MVA demonstrou ser fenotípica e geneticamente estável, e incapaz de multiplicação em grande parte das linhagens celulares de mamíferos testadas, incluindo as de origem humana, porém, mesmo em células não permissivas, os

genes virais são expressos (WYATT *et al*, 1998; SUTTER & MOSS, 1992; CARROLL & MOSS, 1997; DREXLER *et al*, 1998). Isto ocorre porque a multiplicação viral, nas células de mamíferos, é bloqueada nos estágios tardios da morfogênese, desta forma, não impedindo a síntese das proteínas do vírus (MOSS, 1996). A perda da habilidade do vírus de se replicar em células de mamíferos, o tornou altamente atenuado, sendo que nenhum efeito adverso foi reportado mesmo quando altas doses de MVA foram administradas a primatas não humanos imunodeficientes (STITTELAAR *et al*, 2001) ou em camundongos com um quadro severo de doenças de imunodeficiência combinadas (WYATT *et al*, 2004). Seu perfil de segurança foi comprovado pela mínima morbidade apresentada quando deliberadamente se vacinou, durante a campanha de erradicação da varíola na Turquia e Alemanha, um grupo de cento e vinte mil pessoas cuja vacinação era de alto risco, como eczemasos, crianças e idosos (HANKE *et al*, 2002; MOORTHY *et al*, 2003; VAN ROMPAY *et al*, 2003; STITTELAAR *et al*, 2001). De fato, o MVA é tão seguro que o trabalho com ele é permitido em laboratórios com nível de segurança 1, sem a necessidade de vacinação (MOSS, 1996).

Apesar de sua não patogenicidade, o MVA carrega e expressa antígenos de forma altamente imunogênica, que estimula tanto a resposta humoral quanto a celular (RAMÍREZ *et al*, 2000; SUTTER & STAIB, 2003), sendo que sua eficácia como um vetor vacinal tem sido avaliada em uma miríade de modelos de doenças infecciosas e tumores (DREXLER *et al*, 2004; MINEV *et al*, 1999; BONNET *et al*, 2000; CARROLL *et al*, 1997). Além disto, o MVA é capaz de se multiplicar em algumas células tumorais, porém, ao contrario da linhagem WR, não ataca as células dendríticas e não impede a expressão da molécula coestimulatória CD8, desta forma tem impacto direto na indução da resposta imune celular (GREINER *et al*, 2006). Porém, em vista da capacidade limitada de replicação do MVA, em estudos médicos onde o MVA for utilizado como vetor vacinal, pode ser necessário que sejam desenhados protocolos mais eficientes, que acentuem ainda mais a resposta imune, desta forma conferindo uma maior proteção contra patógenos e tumores (WEYER *et al*, 2007). Estudos apontam que interferon gama (IFN- γ) e interleucina 12 (IL-12) poderiam ser utilizados com este intuito uma vez que estão envolvidos na modulação do sistema imune, desta forma, desempenhando um papel crítico na diferenciação

de linfócitos T helper (Th) e no balanço entre as respostas Th1 e Th2 (ABAITUA *et al*, 2006).

Outra estratégia pode gerar variados graus de atenuação através da deleção de um ou mais genes que não são requeridos para a multiplicação em cultura celular. Estes incluem genes virais envolvidos no metabolismo de nucleotídeos, interações com o hospedeiro e formação de vírus extracelulares (MOSS, 1996). Esta abordagem é demonstrada pela construção da linhagem NYVAC do *Vaccinia vírus*. Nesta foi utilizada a linhagem Copenhagen como base, sendo que foi realizado um seqüenciamento completo do genoma. De posse desta informação, e com o conhecimento existente de funções genéticas relacionadas à virulência e à abrangência de hospedeiros com capacidade de replicação, determinados genes foram precisamente deletados do genoma do vaccinia. O vetor resultante, NYVAC, era altamente atenuado, como foi demonstrado em uma série de hospedeiros animais. A inoculação intracranial de ratos recém-nascidos ou jovens demonstrou uma abrangência de dose muito favorável quando comparada com tanto a linhagem original quanto a outras linhagens de vaccinia, sendo que não foi observada infecção viral disseminada em hospedeiros imunocomprometidos. Em diversas culturas celulares de origem humanas, o vetor apresentou replicação debilitada, o que é consistente com a deleção dos genes de espectro de hospedeiro. Apesar de altamente atenuado, o vetor reteve a habilidade de induzir a resposta imune a antígenos externos de forma similar ao vírus da linhagem original (revisado por PAOLETTI, 1996).

Além das passagens múltiplas e da deleção seletiva, existe a alternativa da utilização de vetores que naturalmente não se multiplicam em células de mamíferos. Dentre eles pode-se destacar os do gênero *Avipoxvírus*. Estes vírus de aves foram inicialmente considerados como vetores para pássaros devido à característica de não multiplicação em células de mamíferos, porém, estudos subseqüentes demonstraram que os vírus expressavam genes recombinantes em células de mamíferos e que induziam resposta sistema imune (revisado por MOSS, 1996). Dentre os vírus mais utilizados deste gênero estão o *Canaripox vírus* e *Fowlpox vírus*, sendo que, por razões ainda não compreendidas, o vetor *Canaripox* foi cem vezes mais eficiente que *Fowlpox* na indução da resposta imune, desta forma,

apresentando desempenho similar ao VV com deleção no gene *tk* (revisado por PAOLETTI, 1996).

Estes vírus também não possuem reatividade cruzada com VV desta forma podem ser administrados a indivíduos que possuem imunidade contra Vv. Esta característica pode ser explorada na geração de vacinas com múltiplos vetores recombinantes, por exemplo, uma primeira dose com um vetor de VV e seu reforço com um *Avipoxvirus*. Outro fator de segurança para estes vetores é que, quando não são inoculados em espécies que não são reservatórios naturais como, por exemplo, humanos, a probabilidade de recombinação com o vírus selvagem é quase nula (revisado por PASTORET & VANDERPLASSCHEN, 2003).

5.6 Vetores na terapia contra o câncer

O grande potencial imunogênico dos poxvirus despertou o interesse para sua possível utilização na geração de vacinas contra o câncer. Inicialmente os estudos se focaram no desenvolvimento de vacinas utilizando o transplante de células autólogas infectadas *in vitro* com vetores poxvirais carreando genes que expressavam proteínas oncogênicas imunoativas. Estes primeiros estudos foram muito promissores, apresentando indução de resposta imune profilática e em alguns casos terapêutica (DRANOFF *et al*, 1993; KIM *et al*, 2001; HERSEY *et al*, 2002). Este sucesso dirigiu a atenção dos pesquisadores para a possibilidade da utilização de vetores poxvirais, em especial o *Vaccinia vírus*, em tumores *in situ* como mais uma ferramenta imunológica auxiliar. As características como amplo tropismo e alta eficiência de infecção do *Vaccinia vírus* e expressão de proteínas exógenas permitem que vários tipos de tumores, em diferentes tecidos, sejam alvos para possíveis tratamentos. Isto foi confirmado por estudos *in vitro*, onde foram infectadas múltiplas linhagens celulares tumorais, tanto murinas quanto humanas, com o mesmo vírus recombinante, e foram obtidos altos níveis de expressão de proteínas exógenas (LATTIME *et al*, 1996). Estes vírus também têm a capacidade de manter altos níveis de expressão exógena, mesmo após múltiplas inoculações, que provocam uma forte resposta humoral aos antígenos virais. Ao se infectar localmente pacientes com melanoma superficial com vírus recombinantes expressando citocinas, observou-se que, mesmo na presença de anticorpos específicos, o vetor continuava infectar e se replicar nas células por pelo menos quatro dias após a inoculação (MASTRANGELO *et al*, 1995). Também deve ressaltar que o *Vaccinia vírus* é replicativo o que deve amplificar os efeitos de uma dose inicial, mas isto também implica que os pacientes devem estar imunocompetentes para receber esta terapia (MASTRANGELO *et al*, 2000).

Nos sistemas de inoculação *in vivo* os vírus podem agir contra tumores de duas formas diferentes. Na primeira, a replicação seletiva intratumoral leva à multiplicação viral e à morte da célula cancerígena por mecanismos únicos e independentes dos de apoptose, e conseqüente disseminação para outras células do tumor. Desta forma estes se tornam uma opção no tratamento de cânceres

refratários, sendo isto confirmado pelo sucesso no tratamento local de tumores. Porém, para que este tipo de tratamento tenha um impacto maior na sobrevivência dos pacientes é necessário um mecanismo para ação sistêmica e inoculação intravenosa destes vírus oncolíticos (THORNE *et al*, 2007). Levando-se isto em consideração, os poxvírus são excelentes candidatos para este tipo de estratégia, uma vez que evoluíram para disseminação sistêmica e resistência a eliminação por anticorpos e pelo sistema complemento (BULLER & PALUMBO, 1991, SMITH *et al*, 1997).

A eficácia deste sistema foi elegantemente demonstrada por KIRN e colaboradores (2007), ao inserirem em vírus oncolíticos o gene do interferon beta (IFN- β). Esta molécula tem diversos efeitos anti-câncer como efeitos anti-proliferativos (KAYNOR *et al*, 2002), indução de CTLs tumor específicos (BROWN *et al*, 2002) e efeitos anti-angiogênicos (DONG *et al*, 1999). É importante ressaltar que o IFN- β , em tecidos saudáveis inibe a proliferação viral (BIRON, 1998), porém as células tumorais são comumente resistentes aos efeitos antivirais do IFN- β e não aos efeitos antitumorais, desta forma, o vírus pode se replicar nestas células. Sendo assim a eficácia e, principalmente, a segurança destes vetores foi ampliada. Também foi necessária a deleção de um gene do Vaccinia que codificava um inibidor de IFN do tipo um. O vírus originado por este processo demonstrou replicação específica em tumores e o tratamento com este vírus também gerou uma resposta imune tumor específica, como demonstrado pela rejeição de células tumorais injetadas em camundongos pós-tratamento (KIRN *et al*, 2007).

A outra estratégia envolve a utilização de vírus como carreadores de genes que estimulam o sistema imune a reconhecer e combater os tumores. Os genes a serem transplantados podem expressar citocinas intensificadoras da resposta imune e antígenos que co-estimulam a imunidade (MASTRANGELO & LATTIME, 2002). Alternativamente, o vetor pode expressar antígenos associados a tumores (AAT), auxiliados ou não por moléculas co-estimulatórias (MEYER *et al*, 2005; OERTLI *et al*, 2002; JENNE *et al*, 2001). KAUFMAN e colaboradores (2007) obtiveram sucesso na utilização de dois AAT no tratamento do câncer de pâncreas. Um dos AAT foi o antígeno carcinoembrionário (CEA) que é um antígeno oncofetal que é superexpresso em muitos carcinomas pancreáticos, e o outro foi MUC-1, que é uma proteína

altamente glicosilada também superexpressa em muitos adenocarcinomas incluindo os de origem pancreática. Neste estudo, além da utilização de múltiplos antígenos tumorais como alvo, foram utilizadas outras estratégias para aumentar a resposta ao tumor, dentre elas: a expressão de diversas moléculas coestimulatórias de células T, o emprego de reforço utilizando um sistema de vetor de poxvírus heterólogo e a inclusão do fator de estimulação de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) como um adjuvante local. A expectativa de vida dos pacientes com câncer avançado aumentou com administração desta vacina, que se apresentou segura, foi bem tolerada e capaz de gerar uma resposta imune antígeno-específica.

As estratégias descritas acima também podem ser utilizadas em conjunto, como demonstrado no estudo de THORNE e colaboradores (2007), onde se desenhou um vírus que ataca especificamente células cancerígenas, com a ativação do fator de transcrição E2F e da via EGFR, através da deleção dos genes da timidina quinase e do fator de crescimento do vaccinia (VGF) do VV Western Reserve (WR). Para auxiliar a resposta através da indução de CTL específicos para tumores, o vírus também recebeu o gene do GM-CSF humano. Este vírus foi tão potente quanto o vírus selvagem contra um grande número de linhagens de células cancerígenas, porém, em células não transformadas é altamente atenuado. A análise de biodistribuição *in vivo* revelou uma rápida remoção deste vírus de tecidos não tumorais, enquanto, foram observados dramáticos efeitos terapêuticos contra grandes tumores primários após a disseminação sistêmica do vírus.

A utilização de linhagens de vírus altamente atenuados, como o MVA, pode apresentar vantagens na expressão de genes em tumores. Foi demonstrado que a infecção de células de melanoma por MVAs leva estas células a apoptose, mas esta linhagem, diferentemente de WR, não destrói as células dendríticas (DC) e não inibe a expressão da molécula coestimulatória CD8. Esta característica é muito interessante uma vez que as DC maduras são de grande importância na ativação e proliferação de células T, possuindo impacto direto na indução da resposta imune celular. Desta forma a construção de vetores com genes que expressam AATs e moléculas co-estimulatórias se apresenta como uma estratégia promissora (GREINER *et al*, 2006).

5.7 Poxvirus como vetores Vacinais

As estratégias para vacinação contra agentes infecciosos, utilizam a inoculação do patógeno atenuado, morto e, mais recentemente, proteínas recombinantes. Estes protocolos, apesar de amplamente utilizados, possuem algumas desvantagens. A inoculação de patógenos atenuados não pode ser realizada em indivíduos imunocomprometidos, e existe sempre o risco deste sofrer regressão à forma patogênica. A utilização do patógeno morto e de proteínas recombinantes geram uma forte resposta humoral, mas, em geral, a resposta imune celular é fraca o que se torna um problema no caso de patógenos intracelulares (LEVINE, & SZTEIN, 2004).

A utilização de vetores virais para a expressão de proteínas heterólogas, em geral, induz uma forte resposta humoral e celular contra os patógenos alvo. Em vista deste potencial, diversos vetores têm sido propostos, dentre eles os poxvirus. O uso de vetores atenuados dos poxvirus aumenta ainda mais a segurança da utilização destes. Nos últimos anos, diversas vacinas utilizando estas tecnologias para fins veterinários (KIENY *et al*, 1984; YOKOYAMA *et al*, 1997) e humanos (KENT *et al*, 1998; EGAN *et al*, 1995; BOYER *et al*, 2000; WEBSTER *et al*, 2005; BISHT *et al*, 2004; STOBBER *et al*, 2007; ZHU *et al*, 2000) têm sido desenvolvidas e testadas.

5.7.1. Vacinas de uso veterinário

A primeira vacina a utilizar poxvirus como vetor recombinante na fauna selvagem foi construída através da inserção do cDNA que codifica a glicoproteína do vírus da raiva no locus do gene *tk* da linhagem Copenhagen do Vv. A interrupção deste locus permitiu a seleção bioquímica dos recombinantes e ao mesmo tempo atenuou o vírus (KIENY *et al*, 1984). A vacina vaccinia-raiva recombinante (VRG) serviu na vacinação oral de raposas contra a raiva. Após testes laboratoriais (BROCHIER *et al*, 1989; THOMAS *et al*, 1990; BLANCOU *et al*, 1986; PASTORET *et al*, 1992), ela foi eventualmente utilizada em condições de campo em 1987 (PASTORET *et al*, 1988) e provou ser segura e eficaz (BROCHIER *et al*, 1991). Ela, então, foi utilizada em larga escala em diversos países europeus que mais tarde viriam a se tornar livres da raiva, como exemplo tem-se a Bélgica, que iniciou uma campanha de vacinação contra a raiva utilizando exclusivamente VRG em 1990. A

campanha gerou uma redução imediata drástica na incidência e permitiu a eliminação da doença em oitenta por cento da área inicialmente infectada. As áreas que permaneceram infectadas eram regiões fronteiriças e a vacinação se focou mais nessas regiões nos anos de 1992 a 1994, sendo que nenhuma raposa infectada foi detectada em 1993. Nos anos de 1994 a 1996 a raiva voltou a se espalhar a partir das fronteiras, mas uma estratégia modificada de vacinação e uma cooperação além das fronteiras controlaram o novo foco. O último caso de raiva neste país foi detectado em um bovino em 17 de julho de 1999 e a última raposa infectada em três de abril de 1998. Desta forma a Organização mundial da Saúde declarou a Bélgica oficialmente livre de raiva em 2001 (revisado por PASTORET & VANDERPLASSCHEN, 2003).

Outro exemplo de utilização de vetor poxviral foi a vacina para o vírus da doença de Newcastle (NDV), que foi construída utilizando-se o *Fowlpox vírus*, expressando a hemaglutinina-neuroaminidase e a glicoproteínas de fusão do NDV. O vetor resultante foi utilizado na vacinação de galinhas, porém algumas questões foram levantadas devido ao fato do FPV atenuado ser utilizado na prevenção do vírus selvagem que é um patógeno para estes animais. Dentre estas questões se ressalta a hipótese da imunidade materna pré-existente ter influencia sobre a vacinação com o vetor, sendo que o problema é duplicado pelo fato das progenitoras possuírem resistência tanto aos genes a serem expressos quanto ao vetor em si. No desenvolvimento desta vacina utilizou-se a inoculação de uma dose única em filhotes com a idade de um dia, averiguou-se que os níveis de anticorpos se mantiveram por oito semanas, que é a expectativa de vida das aves comerciais. A imunidade protetora foi demonstrada pela inoculação intramuscular de NDV velogênico e de um desafio respiratório com NDV. Apesar de uma resposta específica à NDV reduzida, a vacina obteve licença comercial nos Estados Unidos (revisado por PAOLETTI, 1996).

O vetor NYVAC também foi utilizado na prevenção do vírus da pseudorraiva (PRV) em porcos. Uma série de vetores expressando glicoproteínas do PRV foram construídos e inoculados através de duas injeções intramusculares com intervalo de 28 dias. Averiguou-se que o vírus expressando gp50 induziu a produção anticorpos neutralizantes e protegeu contra um desafio oronasal com uma amostra virulenta de PRV de forma comparável com a vacinação com PRV inativado. Porém, a vacinação

com o vetor tem a vantagem da possibilidade de discriminação do animal vacinado do infectado naturalmente, isto permite à indústria acompanhar infecções de forma apropriada e eliminar seletivamente os animais infectados (revisado por PAOLETTI, 1996). O FPV também foi utilizado na construção de um vetor expressando duas glicoproteínas hemaglutininas dos sorotipos A1 e A2 do influenza eqüino. Este induziu anticorpos inibidores de hemaglutinina quando inoculado em cavalos e gerou uma proteção significativa quando cavalos vacinados foram expostos a uma infecção natural por influenza eqüino (revisado por PAOLETTI, 1996).

Outro exemplo de vacinação com vetor poxviral utilizou dois recombinantes de canarypox, cada um expressando o gene *gag* completo e, além deste, um expressando o envelope do subgrupo A do vírus da leucemia felina (FeLV) e o outro expressando uma versão modificada do envelope em que a região supostamente responsável pela imunossupressão foi deletada. Estes recombinantes foram avaliados com reação a sua eficácia de proteção em gatos com oito a nove semanas, e comprovou-se que duas inoculações uma cinco semanas e outra duas semanas antes do desafio, falharam em induzir títulos mensuráveis de anticorpos neutralizantes para FeLV. No entanto, cinquenta por cento dos gatos que receberam o recombinante com envelope mutado e todos os gatos que receberam o recombinante com o envelope intacto, foram protegidos no desafio oronasal com FeLV. Esta proteção foi determinada através da avaliação antigenemia de p27, detectando-se o antígeno FeLV em esfregaços de sangue, e através da tentativa de recuperar-se FeLV infeccioso. Esta foi a primeira descrição de uma imunização bem sucedida contra retrovírus concedida por recombinante poxviral (revisado por PAOLETTI, 1996).

5.7.2. Vetores vacinais e doenças infecciosas humanas

Após o sucesso de diversas vacinas utilizando vetores poxvirais com uso veterinário, a utilização destas vacinas no combate de doenças infecciosas humanas começou a ser testada. Dentre os exemplos pode-se citar a vacina contra o sarampo. Apesar das vacinas com o vírus do sarampo vivo atenuado serem eficientes e seguras no combate da doença, existe o problema de uma janela imunológica nos primeiros meses de vida, ela ocorre devido aos anticorpos maternos

inativarem o vírus atenuado antes que seja gerada uma resposta imune eficiente. Altos títulos virais e vacinas com o vírus inativado não são alternativas aceitáveis neste caso. Para tentar contornar este problema foram desenvolvidos dois vírus vaccinia recombinantes expressando a hemaglutinina e proteínas de fusão do vírus do sarampo, sendo que um deles utilizou o vetor replicativo WR e outro o vetor não replicativo MVA (ZHU *et al*, 2000).

A vacina foi inoculada em macacos rhesus aos dois meses de idade, sendo estes mesmos macacos desafiados com o vírus do sarampo através da via intranasal aos cinco meses de idade. Alguns dos macacos recém nascidos receberam a imunoglobulina contra sarampo antes da primeira imunização e estes foram comparados aos infantes que possuíam o anticorpo neutralizante materno. Na ausência do anticorpo contra o sarampo, a vacinação com ambos os vetores induziu anticorpos neutralizantes e resposta de CTL específicos para o vírus do sarampo e proteção contra o sarampo sistêmico e erupções cutâneas. Sendo que os filhotes vacinados com o vetor MVA desenvolveram títulos menores de anticorpos neutralizantes para o vírus do sarampo do que os vacinados com WR, além disto, eles sofreram uma viremia transiente de sarampo durante o desafio. Tanto os anticorpos maternos quanto os passivamente transferidos bloquearam a resposta humoral contra a vacinação com ambos os vetores, e a frequência de respostas de CTL positiva diminuiu. Porém, apesar desta inibição da imunidade induzida por vacina, houve uma redução nos picos da carga viral e das erupções cutâneas depois do desafio em muitos dos filhotes com os anticorpos contra sarampo preexistentes. Devido a isto, a vacinação utilizando vetores recombinantes pode ser capaz de prevenir a doença severa que comumente acompanha o sarampo em infantes (ZHU *et al*, 2000).

Outro exemplo da utilização de vetores está na tentativa de criação de uma vacina contra a Leishmaniose, que afeta mais de doze milhões de pessoas no mundo, mas ainda não possui vacinas para uso clínico. Para prevenir esta doença em populações susceptíveis são necessárias vacinas que gerem uma resposta polarizada para Th 1. A vacina em desenvolvimento utiliza “priming-boosting” com DNA codificando tryparedoxina peroxidase (TRYP DNA) seguido por um vetor MVA expressando a mesma proteína (TRYP MVA). Apesar da aplicação de somente

TRYP DNA gerar níveis equivalentes de anticorpos e interferon gama, nos desafios com leishmania a estratégia utilizando MVA revelou possuir maior eficácia clínica. Isto devido a níveis mais altos de interferon gama esplênico e uma resposta mais polarizada para Th 1 mediante o desafio com o patógeno. Esta maior eficácia da estratégia que utiliza o MVA se traduziu na geração de uma proteção de longo prazo contra a leishmaniose murina, o que não foi detectado na estratégia que utiliza apenas TRYP DNA (STOBER *et al*, 2007).

Também está em desenvolvimento uma vacina voltada para o combate do coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV), tendo como base um componente de membrana deste vírus a proteína “Spike” (SARS-CoV S). Construiu-se dois vetores MVA contendo o gene que codifica SARS-CoV S completa, um não contendo um marcador de epítipo C-terminal (MVA S-HA) e outro não contendo (MVA S). As células infectadas, tanto com MVA S-HA quanto com MVA S sintetizaram uma proteína de 200 kDa, que foi reconhecida por anticorpos anti SARS-CoV S na análise de *Western blot*. Inoculações intranasais ou intramusculares, com MVA S em camundongos BALB c, gerou anticorpos séricos que reconheceram SARS S em ELISA e neutralizaram SARS-CoV *in vitro*. Além disso, a administração de MVA S por qualquer uma das vias gerou uma resposta imune protetora, como foi demonstrado pelos títulos reduzidos de SARS-CoV no alto e no baixo trato respiratório nos camundongos após o desafio. A transferência passiva do soro de camundongos imunizados com MVA S para camundongos “naive” também reduziu a replicação de SARS-CoV no trato respiratório após o desafio, demonstrando um papel dos anticorpos para S na proteção. A característica atenuada do MVA e a habilidade de MVA S em induzir anticorpos neutralizantes que protegem camundongos suportam o desenvolvimento futuro deste candidato à vacina (BISHT *et al*, 2004).

A vacina contra a malária está dentre as vacinas com os testes clínicos mais avançados. A doença, causada pelo *Plasmodium falciparum*, é um grande problema para a saúde global, causando a morte estimada de dois milhões e setecentas mil crianças a cada ano. Este problema vem aumentando conforme a resistência do parasita a drogas antimaláricas se torna mais freqüente e mosquito vetor desenvolve resistência aos inseticidas, tornando urgente a geração de uma vacina efetiva contra

este patógeno. Porém as estratégias tradicionais para a geração de vacinas, que se concentram em estimular a resposta imune humoral, não são efetivas (WEBSTER *et al*, 2005). Um indício da razão para esta ineficiência pode ser encontrada em murinos desafiados com parasita. Pois, neste modelo as células T CD8 desempenham um papel chave no desenvolvimento da resposta protetora contra parasitas no estagio do fígado (DOOLAN & HOFFMAN, 2000). Esta hipótese é reforçada pelo fato de que a malária severa é menos comum em crianças africanas que expressam HLA-B53, sugerindo um papel de células T específicas para HLA de classe 1 (HILL *et al*, 1991), e também pelo fato de que a imunidade em humanos induzida por esporozoítos irradiados é associada a respostas celulares (HERRINGTON *et al*, 1991). WEBSTER e colaboradores (2005), primariamente, desenvolveram uma vacina utilizando regimes de vacinação com “prime-boost”, envolvendo DNA plasmidial e um MVA recombinante, ambos codificando antígenos do estágio no fígado da malária. Esta primeira estratégia de vacinação demonstrou ser fortemente imunogênica para células T, mas somente capaz de induzir proteção parcial contra o desafio experimental de malária em humanos, manifestada como um atraso na parasitemia do patógeno. Isto levou a substituição do DNA plasmidial como o vetor de “priming” pelo *Fowlpox virus* recombinante FP9. Esta vacina foi capaz de gerar proteção estéril completa que pode durar por vinte meses. Este tipo de longevidade, com mais de dez meses, é sem precedentes em estudos para uma vacina contra a malária. Sendo que o candidato líder a vacina demonstrou conferir uma proteção mensurável de apenas até seis meses em voluntários não imunes (STOUTE *et al*, 1998), e esta proteção demonstrou não durar mais de nove semanas em um grande estudo de eficácia em campo (BOJANG *et al*, 2001). O estudo de WEBSTER e colaboradores (2005) demonstrou que os poxvirus FP9 e MVA utilizados em regimes de vacinação com “prime-boost” são seguros e imunogênicos para células T CD8 e CD4. Além disto, eles geraram níveis promissores de proteção efetiva mediada por células T em estudos de malária com voluntários humanos. Ainda resta ser determinado o quão bem, este candidato à vacina e poxvirus expressando outros antígenos de malária (PRIEUR *et al*, 2004), irão proteger contra a infecção e a doença em regiões endêmicas.

Dentre todas as vacinas com vetores poxvirais sendo desenvolvidas e testadas, a contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) é a com maior prioridade. Vacinas utilizando apenas DNA plasmideal têm produzido respostas celulares fracas em macacos, mas no regime de “prime/boost”, em conjunto com vetores virais que receberam os mesmos componentes gênicos, têm gerado respostas muito mais fortes (SHIVER *et al*, 2002; HANKE *et al*, 1999; ALLEN *et al*, 2000). Vacinas contra o HIV baseadas em vetores poxvirais têm sido desenvolvidas utilizando *Canarypox virus* (EGAN *et al*, 1995; BOYER *et al*, 2000), FPV (KENT *et al*, 1998), MVA (PETERS *et al*, 2007) e NYVAC (GÓMEZ *et al*, 2007). Porém, até esta data, a resposta imune nos testes clínicos tem sido pequena quando comparada com a resposta das mesmas vacinas em macacos, sendo que os testes clínicos de fase 3 não têm demonstrado atividade protetora contra a infecção (McCARTHY, 2003). O objetivo agora é melhorar a resposta imune no homem, isto poderia ser atingido por aumento da dose ou do número de imunizações ou testando se diferentes vias de inoculação. Candidatos a vacina baseados em MVA têm induzido resposta celular específica, em macacos rhesus, para o vírus da imunodeficiência símia (SIV) (SETH *et al*, 1998) e para o HIV (HANKE *et al*, 1999; ALLEN *et al*, 2000; NKOLOLA *et al*, 2004). Além disto, têm induzido proteção contra a SIV em macacos (HIRSCH *et al*, 1996; OURMANOV *et al*, 2000; SETH *et al*, 2000). Estes resultados têm suportado o desenvolvimento de diversas vacinas utilizando DNA/MVA contra o HIV (SMITH *et al*, 2004; CEBERE *et al*, 2006; MWAU *et al*, 2004). Porém devido à falta de replicação destes vetores a resposta imune pode ser diminuída, porém isto pode ser resolvido pela inserção de genes que a estimulam. Para isto têm sido construídos vetores que expressam interleucina 12 e interferon gama, e estes vetores têm apresentado uma resposta imune aprimorada (ABAITUA *et al*, 2006). Outra vantagem na utilização dos vetores poxvirais contra HIV, é que estes podem ser administrados e demonstram gerar imunidade nas mucosas, isto é de grande importância devido ao fato desta ser a primeira barreira que este vírus encontra. Esta importância é ressaltada, também, pelo o impacto deste vírus em tecidos com mucosa, que é enfatizado pela rápida e marcante depleção de células T CD4 que residem no trato gastrointestinal e outros tecidos com mucosa, incluindo os pulmões e a vagina (BRENCHLEY *et al*, 2004; MEHANDRU *et al*, 2004).

6. BIBLIOGRAFIA

ABAITUA, F.; RODRÍGUEZ, J.R.; GARZÓN, A.; RODRÍGUEZ, D. & ESTEBAN, M. Improving recombinant MVA immune responses: potentiation of the immune responses to HIV-1 with MVA and DNA vectors expressing Env and the cytokines IL-12 and IFN-gamma. *Virus Research*, v. 116, p. 11-20. 2006.

ALCAMI, A.; SYMONS, J. A.; KHANNA, A. & SMITH, G. L. Poxviruses: capturing cytokines and chemokines. *Seminars in Virology*, v. 5, p. 419-427. 1998.

ALLEN, T.M.; VOGEL, T.U.; FULLER, D.H.; MOTHE, B.R.; STEFFEN, S.; BOYSON, J.E.; et al. Induction of AIDS virus-specific CTL activity in fresh, unstimulated peripheral blood lymphocytes from rhesus macaques vaccinated with a DNA prime/modified vaccinia virus Ankara boost regimen. *Journal of Immunology*, v.164, p. 4968–4978. 2000.

ANTOINE, G.; SCHEIFLINGER, F.; DORNER, F. & FALKNER, F.G. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology*, v. 244, p.365–396. 1998.

BALDICK, C. J., JR.; KECK, J. G. *et al.* Mutational analysis of the core, spacer, and initiator regions of vaccinia virus intermediate-class promoters. *Journal of Virology*, v.66, p.4710-4719. 1992.

BLANCHARD, T.J.; ALCAMI, A.; ANDREA, P. & SMITH, G.L. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *Journal of General Virology*, v. 79, p. 1159–1167. 1998.

BLANCOU, J.; KIENY, M.P.; LATHE, R.; LECOQ, J.P.; PASTORET, P.P.; SOULEBOT, J.P. & DESMETTRE, P. Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature*, v. 322, p. 373–375. 1986.

BOJANG, K. A.; MILLIGAN, P. J.; PINDER, M.; VIGNERON, L.; ALLOUECHE, A.; KESTER, K. E.; BALLOU, W. R.; CONWAY, D. J.; REECE, W. H.; GOTHARD, P.; *et al.* Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-

immune adult men in The Gambia: a randomised trial. *Lancet*, v. 358, p. 1927-1934. 2001.

BONNET, M.C.; TARTAGLIA, J.; VERDIER, F.; KOURLISKY, P.; LINDBERG, A.; KLEN, M.; et al. Recombinant viruses as a tool for therapeutic vaccination against human cancers. *Immunology letters*, v. 74, p. 11–25. 2000.

BOYER, J.D.; COHEN, A.D.; VOGT, S.; SCHUMANN, K.; NATH, B.; AHN, L.; et al. Vaccination of seronegative volunteers with a human immunodeficiency virus type 1 env/rev DNA vaccine induces antigen-specific proliferation and lymphocyte production of beta-chemokines. *Journal of Infectious Diseases*, v.181, p. 476–483. 2000.

BRENCHLEY, J. M.; SCHACKER, T. W.; RUFF, L. E.; et al . CD4⁺ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *Journal of Experimental Medicine*. v. 200, 749–759. 2004.

BROCHIER, B.; KIENY, M.P.; COSTY, F.; COPPENS, P.; BAUDUIN, B.; LECOCQ, J.P.; LANGUET, B.; CHAPPUIS, G.; DESMETTRE, P.; AFIADEMANYO, K.; LIBOIS, R. & PASTORET, P.P. Large-scale eradication of rabies with a recombinant vaccinia– rabies virus. *Nature*, v. 354, p. 520–522. 1991.

BROCHIER, B.; LANGUET, B.; BLANCOU, J.; THOMAS, I.; KIENY, M.P.; COSTY, F.; DESMETTRE, P. & PASTORET, P.P. Use of recombinant vaccinia-rabies virus for oral vaccination of wildlife against rabies: immunity to several nontarget bait-consuming species. *Journal of Wild Diseases*, v. 25, p. 540. 1989.

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

BÜCHEN-OSMOND, C. *Poxviridae*. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed), ICTVdB Management, Columbia University, New York, USA. 2003.

BULLER, R.M.L. & PALUMBO, G.J. Poxvirus Pathogenesis. *Microbiological Reviews*, v. 55, p. 80 – 122, 1991.

CARROLL, M.W. & MOSS, B. Host range and cytopathogenicity of highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. *Virology*, v. 238, p. 198–211. 1997.

CARROLL, M.W.; OVERWIJK, W.W.; CHAMBERLIAN, R.S.; ROSENBERG, S.A.; MOSS, B. & RESTIFO, N.P. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara (MVA) as an effective recombinant vector: a murine tumor model. *Vaccine*, v. 15, p. 387–394. 1997.

CARTER, G. C.; LAW, M. *et al.* Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. *Journal of General Virology*, v.86, p.1279-1290. 2005.

CEBERE, I.; DORRELL, L.; MCSHANE, H.; SIMMONS, A.; MCCORMACK, S.; SCHMIDT, C.; *et al.* Phase I clinical trial safety of DNA- and modified virus Ankara-vectored human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vaccines administered alone and in a prime-boost regime to healthy HIV-1-uninfected volunteers. *Vaccine*, v. 24, p. 417–425. 2006.

CHAUDHRI, G; PANCHANATHAN, V; BLUETHMANN, H; KARUPIAH, G. Obligatory requirement for antibody in recovery from a primary poxvirus infection. *Journal of Virology*, v. 80, p. 6339-6344. 2006.

CHUNG, C. S.; HUANG, C. Y. *et al.* Vaccinia virus penetration requires cholesterol and results in specific viral envelope proteins associated with lipid rafts. *Journal of Virology*, v.79, p.1623-1634. 2005.

CONDIT, R. C. & NILES, E. G. Regulation of viral transcription elongation and termination during vaccinia virus infection. *Biochimica et biophysica acta*, v.1577, p.325-36. 2002.

CYRKLAFF, M; RISCO, C; FERNÁNDEZ, J. J; JIMÉNEZ, M. V; ESTÉBAN, M; BAUMEISTER, W; CARRASCOSA, J. L. Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, p. 2772-2777. 2005.

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

DAMASO, C. R. A.; ESPOSITO, J. J.; CONDIT, R. C.; MOUSSATCHÉ, N. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro state: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology*, v. 277, p. 439-449. 2000.

DOOLAN, D.L. & HOFFMAN, S.L. The complexity of protective immunity against liver-stage malaria. *Journal of Immunology*, v. 165, p.1453-1462. 2000.

DRANOFF, G., *et al.* Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony stimulating factor stimulates potent, specific, and long lasting anti-tumor immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v.90, p.3539–3543. 1993.

DREXLER, I.; HELLER, K.; WAHREN, B.; ERFLE, V. & SUTTER, G. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *Journal of General Virology*, v. 49, p. 347–352. 1998.

DREXLER, I.; STAIB, C. & SUTTER, G. Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential? *Current Opinion in Biotechnology*, v.15, p, 1–7. 2004.

EARL, P. L.; COOPER, N.; WYATT, L., MOSS, B. & CARROL, M W. Preparation of cell cultures and vaccinia virus stocks In AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MEN, R.; WYATT, L.; TOKIMATSU, I.; ARAKAKI, S.; SHAMEEN, G.; ELKINS, R.; CHANOCK, R.; MOSS, B. & LAI, C. J. Immunization of rhesus monkeys with a recombinant of modified vaccinia virus Ankara expressing a truncated envelope glycoprotein of dengue type 2 virus induced resistance to dengue type 2 virus challenge. *Vaccine*, v. 18, p. 3113-3122. 2000.

EGAN, M.A.; PAVLAT, W.A.; TARTAGLIA, J.; PAOLETTI, E.; WEINHOLD, K.J., CLEMENTS, M.L.; *et al.* Induction of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytolytic T lymphocyte responses in seronegative adults by a nonreplicating, host-

range-restricted canarypox vector (ALVAC) carrying the HIV-1MN env gene. *Journal of Infectious Diseases*, v.171, p. 1623–1627. 1995.

ESPY, M.J.; COCKERILL, F.R.; MEYER, R.F.; BOWEN, M.D.; POAND, G.A.; HADFIELD, T.L. & SMITH, T.F. Detection of Smallpox Virus DNA by LyghtCycler PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 1985-1988. 2002.

FANG, M & SIGAL, L. J. Antibodies and CD8+ T cells are complementary and essential for natural resistance to a highly lethal cytophatic virus. *The Journal of Immunology*, p. 6829-6836. 2005.

FENG, Y.; BRODER, C.C.; KENNEDY, P.E. & BERGER, E.A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, v. 272, p. 872–877. 1996.

FENNER, F.; WITTEK, R. & DUMBELL, K. R. *The Orthopoxviruses*. 1^a ed. San Diego: Academic Press, 1989. p.432

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

GÓMEZ, C.E.; NÁJERA, J.L.; JIMÉNEZ, E.P.; JIMÉNEZ, V.; WAGNER, R.; GRAF, M.; FRACHETTE, M.J.; LILJESTRÖM, P.; PANTALEO, G. & ESTEBAN, M. Head-to-head comparison on the immunogenicity of two HIV/AIDS vaccine candidates based on the attenuated poxvirus strains MVA and NYVAC co-expressing in a single locus the HIV-1BX08 gp120 and HIV-1(IIIB) Gag-Pol-Nef proteins of clade B. *Vaccine*. v. 25, p. 2863-2885. 2007.

GREINER, S.; HUMRICH, J.Y.; THUMAN, P.; SAUTER, B.; SCHULER, G. & JENNE, L.. The highly attenuated vaccinia virus strain modified virus Ankara induces apoptosis in melanoma cells and allows bystander dendritic cells to generate a potent anti-tumoral immunity. *Clinical and experimental immunology*. v.146, p. 344-353. 2006.

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

HAMMARLUND, E; LEWIS, M. W; CARTER, S. V; AMANNA, I; HANSEN, S. G; STRELOW, L. I; WONG, S. W; YOSHIHARA, P; HANIFIN, J. M & SLIFKA, M. K. Multiple diagnostic techniques identify previously vaccinated individuals with protective immunity against monkeypox. *Nature Medicine*, v. 11, p. 1005-1011. 2005.

HAMMARLUND, E; LEWIS, M. W; HANSEN, S. G; STRELOW, L. I; NELSON, J. A; SEXTON, G. J; HANIFIN, J. M & SLIFKA, M. K. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nature Medicine*, v. 9, p. 1131-1136. 2003.

HANGARTNER, L; ZINKERNAGEL, R. M & HENGARTNER, H. Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. *Nature Reviews Immunology*, v. 6, p. 231-243. 2006.

HANKE, T.; MCMICHEAL, A.J.; SAMUEL, R.V.; POWELL, L.A.J.; MCLOUGHLIN, L.; CROME, S.J.; et al. Lack of toxicity and persistence in the mouse associated with administration of candidate DNA and modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based HIV vaccine for Kenya. *Vaccine*, v. 21, p. 108–114. 2002.

HANKE, T.; SAMUEL, R.V.; BLANCHARD, T.J.; NEUMANN, V.C.; ALLEN, T.M.; BOYSON, J.E.; et al. Effective induction of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in macaques by using a multiepitope gene and DNAprime-modified vaccinia virus Ankara boost vaccination regimen. *Journal of Virology*, v. 73, p. 7524–7532. 1999.

HATAKEYAMA, S; MORIYA, K; SAIJO, M; MORISAWA, Y; KURANE, I; KOIKE, K; KIMURA, S & MORIKAWA, S. Persisting humoral antiviral immunity within Japanese population after the discontinuation in 1976 of routine smallpox vaccinations. *Clinical Diagnostic and Laboratory Immunology*, v. 12, p. 520-524. 2005.

HERRINGTON, D.; DAVIS, J.; NARDIN, E.; BEIER, M.; CORTESE, J.; EDDY, H.; LOSONSKY, G.; HOLLINGDALE, M.; SZTEIN, M.; LEVINE, M.; et al. Successful immunization of humans with irradiated malaria sporozoites: humoral and cellular responses of the protected individuals. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 45, p. 539-547. 1991.

HERSEY, P.; COATES, A.S.; MCCARTHY, W.H. *et al.* Adjuvant immunotherapy of patients with high-risk melanoma using vaccinia viral lysates of melanoma: results of a randomized trial. *Journal of Clinical Oncology*, v. 20, p.4181–4190. 2002.

HILL, A. V.; ALLSOPP, C. E. KWIATKOWSKI, D.; ANSTEY, N. M.; TWUMASI, P.; ROWE, P. A.; BENNETT, S.; BREWSTER, D.; MCMICHAEL, A. J. & GREENWOOD, B. M. Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature*, v. 352, p. 595-600. 1991.

HIRSCH, V.M.; FUERST, T.R.; SUTTER, G.; CARROLL, M.W.; YANG, L.C.; GOLDSTEIN, S.; *et al.* Patterns of viral replication correlate with outcome in simian immunodeficiency virus (SIV)-infected macaques: effect of prior immunization with a trivalent SIV vaccine in modified vaccinia virus Ankara. *Journal of Virology*, v.70, p. 3741–3752. 1996.

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

JACKSON, R. J; RAMSAY, A. J; CHRISTENSEN, C. D; BEATON, S; HALL. D. F & RAMSHAW, I. A. Expression of mouse interleukin-4 by a recombinant ectromelia virus suppresses cytolytic lymphocyte responses and overcome genetic resistance to mousepox. *Journal of Virology*, v. 75, p. 1205-1210. 2001.

JANKOVIC, D; LIU, Z & GAUSE, W. C. Th1 and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *TRENDS in Immunology*, v. 22, p. 450-457. 2001.

JENNE, L.; SCHULER, G. & STEINKASSERER, A.. Viral vectors for dendritic cell-based immunotherapy. *Trends in Immunology*. v. 22, p. 102–107. 2001.

JOHNSON, D. C; HUBER, M. T. Directed egress of animal viruses promote cell-to-cell spread. *Journal of Virology*, v. 76, p. 1-8. 2002.

JOHNSTON, J. B. & MCFADDEN, G. Poxvirus immunomodulatory strategies: current perspectives. *Journal of Virology*, v. 77, p. 6093-6100. 2003.

KAREM, K. L.; REYNOLDS, M.; BRADEN, Z.; LOU, G.; BERNARD, N.; PATTON, J.; DAMON, I. K. Characterization of acute-phase humoral immunity to monkeypox: use of immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay for detection of monkeypox infection during the 2003 north America outbreak. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 12, p. 867-872. 2005.

KAUFMAN, H.L.; KIM-SCHULZE, S.; MANSON, K.; DERAFFELE, G.; MITCHAM, J.; SEO, K.S.; KIM, D.W. & MARSHALL J. Poxvirus-based vaccine therapy for patients with advanced pancreatic cancer. *Journal of translational medicine*. v. 26. 2007.

KENT, S.J.; ZHAO, A.; BEST, S.J.; CHANDLER, J.D.; BOYLE, D.B. & RAMSHAW, I.A. Enhanced T-cell immunogenicity and protective efficacy of a human immunodeficiency virus type 1 vaccine regimen consisting of consecutive priming with DNA and boosting with recombinant *Fowlpox virus*. *Journal of Virology*, v.72, p. 10180–10188. 1998.

KIENY, M.P.; LATHE, R.; DRILLIEN, R.; SPEHNER, D.; SKORY, S.; SCHMITT, D.; WIKTOR, T.; KOPROWSKI, H. & LECOCQ, J.P. Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature*, v. 312, p. 163–6. 1984.

KIM, E.M.; SIVANANDHAM, M.; STAVROPOULOS, C.I.; BARTOLUCCI, A.A. & WALLACK M.K.. Overview analysis of adjuvant therapies for melanoma - a special reference to results from vaccinia melanoma oncolysate adjuvant therapy trials. *Surgical oncology* v. 10, p.53–59. 2001.

KIRN, D.H.; WANG, Y.; LE BOEUF, F.; BELL, J. & THORNE, S.H. Targeting of interferon-beta to produce a specific, multi-mechanistic oncolytic vaccinia virus. *PLoS Medicine*. v.4, p. 2007.

KOURILSKY, P. & TRUFFA-BACHI, P. Cytokine fields and the polarization of the immune response. *TRENDS in Immunology*, v. 22, n. 9, p. 502-509. 2001.

LATTIME, E.C.; LEE, S.S.; EISENLOHR, L.C. & MASTRANGELO, M.J. In situ cytokine gene transfection using vaccinia virus vectors. *Seminars on Oncology*. v.23, p. 88–100. 1996.

LAW, M.; CARTER, G. C. *et al.* Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.103, p.5989-5994. 2006.

LEITE, J. A; DRUMOND, B. P; TRINDADE, G. S; LOBATO, Z. I. P; DA FONSECA, F. G; SANTOS, J. R; MADUREIRA, M. C; GUEDES, M I. M. C; FERREIRA, J. M. S; BONJARDIM, C. A; FERREIRA, P. C. P & KROON, E. G. Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 11, p. 1935-1938. 2005.

LEVINE, M.M. & SZTEIN, M.B. Vaccine development strategies for improving immunization: the role of modern immunology. *Nature Immunology*. v. 5, p. 460-464. 2004.

LEWIS, F. M. T; CHERNAK, E; GOLDMAN, E; LI, Y; KAREM, K; DAMON, I. K; HENKEL, R; NEWBERN, E. C; ROSS, P & JOHNSON, C. C. Ocular Vaccinia infection in laboratory worker, Philadelphia, 2004. *Emerging Infectious Diseases*, v. 12, p. 134-137. 2006.

LUSTIG, S; FOGG, C; WHITBECK, J. C; EISENBERG, R. J; COHEN G. H & MOSS, B. Combinations of polyclonal or monoclonal antibodies to proteins of the outer membranes of the two infectious forms of vaccinia virus protect mice against a lethal respiratory challenge. *Journal of Virology*, v. 79, p. 13454-13462. 2005.

MACKETT, M.; SMITH, G. L. & MOSS, B. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 79, p. 7415-7419. 1982.

MALLARDO, M.; LEITHE, E.; SCHLEICH, S.; ROSS, N.; DOGLIO, L. & LOCKER, J. K. Relationship between Vaccinia virus intracellular cores, early mRNAs, and DNA replication sites. *Journal of Virology*. v. 76, p. 5167-5183, 2002.

MALKIN, A. J; MCPHERSON, A & GERSHON, P. D. Structure of intracellular mature vaccinia virus visualized by in situ atomic force microscopy. *Journal of Virology*, v. 77, p. 6332-6340. 2003.

MASTRANGELO, M.J.; *et al.* A pilot study demonstrating the feasibility of using intratumoral vaccinia injections as a vector for gene transfer. *Vaccine Res.* v.4, p. 55–69. 1995.

MASTRANGELO M. J.; EISENLOHR, L. C.; GOMELLA, L. & LATTIME, E. C. Poxvirus vectors: orphaned and underappreciated. . *The Journal of clinical investigation*, v. 105, p. 1031-1034. 2000.

MASTRANGELO, M.J. & LATTIME, E.C.. Virotherapy clinical trials for regional disease: *in situ* immune modulation using recombinant poxvirus vectors. *Cancer Gene Therapy*. v. 9, p. 1013–1021. 2002.

MCCARTHY, M. HIV vaccine fails in phase 3 trial. *Lancet*, v. 361, p. 755–756. 2003

MCFADDEN, G. Poxvirus tropism. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, p. 201-213. 2005.

MCFADDEN, G. & BARRY, M. How poxviruses oppose apoptosis. *Seminars in Virology*, v. 8, p. 429-442. 1998.

MEYER, H.; SUTTER, G. & MAYR, A. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *Journal of General Virology*, v. 7, p. 1031–1308. 1991.

MEHANDRU, S.; POLES, M. A.; TENNER-RACZ, K.; HOROWITZ, A.; HURLEY, A.; HOGAN, C.; BODEN, D.; RACZ, P. & MARKOWITZ, M. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4⁺ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *Journal of Experimental Medicine*. v. 200, p. 761–770. 2004.

MERCHLINSKY, M.; ECKERT, D.; SMITH, E. & ZAUDERER, M. Construction and characterization of vaccinia direct ligation vectors. *Virology*. v. 238, p. 444–451. 1997.

MEYER, R.G.; BRITTEN, C.M.; SIEPMANN, U. *et al.* A phase I vaccination study with tyrosinase in patients with stage II melanoma using recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA-hTyr). *Cancer immunology, immunotherapy*. v. 54, p. 453–467. 2005.

MINEV, B.R.; CHAVEZ, F.L. & MITCHELL, M.S. Cancer vaccines: novel approaches and new promise. *Pharmacology & therapeutics*, v. 81, p. 121–139. 1999.

MOORTHY, V.S.; MCCONKEY, S.; ROBERT, M.; GOTHARD, P.; ARULANANTHAM, N.; DEGANO, P.; et al. Safety of DNA and modified vaccinia virus Ankara vaccines against liver-stage *P. falciparum* malaria in non-immune volunteer. *Vaccine*, v. 21, p. 1995–2000. 2003.

MOSS, B. *Poxviridae: The viruses and their replication*. IN *Fundamental Virology*. Forth Edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

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

MWAU, M.; CEBERE, I.; SUTTON, J.; CHIKOTI, P.; WINSTONE, N.; WEE, E.G.; et al. A human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) clade A vaccine in clinical trials: stimulation of HIV-specific T-cell responses by DNA and recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA) vaccines in humans. *Journal of General Virology*, v. 85, p. 911–919. 2004.

NEWSOME, T. P.; SCAPLEHORN, N. *et al.* SRC mediates a switch from microtubule- to actin-based motility of vaccinia virus. *Science*, v.306, p.124-129. 2004.

NKOLOLA, J.P.; WEE, E.G.; IM, E.J.; JEWELL, C.P.; CHEN, N.; XU, X.N.; et al. Engineering RENTA, a DNA prime-MVA boost HIV vaccine tailored for Eastern and Central Africa. *Gene Therapy*, v.11, p. 1068–1080. 2004.

OERTLI, D.; MARTI, W.R.; ZAJAC, P. *et al.* Rapid induction of specific cytotoxic T lymphocytes against melanoma-associated antigens by a recombinant vaccinia virus vector expressing multiple immunodominant epitopes and co-stimulatory molecules *in vivo*. *Human Gene Therapy*. v. 13, p. 569–575. 2002.

OURMANOV, I.; BROWN, C.R.; MOSS, B.; CARROLL, M.; WYATT, L.; PLETNEVA, L.; et al. Comparative efficacy of recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing simian immunodeficiency virus (SIV) Gag-Pol and/or Env in macaques challenged with pathogenic SIV. *Journal of Virology*, v.74, p. 2740–2751. 2000.

PANICALI, D., & PAOLETTI, E. Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 79, p. 4927-4931. 1982.

PAOLETTI, E. Applications of pox virus vectors to vaccination: An update. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 93, p. 11349-11353. 1996.

PASTORET, P.P.; BROCHIER, B.; BLANCOU, J.; ARTOIS, M.; AUBERT, M.; KIENY, M.P.; LECOCQ, J.P.; LANGUET, P.; CHAPPUIS, G. & DESMETTRE, P. Recombinant poxviruses. In: Binns MM, Smith GL, editors. Development and deliberate release of a vaccinia-rabies recombinant virus for the oral vaccination of foxes against rabies. Boca Raton: CRC Press; 1992.

PASTORET, P.P.; BROCHIER, B.; LANGUET, B.; THOMAS, I.; PAQUOT, A.; BAUDUIN, B.; KIENY, M.P.; LECOCQ, J.P.; DEBRUYN, J.; COSTY, F.; ANTOINE, H. & DESMETTRE, P. First field trial of fox vaccination against rabies with a vaccinia-rabies recombinant virus. *The Veterinary Record*, 123, p. 481-483. 1988.

PASTORET, P.P. & VANDERPLASSCHEN, A. Review: Poxviruses as vaccine vectors. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, v.26, p. 343-355. 2003.

PETERS, B.S.; JAOKO, W.; VARDAS, E.; PANAYOTAKOPOULOS, G.; FAST, P.; SCHMIDT, C.; GILMOUR, J.; BOGOSHI, M.; OMOSA-MANYONYI, G.; DALLY, L.; KLAVINSKIS, L.; FARAH, B.; TARRAGONA, T.; BART, P.A.; ROBINSON, A.; PIETERSE, C.; STEVENS, W.; THOMAS, R.; BARIN, B.; MCMICHAEL, A.J.; MCINTYRE, J.A.; PANTALEO, G.; HANKE, T. & BWAYO, J. Studies of a prophylactic HIV-1 vaccine candidate based on modified vaccinia virus Ankara (MVA) with and without DNA priming: effects of dosage and route on safety and immunogenicity. *Vaccine*. v. 25, p. 2120-2127. 2007.

PRIEUR, E.; GILBERT, S. C.; SCHNEIDER, J.; MOORE, A. C.; SHEU, E. G.; GOONETILLEKE, N.; ROBSON, K. J. & HILL, A. v. Plasmodium falciparum candidate vaccine based on a six-antigen polyprotein encoded by recombinant poxviruses. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, v. 101, p. 290-295. 2004.

RAMÍREZ, J.C.; GHERARDI, M.M. & ESTEBAN, M. Biology of attenuated modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and activation of B- and T-cell immune responses in comparison with the Western Reserve strain and advantages as a vaccine. *Journal of Virology*, v. 74, p. 923–933. 2000.

SEET, B. T.; JOHNSTON, J. B. *et al.* Poxviruses and immune evasion. *Annual review of immunology*, v.21, p.377-423. 2003.

SEPKOWITZ, K. A. How contagious is vaccinia? *New England Journal of Medicine*, v. 348, n. 5, p. 439-446. 2003.

SETH, A.; OURMANOV, I.; KURODA, M.J.; SCHMITZ, J.E.; CARROLL, M.W.; WYATT, L.S.; *et al.* Recombinant modified vaccinia virus Ankara-simian immunodeficiency virus gag pol elicits cytotoxic T lymphocytes in rhesus monkeys detected by a major histocompatibility complex class I/peptide tetramer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.95, p. 10112–10116. 1998.

SETH, A.; OURMANOV, I.; SCHMITZ, J.E.; KURODA, M.J.; LIFTON, M.A.; NICKERSON, C.E.; *et al.* Immunization with a modified vaccinia virus expressing simian immunodeficiency virus (SIV) Gag-Pol primes for an anamnestic Gag-specific cytotoxic T-lymphocyte response and is associated with reduction of viremia after SIV challenge. *Journal of Virology*, v.74, p. 2502–2509. 2000.

SHIVER, J.W.; FU, T.M.; CHEN, L.; CASIMIRO, D.R.; DAVIES, M.E.; EVANS, R.K.; *et al.* Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature*, v. 415, p. 331–335. 2002.

SMITH, E. S.; MANDOKHOT, A.; EVANS, E. E.; MUELLER, L.; BORRELLO, M. B.; SAHASRABUDHE, D. M. & ZAUDERER, M. Letality-based selection of recombinant genes in mammalian cells: Application to identifying tumor antigens. *Nature Medicine*. v.7, p. 967-972. 2001.