

Desyreé Murta Franco Xavier de Jesus

**Estudo da atividade antiviral do
Cidofovir sobre a replicação dos vírus
Cantagalo e vaccinia cepa IOC**

Dissertação submetida ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da
Universidade Federal do Rio de Janeiro, visando à obtenção do grau de
mestre em Ciências Biológicas (Biofísica)

2007



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Vírus do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ, sob orientação da Dra. Clarissa Rosa de Almeida Damaso e com auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), International Foundation for Science (IFS) e pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

FICHA CATALOGRÁFICA

Jesus, Desyreé Murta Franco Xavier

Atividade antiviral do Cidofovir: efeito sobre a expressão gênica e a morfogênese dos vírus Cantagalo e vaccínia cepa IOC. Rio de Janeiro, UFRJ, IBCCF, 2007.

xii, 103 f.

Dissertação: Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica)

- | | |
|--------------------|-------------------|
| 1. vírus Cantagalo | 2. vírus vaccínia |
| 3. vaccinia-IOC | 4. Cidofovir |

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Dedico esta tese à minha família: minha mãe, meu irmão e meu pai, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e me incentivando e que fizeram com que eu me tornasse a pessoa que sou hoje.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por te me colocado nos caminhos corretos e por me iluminar a cada minuto de minha vida, além de me presentear com pessoas maravilhosas.

À Clarissa por todos os ensinamentos e por toda preocupação e paciência. Mesmo com todos os problemas, nunca deixou de cumprir com seus deveres.

Ao Nissin por todas as discussões dos resultados e por todas as brincadeiras e cantorias.

Juntamente ao Nissin e à Clarissa por apostarem e acreditarem no meu potencial, mesmo quando eu mesma não acreditava e por todos os conselhos em relação a minha vida profissional.

À professora Marcia Attias, que me auxiliou na preparação das amostras para microscopia eletrônica de transmissão.

Agradeço a minha família: minha mãe, meu pai e meu irmão. Minha mãe, por ser minha melhor amiga e estar comigo em todos os momentos me dando força nos difíceis e se orgulhando nos bons momentos. Por todas as conversas e conselhos e por existir em minha vida, minha luz maior, meu exemplo de força. Ao meu pai, por me amar incondicionalmente, estar sempre do meu lado e, claro, por todas as vezes que ele foi me buscar à noite quando eu saía com os amigos, sem reclamar, e dando força para eu me divertir. Ao meu irmão pelas brincadeiras bobas, que só irmãos que se amam entendem, e que tanto me divertem. Também agradeço pela compreensão sempre que eu pedia para ele sair do computador (que ele ama) para eu poder usar (e ficar o dia todo!), mesmo quando ele estava de férias... Amo você, meu melhor amigo, e não sei viver sem você! Às minhas tias, Laura e Zaira, ao meu primo querido, Julinho, futuro afilhado.

Deixo um muito obrigado a todos os amigos que fiz no laboratório durante esses 4 anos: Élide (pelos elogios e por todas as brincadeiras), Cristiana, Priscila e Daniel (por alegrarem meus dias com todas as conversas), Ademílson (que apesar de reclamar de tudo, é super engraçado e tem ótimas opiniões também sobre vários assuntos, né Adê?). Vocês já tem espaço garantido no meu coração! E especialmente a duas pessoas que eu me sinto feliz por ter conhecido: Sheila, por todas as conversas, elogios, broncas, conselhos e auxílios com o que quer que fosse e sempre com boa vontade e Patrícia, pela amizade diária e também pelos conselhos, ajudas e por todas as coisas boas que ela sempre diz sobre mim (um pouco exageradas, mas...). Amo todos vocês! Nossa amizade será eterna.

E também aos amigos que seguiram outros rumos: Ana Paula e Aretusa, que torcem sempre por mim... Ao Lúcio, que sempre me deve um chocolate, mas nunca me dá. À Haynna, minha grande amiga, por me ouvir sempre e por toda a sua amizade, todas as conversas no msn e toda a compreensão, afinal, somos muito parecidas!! Te adoro!

A todos os colegas da Biofísica, que sempre me auxiliaram quando precisei (posso usar seu equipamento? Me empresta esse reagente?) e que me divertem...

Aos velhos amigos, mas que nem por isso perderam sua importância: Berta por suas opiniões sempre muito bem-vindas, Camila pelas conversas infundáveis e a ambas pelas ótimas lembranças de uma época que está guardada para sempre e pela amizade indescritível. Priscila, pelos nossos 23 anos de amizade! Por todo o apoio, por não se esquecer de mim mesmo quando estávamos separadas, por ser minha irmã de coração e pelas conversas até as 6 horas da manhã! E por todos os momentos inesquecíveis. Aos meus amigos queridos da faculdade:

Cintia, Jefferson, Nívea, Éthel e Rodrigo, pelas viagens e pelos conselhos, pela força em todos os momentos. Por me fazerem sentir que estão sempre ao meu lado mesmo quando ficamos um tempão sem nos vermos. Não sei o que seria da minha vida sem vocês!

À minha querida afilhada Nathália, por me amar e me ver como um exemplo. Isso é muito gratificante. E aos seus irmãos, Luana e Patrick, por toda a atenção a mim dispensada nas minhas visitas! Crianças são divinas! Amo vocês muito mesmo!!

Agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, estiveram ao meu lado e me encorajaram. Eu amo todos vocês e só consigo acordar todos os dias e me levantar feliz porque sei que vocês existem! Obrigada!

“E eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos! Até mesmo aqueles que não percebem o quanto são meus amigos e o quanto minha vida depende de suas existências... A alguns deles não procuro, basta-me saber que eles existem. Esta mera condição me encoraja a seguir em frente pela vida” (Vinicius de Moraes).

Resumo

O vírus Cantagalo (CTGV) foi isolado em 1999 de lesões em gado leiteiro e dos retireiros no estado do Rio de Janeiro. Foi caracterizado como uma cepa do vírus vaccínia (VACV), membro da família *Poxviridae*. Sua origem provável é a cepa IOC, utilizada para vacinação anti-variólica no Brasil.

O cidofovir (CDV) é um análogo de nucleosídeo fosfonado que já demonstrou ação *in vivo* e *in vitro* contra diversos poxvírus. É a droga de escolha da OMS para o tratamento de infecções causadas por poxvírus. Sua ação ainda não foi analisada na replicação do CTGV e VACV-IOC, nem as fases do ciclo afetadas foram mapeadas.

Neste estudo, o CDV mostrou uma atividade antiviral dose-dependente em concentrações não citotóxicas. A inibição da formação de placas virais alcançou 100% para CTGV a partir de 10 µg/mL e 93% para VACV-IOC em 15 µg/mL. O IC₅₀ foi de 1,2 µg/mL para CTGV e 3,1 µg/mL para VACV-IOC. Assim, o CTGV se mostrou mais sensível à ação do CDV que o VACV-IOC. O pré-tratamento mostrou eficácia, havendo de 70 a 80% de inibição da formação de placas virais após 24 horas de tratamento. A incubação das células BSC-40 com até 200 µg/mL da droga não provocou toxicidade significativa.

Em altas concentrações da droga houve inibição de aproximadamente 80% para o acúmulo de DNA viral e de aproximadamente 70% para o acúmulo de proteínas virais tardias. Esses dados sugerem que a fase principal de ação do CDV seja a replicação do DNA viral.

Abstract

Cantagalo virus (CTGV) was isolated in 1999 from lesions on dairy cattle and milkers in Rio de Janeiro state. It was characterized as a strain of vaccinia virus (VACV), a member of the family *Poxviridae*. Its origin is probably the strain IOC that has been used for smallpox vaccination in Brazil.

Cidofovir (CDV) is a nucleoside phosphonate analog that has demonstrated *in vivo* and *in vitro* activity against several poxviruses. It is the drug of choice by WHO to treat poxvirus infections. Its action has not been analyzed on CTGV and VACV-IOC replication yet, nor have the affected phases of the cycle been mapped.

In this study, CDV showed a dose-dependent antiviral activity in non-cytotoxic concentrations. The inhibition of viral plaque formation reached 100% for CTGV above of 10 µg/mL and 93% for VACV-IOC at 15 µg/mL. The IC₅₀ was 1,2 µg/mL for CTGV and 3,1 µg/mL for VACV-IOC. The pre-treatment showed efficacy, with 70% to 80% inhibition of viral plaque formation after 24 hours of treatment. BSC-40 cells incubation with until 200 µg/mL of drug has not showed significative toxicity.

At high concentrations of drug there was inhibition of about 80% for viral DNA accumulation and of approximately 70% for viral late proteins accumulation. These data suggests that the step of action of CDV is the viral DNA replication.

Lista de Abreviaturas

6-HPMPO = 6-[3-hidroxi-2-(fosfonilmetoxi)propoxil]
6-PMEO = 6-[2-(fosfonometoxi)etoxil]
6-PMPO = 6-[2-(fosfonometoxi)propoxil]
ANP = análogo de nucleosídeo fosfonado
ATP = adenosina trifosfato
BSA = albumina sérica bovina
cAMP= AMP cíclico
CDV = cidofovir
CDVp = cidofovir monofosfato
CDVpp = cidofovir difosfato
CEV = vírus associado à célula
Ci = Currie
CMV = citomegalovírus
CPM = contagens por minuto
CTGV = vírus Cantagalo
CTP = citosina trifosfato
dATP = desoxiadenosina trifosfato
dCMP = desoxicitidina monofosfato
dCTP = desoxicitidina trifosfato
dGTP = desoxiguanina trifosfato
dNTP = deoxinucleotídeos trifosfato
dTTP = desoxitimidina trifosfato
DMEM = Dubelcco's Modified Eagle Medium (meio de Eagle modificado por Dubelcco)
DNA = ácido desoxirribonucléico
DTT = ditioneitol
EDTA = ácido etilenodiamino tetraacético
EEV = vírus envelopado extracelular
EV = vírus extracelular
FPMP = (S)-9[3-fluoro-2-(fosfonometoxi)propil]

HGPRT = hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase
HPMPA = (S)-9[3-fluoro-2-(fosfometoxi)propil] adenina
HPMPC = (S)-9[3-fluoro-2-(fosfometoxi)propil] citosina
HPMP = (S)-3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil
HBV = vírus da hepatite B
HIV = vírus da imunodeficiência adquirida
HSV = vírus herpes simplex
PME = 2-fosfonilmetoxietil
PMP = (R)-9-[(fosfometoxi)propil]
IgG = imunoglobulina G
IMP = inosina 5'-monofosfato
IOC = Instituto Oswaldo Cruz
IPTG = isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo
ITR = inverted terminal repeats (regiões terminais invertidas)
IV = vírus imaturo
IVN = vírus imaturo com nucleóide
kpb = pares de kilobases
mA = miliampere
MEM = minimum essential medium (meio mínimo essencial)
mm = milímetro
MOI = multiplicidade de infecção
MV = vírus maduro
nm = nanômetro
NP-40 = nonidet P-40
NTB = nick translation buffer
NYCBH = New York City Board of Health
OMP = orotidina 5'-monofosfato
OMS = Organização Mundial de saúde
ORF = open reading frame (quadro aberto de leitura)
pb = pares de base
PBR = Poxvirus Bioinformatics Resource Center

PBS = tampão salino fosfato

PFU = unidade formadora de placa

PKA = proteína quinase dependente de cAMP

RNA = ácido ribonucléico

rpm = rotações por minuto

SAH = S-adenosilhomo-cisteína

SDS = dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SSC = solução salina citrato

TE = tris-EDTA

TEMED = N, N, N', N'-tetrametil-etileno diamina

Tris = tris (hidroximetil) aminometano

V = volts

VACV = vírus vaccinia

VETF = viral early transcription factor (fator de transcrição inicial viral)

WR = Western Reserve

WV = Wrapped virus (vírus envelopado)

Sumário

Introdução	1
1. A Família <i>Poxviridae</i>	2
1.1. Características Gerais	2
1.2. O vírus Cantagalo (CTGV)	5
1.3. Ciclo Replicativo do Vírus vaccínia	6
2. Poxvírus e Antivirais	12
3. Análogos de Nucleosídeos Fosfonados Acíclicos Utilizados como Antivirais	13
4. Cidofovir	16
Objetivos	22
Materiais e Métodos	24
1. Células	25
2. Vírus	25
3. Cidofovir	26
4. Propagação de estoque viral	26
5. Titulação das amostras virais por ensaio de placa	27
6. Infecção de células para os ensaios experimentais	27
7. Ensaio de citotoxicidade	28
8. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)	29
9. Análise do acúmulo de DNA viral	32
10. Preparação da sonda radioisotopicamente marcada através de nick-translation	33
11. Hibridização do DNA à sonda radioativa	33
12. Análise densitométrica	34
Resultados	36
1. Avaliação da replicação viral em presença do CDV	37
2. Avaliação da citotoxicidade do CDV sobre as células BSC-40	40
3. Efeito do CDV sobre a replicação de outros <i>Orthopoxvirus</i>	40
4. Análise do efeito do pré-tratamento das células com CDV sobre a formação das placas virais	42
5. Avaliação do efeito inibitório do CDV em condições de MOI mais alta	45
6. Análise da síntese de proteínas celulares em presença do CDV	47
7. Avaliação do acúmulo de DNA viral em presença do CDV	47
8. Efeito do CDV sobre a replicação viral sob condições mais severas de inibição	55
Discussão	66
Conclusões	79
Referências Bibliográficas	84

Introdução

1. A Família Poxviridae

1.1. Características gerais

A família *Poxviridae* é constituída por vírus grandes (350 nm x 270 nm), envelopados, de genoma DNA dupla fita linear que varia de 135 a 360 kpb, dependendo da espécie viral (PBR, 2006). Apresentam formato oval ou de tijolo e estão envoltos por uma ou mais membranas lipoprotéicas. No interior das partículas virais, está o *core* de formato bicôncavo, onde se encontra o DNA associado a proteínas. Em cada concavidade do *core*, existe uma massa protéica denominada de corpúsculo lateral, cuja função é desconhecida (Figura 1) (Moss, 2001; Condit *et al.*, 2006).

Os poxvírus são divididos em duas subfamílias: *Chordopoxvirinae*, que são os vírus que infectam vertebrados e *Entomopoxvirinae*, que infectam hospedeiros invertebrados. Os representantes de maior importância para os humanos encontram-se dentro da subfamília *Chordopoxvirinae*, gênero *Orthopoxvirus*. Como exemplo, podemos citar os vírus da varíola, vaccínia, cowpox e monkeypox. (Moss, 2001).

O protótipo da família é o vírus vaccínia (VACV), que foi utilizado para vacinação durante as várias campanhas de erradicação da varíola promovidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) após 1950 (Fenner *et al.*, 1988; Esposito e Fenner, 2001). Sua origem é ainda desconhecida e acredita-se que possa ter surgido em laboratório a partir da recombinação entre outros ortopoxvírus (Baxby, 1977). Esta hipótese, contudo, é bastante controversa. Na literatura, é consenso que o VACV não possui hospedeiro natural, não sendo encontrado na natureza (Esposito e Fenner, 2001; Moss, 2001). Contudo, existem algumas poucas exceções: o vírus buffalopox, o vírus Cantagalo (CTGV) e outros VACV bem próximos ao CTGV. O primeiro tem sido isolado na Índia a partir de búfalos e humanos desde a década de 60 e foi caracterizado como sendo uma cepa do VACV

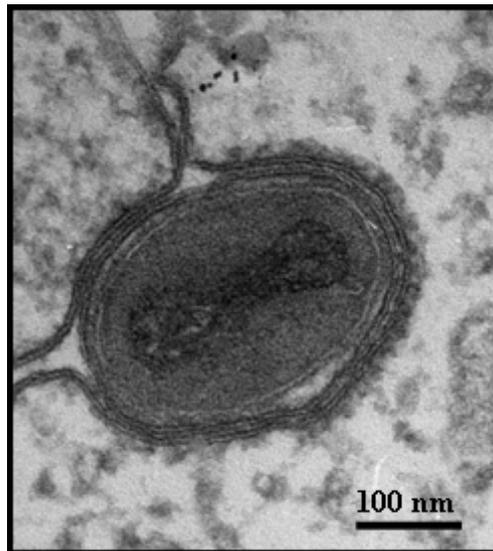
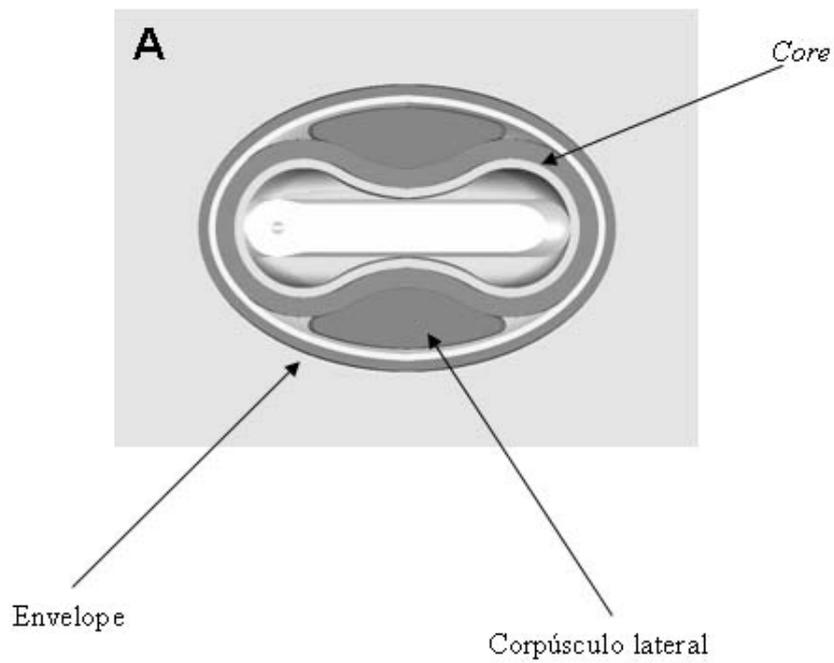


Figura 1: esquema do vírus vaccínia (A) e micrografia eletrônica do CTGV (B). O esquema foi adaptado de www.vacciniamodel.com e a micrografia retirada deste trabalho (Jesus, 2007).

(Dumbell e Richardson, 1993). No entanto, não se sabe qual cepa de VACV teria dado origem a esse vírus. O CTGV e outros VACVs similares foram isolados no Brasil, como descrito a seguir (Damaso *et al.*, 2000; Nagasse-Sugahara *et al.*, 2004; Lobato *et al.*, 2005; Damaso *et al.*, 2007).

Os genomas já seqüenciados de diversas cepas de VACV possuem aproximadamente 166 a 199 kpb e têm capacidade de codificar cerca de 200 proteínas (Goebel *et al.*, 1990; PBR, 2006). A partícula viral purificada contém aproximadamente 70 polipeptídeos (Yoder *et al.*, 2006).

Os quadros abertos de leitura (ORFs) não apresentam íntrons e, em geral, não se sobrepõem, sendo separados por regiões intergênicas pequenas (Moss, 2001). Para designação dos genes virais, a nomenclatura mais utilizada está baseada no genoma do vírus vaccínia (VACV), cepa Copenhagen, digerido com a enzima de restrição *Hind* III. Esses fragmentos foram denominados de A a O em ordem decrescente de tamanho. Dessa maneira, os genes são denominados por letras e números. As letras significam o fragmento no qual ele se encontra, e o número indica em que posição dentro do fragmento o gene é encontrado. Além disso, são colocadas as letras L (*left*) ou R (*right*), significando o sentido da transcrição. Por exemplo, o gene H5R é o quinto gene do fragmento H e o sentido em que ele é transcrito é da esquerda para direita. A nomenclatura para as proteínas segue a que foi explicada para os genes, exceto pela ausência das letras L e R. Portanto, a proteína codificada pelo gene H5R é denominada H5 (Goebel *et al.*, 1990).

1.2. O Vírus Cantagalo (CTGV)

O CTGV foi isolado em 1999 a partir de um surto de doença pústulo-vesicular ocorrido em fazendas do noroeste do estado do Rio de Janeiro (Damaso *et al.*, 2000). Esta doença acomete o gado leiteiro e os retireiros, sendo de grande importância comercial.

Atualmente, ainda são relatados surtos em vários outros estados como Minas Gerais, Goiás, Espírito Santo e São Paulo. Alguns vírus isolados nestes surtos receberam outras denominações, porém todos apresentam similaridade bastante alta com CTGV (Schatzmayr *et al.*, 2000; Trindade *et al.*, 2003; Nagasse-Sugahara *et al.*, 2004; Leite *et al.*, 2005; Lobato *et al.*, 2005; Damaso *et al.*, 2007).

A doença se caracteriza pelo aparecimento de pápulas nas tetas e úberes das vacas, assim como nas mãos, braços e, algumas vezes, na face dos ordenhadores. Essas pápulas evoluem para vesículas e pústulas até posterior cicatrização após três semanas. Nos humanos, ainda há sintomas como febre e linfadenopatia axilar. Poucos casos foram relatados de lesões generalizadas e não há tratamento antiviral disponível (Damaso *et al.*, 2000; Damaso *et al.*, 2007).

O vírus foi caracterizado através de técnicas de biologia molecular e microscopia eletrônica de transmissão como pertencente à família *Poxviridae*, gênero *Orthopoxvirus*, sendo mais especificamente uma cepa do VACV. Este foi o segundo relato da permanência de um vírus vaccínia na natureza e o primeiro no novo mundo (Damaso *et al.*, 2000).

O gene A56R que codifica a hemaglutinina dos vírus CTGV e VACV-IOC (cepa vacinal utilizada pelo Instituto Oswaldo Cruz durante a campanha de erradicação da varíola) mostrou uma identidade de 98,2% para a seqüência de nucleotídeos e de 96,7% para a seqüência de aminoácidos entre esses dois vírus. Além disso, essas duas cepas possuem uma deleção de seis aminoácidos nessa proteína, ausente em outros ortopoxvírus (Damaso *et al.*, 2000). Essa deleção está presente em todas as cepas isoladas no Brasil, podendo ser uma característica diferencial dessas cepas e utilizada no diagnóstico (Damaso *et al.*, 2007).

Essas observações levaram à hipótese de que o CTGV possa ter se originado a partir do VACV-IOC. Assim, desde o período de vacinação, o VACV-IOC deve ter se

mantido na natureza, em algum hospedeiro desconhecido. Durante esse período, o VACV-IOC teria acumulado diversos polimorfismos, emergindo, então, como o CTGV. De fato, modificações no padrão de restrição do genoma viral já foram demonstradas (Damaso *et al.*, 2000; Ramos, 2003). Então, o estudo comparativo desses dois modelos virais torna-se, extremamente interessante, pois, durante os ciclos naturais de transmissão, alterações podem ter sido introduzidas nas suas relações com o hospedeiro ou mesmo na resposta a antivirais.

1.3. Ciclo Replicativo do Vírus Vaccínia

Os membros da família *Poxviridae* são os únicos dentre os vírus de genoma DNA que se replicam inteiramente no citoplasma celular. Codificam quase todas as proteínas necessárias ao seu ciclo replicativo, obtendo relativa independência em relação à célula hospedeira (Moss, 2001; Condit e Niles, 2002).

O ciclo replicativo do VACV é complexo e possui três fases distintas de expressão gênica. Estas são organizadas em forma de cascata, em que o sucesso de cada etapa depende da etapa anterior (Moss, 2001). Cada uma dessas fases (inicial, intermediária e tardia) é caracterizada pela expressão de um grupo diferente de genes. Essa organização é obtida através de promotores e fatores de transcrição específicos para cada fase. Além disso, as fases posteriores servem como *feedback* negativo para a etapa imediatamente anterior (Broyles, 2003). Dessa maneira, os poxvírus coordenam seus processos de replicação do genoma e morfogênese através da regulação da expressão dos genes presentes nas diferentes fases (Broyles, 2003; Condit e Niles, 2002; Condit *et al.*, 2006).

O ciclo replicativo do VACV tem início quando a partícula viral se liga a receptores da célula hospedeira (Figura 2). Apesar de glicosaminoglicanas presentes na superfície

celular não inibirem totalmente a infecção, não sendo essenciais para a entrada do vírus, já foi demonstrado que três proteínas do VACV (D8, H3 e A27) se ligam a essas moléculas (Chung *et al.*, 1998; Hsiao *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000; Carter *et al.*, 2005). Dessa maneira, todos os receptores necessários à entrada do vírus na célula ainda não são conhecidos.

Após a adsorção do vírus, há a fusão do envelope com a membrana plasmática e liberação do *core* no citoplasma. Recentemente, Senkevich e colaboradores (2005) descreveram um complexo necessário para a entrada do vírus na célula hospedeira, composto por oito proteínas virais altamente conservadas entre todos os poxvírus.

Em seguida à liberação do *core* no citoplasma da célula hospedeira, tem início a transcrição dos genes iniciais. Os mRNAs iniciais apresentam cap na região 5' e cauda poli(A) na extremidade 3' (Kates e Beeson, 1970; Wei e Moss, 1975). Esses mRNAs codificam enzimas necessárias para a replicação do DNA, fatores importantes para a interação com o hospedeiro, como moléculas moduladoras do sistema imune, e fatores de transcrição para a fase intermediária de expressão gênica (Moss, 2001; Broyles, 2003). A etapa inicial ocorre no interior do *core*, utilizando exclusivamente as enzimas virais que já estão presentes na partícula, tais como a RNA polimerase, poli(A) polimerase, enzima de adição do cap e o fator de transcrição inicial (VETF), entre outras (Kates e Beenson, 1970; Wei e Moss, 1975; Broyles *et al.*, 1991). Esses mRNAs são liberados de maneira dependente de ATP e se acumulam em áreas específicas do citoplasma, onde serão transcritos e traduzidos (Schramm e Locker, 2005). Nesta fase, mais da metade do genoma é transcrito e traduzido. Após a tradução dos mRNAs iniciais, o *core* viral é desmontado, liberando o DNA no citoplasma. Em seguida, inicia-se a replicação do DNA em áreas específicas do citoplasma, denominadas virossomas ou fábricas virais (Moss, 2001).

A replicação do DNA do VACV tem início com a formação de um corte em uma ou ambas as regiões teloméricas do genoma. Este corte libera uma extremidade 3'OH, que é

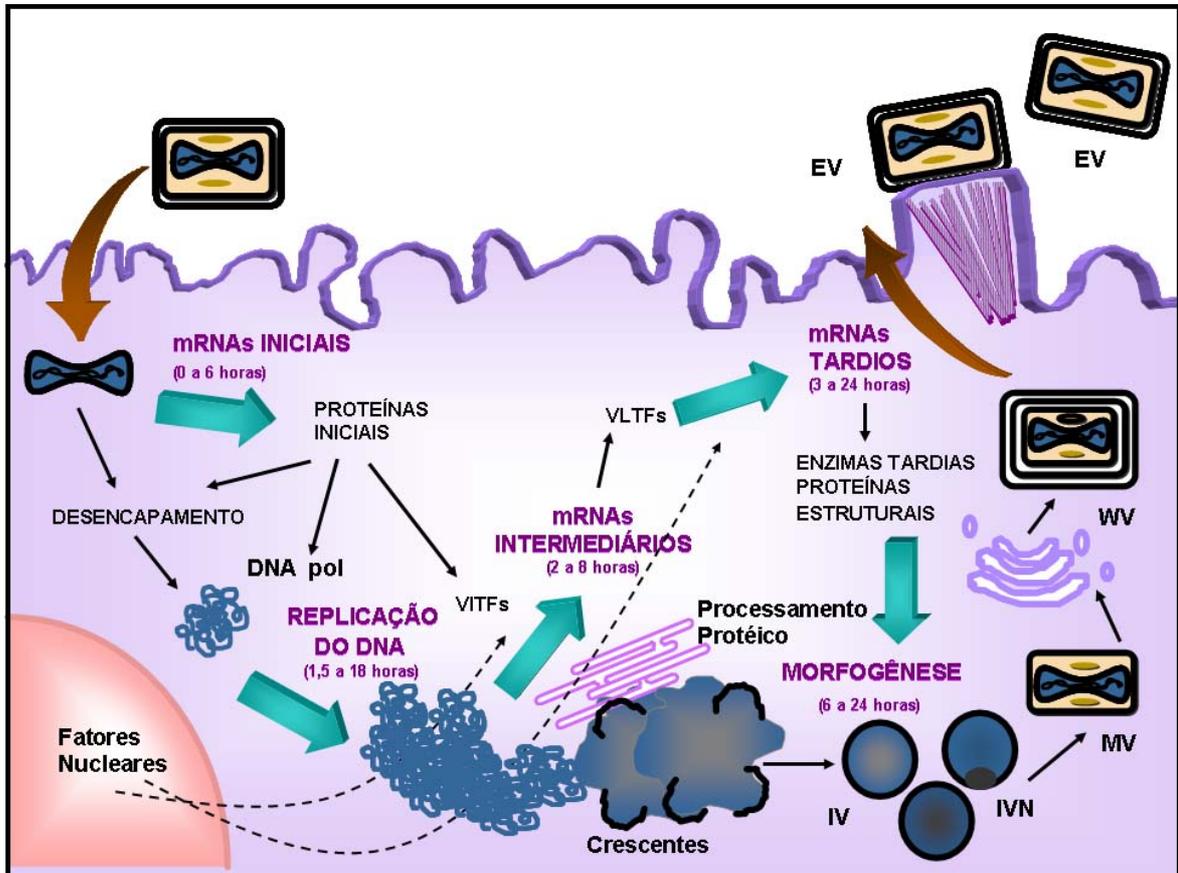


Figura 2: Desenho esquemático do ciclo replicativo do vírus vaccinia. VITFs: fatores transcricionais intermediários do vírus vaccinia; VLTFs: fatores transcricionais tardios do vírus vaccinia; IV: vírus imaturos; IVN: vírus imaturos com nucleóide; MV: vírus intracelular maduro; WV: vírus envelopado; EV: vírus envelopado extracelular; os tempos indicados para cada fase foram estimados com base na infecção de células com VACV cepa WR, utilizando uma MOI entre 5 e 10. Para as fases de expressão gênica, os tempos indicados se referem à síntese dos RNAs (fonte: Laboratório de Biologia Molecular de Vírus- IBCCF-UFRJ).

reconhecida pela DNA polimerase viral para iniciar a replicação do genoma (Traktman, 1996). Este processo leva à formação dos concatâmeros de DNA, ou seja, o genoma parental e o genoma recém-sintetizado formam uma molécula única. Todo esse processo pode ser repetido, formando concatâmeros com quatro ou mais genomas unidos. Esses concatâmeros são posteriormente resolvidos por enzimas virais para que apenas uma molécula de DNA seja empacotada em cada partícula viral (Garcia e Moss, 2001).

Ainda durante a replicação do DNA, começa a transcrição dos genes da fase pós-replicativa, que compreende as fases intermediária e tardia. Assim como na fase inicial, os mRNAs sintetizados apresentam cap no 5' e cauda poli(A) no 3'. Além dos fatores transcricionais virais, cinco proteínas celulares parecem estar envolvidas na transcrição pós-replicativa (Katsafanas e Moss, 2004; Oh e Broyles, 2005).

Assim, os mRNAs da fase intermediária começam a ser sintetizados. Seus produtos constituem, principalmente, fatores de transcrição necessários para a fase tardia (Keck *et al.*, 1990; Baldick e Moss, 1993). Em seguida, os genes tardios começam a ser transcritos. Estes mRNAs codificam proteínas estruturais e enzimas que são empacotadas no vírus e que serão necessárias para uma nova infecção.

Concomitantemente com a fase pós-replicativa, tem início, no citoplasma, a morfogênese do VACV com o aparecimento de crescentes de membrana. O processo ocorre em áreas do citoplasma desprovidas de organelas, denominadas fábricas virais, e nas quais ocorre a replicação do DNA (Condit *et al.*, 2006).

A estrutura dos crescentes ainda é controversa. Existem vários modelos que procuram explicar o número e a origem das membranas dos crescentes. O modelo mais aceito é o que sugere a existência de uma única bicamada lipídica (Hollishead *et al.*, 1999; Heuser, 2005; Condit *et al.*, 2006). Esta membrana dá origem ao envelope do VACV. Alguns autores acreditam que a bicamada lipídica é sintetizada *de novo*, utilizando-se

enzimas virais (Dales e Mosbach, 1968). No entanto, outros sugerem que a membrana viral é adquirida a partir de uma organela celular, provavelmente o retículo endoplasmático (Sodeik e Locker, 2002).

Os crescentes de membrana evoluem para vírus imaturos (IV), de morfologia esférica, que não são infecciosos. Durante sua formação, os IVs englobam uma massa eletrondensa, chamada viroplasma, que contém DNA e proteínas (Condit *et al.*, 2006). Para a associação do viroplasma com os IVs, é necessário um complexo formado por sete proteínas virais, associadas ao *core* ou à membrana viral, que são altamente conservadas em todos os cordopoxvírus (Szajner *et al.*, 2004). Acredita-se que após o IV ter empacotado o DNA ele se transforme em IVN (IV com nucleóide) (Morgan, 1976).

Em seguida, os IVNs sofrem processo de maturação, ainda pouco entendido, para gerarem os vírus maduros (MVs). Tal processo envolve mudanças morfológicas e bioquímicas. Essa maturação, provavelmente, ocorre de forma rápida, uma vez que intermediários do processo raramente são observados, o que dificulta seu entendimento. Essa transição envolve alguns passos principais, entre eles a proteólise de polipeptídeos precursores virais (Condit *et al.*, 2006).

A maioria dos MVs permanece no citoplasma e só é liberada quando há lise celular. Esta forma infecciosa contém apenas um envelope lipoprotéico. A outra parte dos MVs é transportada por microtúbulos e recebe mais duas membranas originadas de endossomas tardios ou do complexo de Golgi, dando origem ao WV (vírus envelopado; do inglês *wrapped virus*) (Schmelz *et al.*, 1994).

Os WVs são transportados por microtúbulos até a periferia da célula, onde fundem sua membrana mais externa com a membrana plasmática (Ward e Moss, 2001). Parte dessas partículas permanece ligada à célula e a outra parte é liberada para o meio. Na face citoplasmática, abaixo dos vírus que permanecem associados à célula, há polimerização de

caudas de actina, cuja função é impulsionar a partícula para as células adjacentes. Deste modo, estes vírus são responsáveis pela transmissão célula-célula enquanto os vírus que não permanecem associados à célula, sendo liberados no meio, têm papel na transmissão a longas distâncias (Smith *et al.*, 2002).

Nas duas últimas décadas, a morfogênese tem sido um dos focos principais nos estudos da família *Poxviridae*. Estes estudos têm sido facilitados pela análise de proteínas virais específicas, através da caracterização de vírus nocaute para certos genes, de mutantes termosensíveis ou induzidos por IPTG, bem como o estudo de mutantes resistentes a drogas que bloqueiam algumas fases da morfogênese, como o antibiótico rifampicina, por exemplo (Sodeik e Locker, 2002; Condit *et al.*, 2006; Charity *et al.*, 2007).

Apesar de várias proteínas virais já terem suas funções determinadas, a morfogênese ainda é a parte do ciclo do VACV menos entendida. A participação de algumas proteínas celulares tem sido freqüentemente relatada (Ploubidou *et al.*, 2000; Ward e Moss, 2001; Castro *et al.*, 2003). Além disso, ainda há muitos modelos controversos em relação a várias etapas. Muitas proteínas ainda estão sendo caracterizadas e outras técnicas de microscopia estão sendo utilizadas (*deep-etch*, criofratura, tomografia eletrônica), o que auxiliará na compreensão geral do processo de morfogênese.

2. Poxvírus e Antivirais

A busca por antivirais teve início na década de 50, tendo como alvo os poxvírus. Os primeiros antivirais estudados foram as tiosemicarbazonas, já utilizadas como agentes tuberculostáticos, bem como seu derivado metisazona. Os poxvírus, por serem vírus complexos e codificarem um número grande de proteínas, possuem diversos alvos para

intervenção antiviral. Esses alvos poderiam ser proteínas essenciais para a replicação viral ou fases específicas do ciclo replicativo (Neyts e De Clercq, 2003).

A maioria dos compostos que possuem atividade contra os poxvírus são análogos de nucleosídeo. Muitos agem sobre proteínas celulares importantes para o ciclo replicativo do vírus tais como inibidores de IMP desidrogenase (inibem a síntese de RNA e DNA), inibidores de SAH hidrolase (inibem a metilação dos mRNAs), inibidores de OMP descarboxilase, inibidores de CTP sintetase (assim como os inibidores de OMP descarboxilase, inibem a síntese de mRNAs), e inibidores de timidilato sintetase (inibem a síntese de DNA). Entretanto, existem análogos de nucleotídeos que têm como alvo proteínas virais, como se acredita ser o caso dos análogos de nucleosídeos fosfonados e outros derivados de nucleotídeos (De Clercq, 2001).

Compostos imunossupressores também têm sido estudados em nosso laboratório e se mostraram eficazes na inibição do ciclo replicativo do VACV tais como ciclosporina A, azatioprina, FK-506, e brequinar (Damaso e Keller, 1994; Damaso e Moussatché, 1998; Damaso *et al.*, 2002; Costa, *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 2006). Além disso, o efeito antiviral do interferon contra o CTGV e VACV-IOC também foi evidenciado (Reis, 2004). Contudo, nos últimos anos, os antivirais mais estudados têm sido os análogos de nucleosídeos fosfonados.

3. Análogos de Nucleosídeos Fosfonados Acíclicos Utilizados como Antivirais

Os análogos de nucleosídeos fosfonados acíclicos são análogos de nucleotídeo em que um grupamento fosfonado é ligado a uma purina ou pirimidina através de uma cadeia alifática, via uma ligação éter (Balzarini *et al.*, 2002) (Figura 3A e 3C). Esses compostos

possuem amplo espectro de ação, incluindo vírus de genoma DNA e retrovírus (De Clercq, 2005).

Isto se deve ao fato destes compostos já possuírem um grupo fosfonado, sendo apenas necessário que as enzimas celulares catalisem os dois passos de fosforilação seguintes para que o composto seja ativo, ou seja, possa ser incorporado à cadeia de ácido nucléico pela DNA polimerase viral. No caso de análogos que não possuem esse átomo de fósforo, há necessidade de uma primeira fosforilação, realizada por cinases virais. Assim, os análogos de nucleosídeos fosfonados (ANP) são ativos mesmo contra vírus que não codificam suas próprias cinases (De Clercq, 1997).

O grupamento fosfonado no lugar de um grupamento fosfato presente nesses compostos faz com que eles sejam resistentes à degradação por fosfatases, nucleotidases e hidrolases celulares (Aduma *et al.*, 1995; De Clercq, 1997). Acredita-se também que o grupo fosfonado deve dificultar a excisão do cidofovir (CDV) por enzimas envolvidas no reparo do DNA (De Clercq, 2002). Outra característica importante dos ANPs é a alta seletividade por possuírem maior afinidade pelas DNA polimerases virais do que pelas celulares (Kramata *et al.*, 1996; Neyts *et al.*, 1990).

Os análogos de nucleosídeos fosfonados acíclicos podem ser divididos em três classes:

- classe I: (S)-3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil (HPMP) e 6-[3-hidroxi-2-(fosfonilmetoxi)propoxil] (6-HPMPO);
- classe II: 2-fosfonilmetoxietil (PME) e 6-[2-(fosfonometoxi)etoxil] (6-PMEO);
- classe III: (S)-9[3-fluoro-2-(fosfonometoxi)propil] (FPMP), (R)-9-[(fosfonometoxi)propil] (PMP) e 6-[2-(fosfonometoxi)propoxil] (6-PMPO).

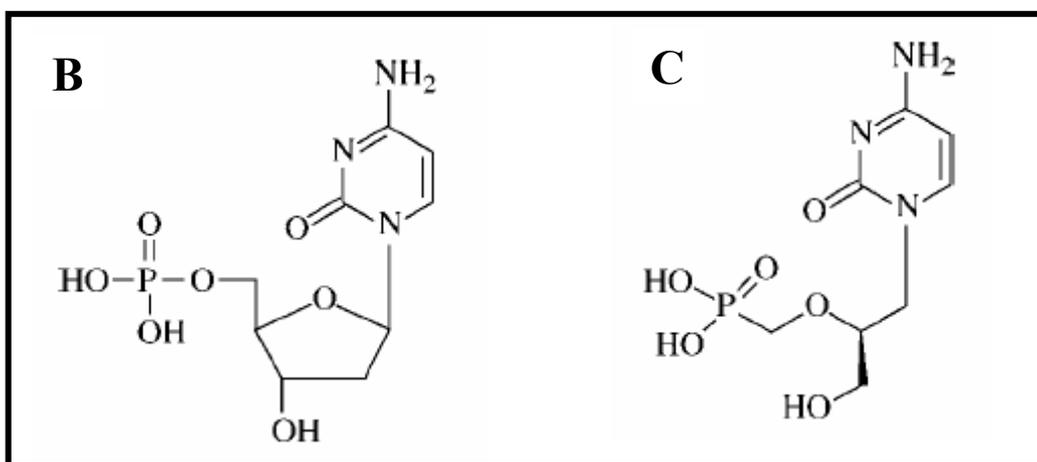
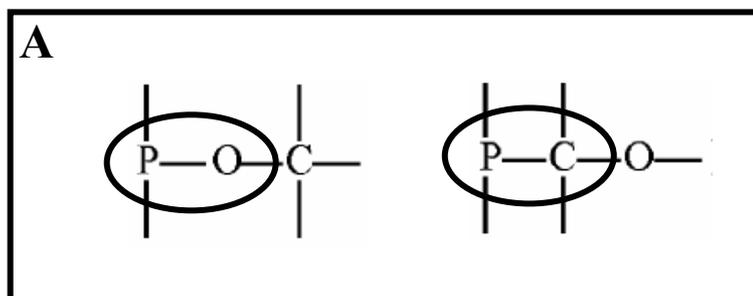


Figura 3: (A) grupamentos fosfato e fosfonado, respectivamente. Adaptado de De Clercq, 2006. (B) dCMP. (C) CDV. B e C adaptados de Bray e Roy, 2004.

Essas classes possuem diferentes espectros de ação (De Clercq, 1991; Balzarini *et al.*, 2002; De Clercq, 2005). A classe dos HPMP/HPMPO (classe I) possui atividade contra vírus de genoma DNA, mas são pouco ativos contra vírus de genoma RNA. A classe dos PME/PMEO (classe II) possui atividade contra alguns vírus de genoma DNA, como vírus herpes simplex tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) e vírus da hepatite B (HBV), assim como retrovírus. A terceira classe não possui atividade contra vírus DNA, com exceção do HBV, mas sua atividade contra retrovírus é altamente pronunciada (Balzarini *et al.*, 2002).

O fato de existirem classes de ANPs com diferentes espectros de ação, demonstra que a estrutura desses compostos é importante para a sua atividade. Isso também fica evidenciado pelo fato de que diversas modificações na cadeia lateral desses análogos provocam perda da atividade antiviral (Holý *et al.*, 1990).

Os análogos de nucleosídeos fosfonados são atualmente os antivirais mais promissores para o tratamento de diversos tipos de infecções virais (De Clercq, 2007). Três ANPs já foram licenciados para uso clínico: cidofovir (classe I; HPMP ou CDV), para o tratamento de retinite causada por citomegalovírus (CMV) em pacientes HIV-positivos; adefovir (classe II; PME), para tratamento de infecções causadas pelo vírus da hepatite B (HBV); e tenofovir (classe III; PMPA), para tratamento de infecções causadas por HIV (De Clercq, 2005).

4. Cidofovir

O cidofovir (CDV) é um análogo de citosina e, dentre os ANPs, é o mais promissor para o tratamento de infecções causadas por vírus de genoma DNA (Figuras 3B e 3C). Já foi demonstrada sua atividade contra adenovírus, poliomavírus, papilomavírus, herpesvírus, bem como poxvírus (De Clercq, 2003).

Dentro da família *Poxviridae*, estudos mostraram sua atividade contra os vírus VACV, cowpox, monkeypox, camelpox, varíola, orf, e *molluscum contagiosum* (De Clercq, 2006; Nettleton *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2003; Bray e Roy, 2004; Scagliarini *et al.*, 2007). A eficácia do CDV foi demonstrada em diversos modelos animais (imunocomprometidos ou imunocompetentes), utilizando rotas de infecção (intravenoso, intranasal ou aerossol) e de administração da droga distintas (subcutâneo, intraperitoneal, aerossol), além de infecções letais e não-letais (Neyts e De Clercq, 2003; Neyts e De Clercq, 1993; Bray *et al.*, 2000; Smee *et al.*, 2001a; Smee *et al.*, 2001b; Bray *et al.*, 2002; Smee e Sidwell, 2003; Roy *et al.*, 2003; Bray e Roy, 2004; Quenelle *et al.*, 2004). Além disso, a droga também provou sua eficácia mesmo quando administrada dias antes ou depois da infecção (Neyts e De Clercq, 2003; Bray e Roy, 2004).

O CDV possui potencial terapêutico, seja na forma tópica ou sistêmica (Sirianni *et al.*, 2005; Johnson e Gangemi, 1999; Murolo *et al.*, 2001; Naesens *et al.*, 2005). Na clínica, sua atividade anti-poxvírus foi demonstrada no tratamento tópico de infecções por *molluscum contagiosum* e orf (Meadows *et al.*, 1997; Davies *et al.*, 1999; Zabawski e Cockerell, 1999; Ibarra *et al.*, 2000; Toro *et al.*, 2000; Geerinck *et al.*, 2001). Além disso, o CDV se mostrou eficaz no tratamento de reações adversas decorrentes da vacinação com o VACV (vaccínia disseminada), o que aumenta sua importância como antiviral contra poxvírus, pois é possível suprimir os efeitos deletérios da vacinação em pacientes imunocomprometidos que tenham sido inadvertidamente vacinados (De Clercq e Neyts, 2004; Neyts *et al.*, 2004). Do mesmo modo, a administração de CDV em macacos que apresentavam infecção letal causada por monkeypox se mostrou mais eficiente que a vacinação, quando ambos foram administrados após a exposição ao vírus (Stiteelaar *et al.*, 2006).

A forma ativa da droga é o CDV difosfato (CDVpp). O CDV entra na célula, provavelmente, por pinocitose e se acumula nos lisossomas. Ao ser protonado, perde sua carga negativa, o que promove sua difusão pela membrana lisossomal para o citoplasma (Connelly *et al.*, 1993). No citoplasma, o CDV é transformado em CDV monofosfato (CDVp) pela enzima pirimidina nucleosídeo monofosfato e, em seguida, transformado em CDVpp pela enzima nucleosídeo difosfato cinase, piruvato cinase ou creatina cinase. O CDVpp pode servir como competidor ou substrato alternativo para a DNA polimerase (De Clercq, 1997) (Figura 4).

O efeito antiviral prolongado do CDV é o mais marcante dentre os ANPs e é devido à meia-vida longa dos seus metabólitos, principalmente o aduto de colina (CDV-colina), cuja meia-vida é de aproximadamente 87 horas. A formação deste aduto pode ser devido ao fato de que o CDV provavelmente serve como substrato para a síntese de fosfolipídeos via fosfatidilcolina citidililtransferase, assim como ocorre com outros análogos de citosina, como arabinosilcitosina e dideoxicitidina. Foi proposto que esse aduto de colina serviria como um depósito de CDV na célula (Aduma *et al.*, 1995).

Estudos de cinética enzimática realizados com a DNA polimerase de CMV mostram que o CDV é incorporado em complementaridade com resíduos de guanina apenas. Apesar disso, o dCTP é incorporado de forma mais eficiente pela DNA polimerase do que o CDV (Xiong *et al.*, 1996). Além disso, após a incorporação de uma molécula de CDV ou duas moléculas separadas por um ou dois nucleotídeos usuais há parada ou redução drástica da síntese do DNA. Já a entrada de duas moléculas consecutivas de CDV leva à parada na replicação, provavelmente devido a alguma distorção estrutural. Esse estudo também mostrou que o CDV não é excisado pela atividade exonuclease 3' → 5' da DNA polimerase viral (Xiong *et al.*, 1997).

Mais recentemente, foram realizados estudos *in vitro* utilizando a DNA polimerase

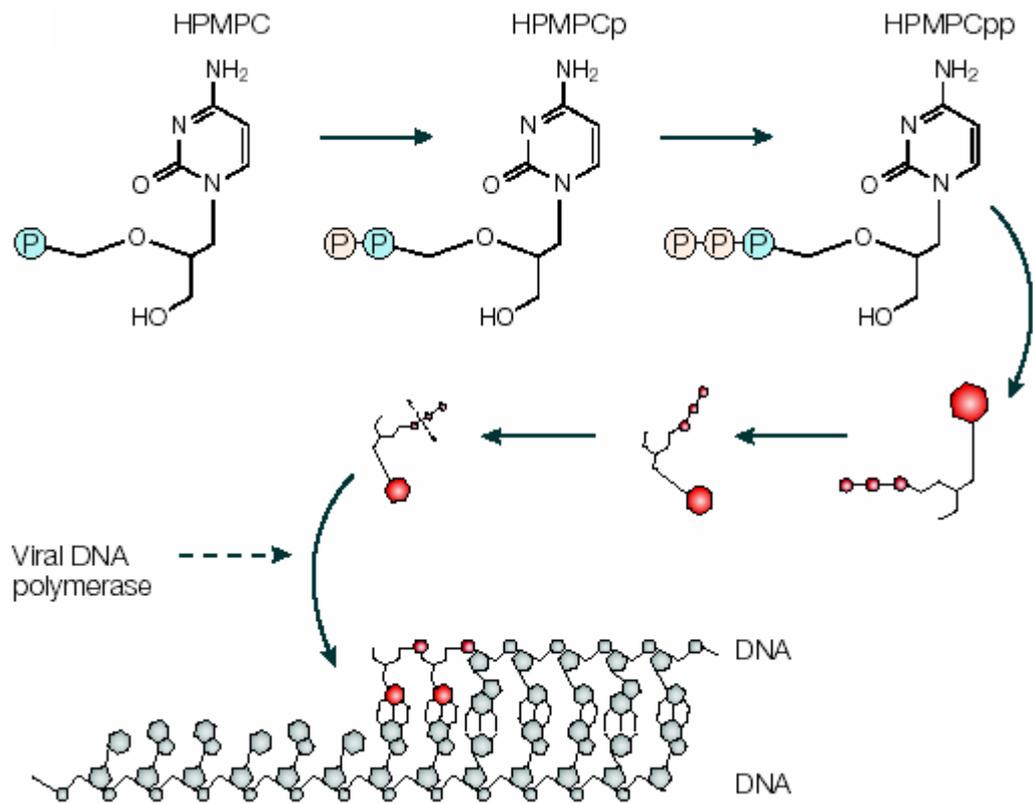


Figura 4: Incorporação do CDV na cadeia crescente de DNA. Adaptado de De Clercq e Holý, 2005.

do VACV (Magee *et al.*, 2005). Assim como é observado com CMV, o dCTP é um substrato mais favorecido pela DNA polimerase que o CDV. Foi observado que a incorporação de uma molécula de CDV leva à parada na síntese de DNA um nucleotídeo após a molécula de CDV (CDV + 1). Assim, o CDV não age como um terminador de cadeia, na medida em que, após sua incorporação, a DNA polimerase consegue incorporar mais um nucleotídeo. Apesar disso, há uma diminuição na taxa de polimerização. Quando há incorporação de duas moléculas consecutivas de CDV no DNA, a taxa de síntese diminui drasticamente, mas não há parada na síntese, diferentemente do que ocorre com CMV. E, além disso, o CDV pode ser excisado pela atividade exonuclease 3'→5' da DNA polimerase do VACV, mas apenas se ele for a última molécula incorporada. Ou seja, se houver incorporação de mais um nucleotídeo adjacente ao CDV (CDV + 1), este não é excisado pela DNA polimerase viral. Esses efeitos podem estar relacionados a problemas estruturais ocasionados pela entrada do CDV na cadeia de DNA (Magee *et al.*, 2005).

Na clínica, ainda não foram observadas cepas virais de poxvírus resistentes ao CDV. Contudo, mutantes resistentes já foram isolados em culturas de células após várias passagens em presença de concentrações crescentes da droga, tanto para poxvírus quanto para HSV e CMV (Smee *et al.*, 2002; Smee *et al.*, 2005; Andrei *et al.*, 2006; Smee *et al.*, 1995).

Smee e colaboradores (2002) demonstraram que os vírus cowpox, monkeypox e camelpox resistentes ao CDV mostraram resistência cruzada ao HPMPA (análogo de adenina, contraparte do CDV). O mesmo foi verificado para VACV cepa WR (Smee *et al.*, 2005). Em relação ao CDV cíclico, todos os vírus apresentaram resistência cruzada. Outros análogos não relacionados ao CDV não tiveram sua atividade alterada nos vírus resistentes. Experimentos *in vivo* sugerem que essas cepas resistentes possam ser menos virulentas,

exceto para monkeypox, para o qual são necessários mais estudos (Smee *et al.*, 2002; Smee *et al.*, 2005).

Andrei e colaboradores (2006) demonstraram que a resistência do VACV-WR ao CDV era devido a duas mutações pontuais na DNA polimerase viral, uma no domínio catalítico e a outra no domínio da atividade exonuclease 3'→5'. Neste estudo, assim como nos anteriores, as cepas resistentes exibiram virulência reduzida *in vivo*. Outras mutações no domínio exonuclease da DNA polimerase relacionadas à resistência ao CDV foram encontradas por Kornbluth e colaboradores (2006). Esses vírus resistentes também demonstraram uma diminuição da virulência. Em todos os estudos foi possível o tratamento das cepas resistentes com CDV, apesar do uso de doses maiores, e também com outros antivirais não relacionados ao CDV.

Estudos de Kinchington e colaboradores (2002) também relacionam a resistência de adenovírus a mutações presentes na DNA polimerase viral, no domínio supostamente importante para ligação dos nucleotídeos. Mutações na DNA polimerase de outros vírus, como CMV e HSV-1 também já foram relacionadas à resistência ao CDV (Andrei *et al.*, 2000; Snoeck *et al.*, 1996; Cihlar *et al.*, 1998)

Diante dessas características e por ser o composto com maior eficácia comprovada, o CDV é atualmente a única droga de escolha para tratamento e profilaxia de curto prazo das infecções causadas por poxvírus (De Clercq, 2002; Keith *et al.*, 2003), recebendo forte recomendação da OMS para o seu uso e continuidade dos estudos (WHO, 2006). Além disso, a importância desse antiviral pode ser evidenciada pelo aumento no número de publicações científicas sobre CDV e poxvírus nos últimos 6 anos, as quais foram geradas por um número bastante restrito de grupos de pesquisa.

Como descrito anteriormente, o CDV já é licenciado para o tratamento de retinite causada por CMV. O medicamento é comercializado pela *Gilead Sciences* e é administrado

na forma intravenosa (Gilead, 2007). Entretanto, a *Chimerix Inc.* vem também recebendo grande aporte financeiro para o desenvolvimento da forma oral do CDV. Testes clínicos com esta forma da droga já estão em fase I contra varíola (Chimerix, 2007). Assim, as doações de CDV para pesquisa foram suspensas pelas empresas que comercializam a droga.

Mesmo com a restrição das pesquisas sobre a atividade do CDV a apenas poucos grupos, os estudos *in vitro*, acima descritos, geram um consenso geral de que o composto atue como antiviral primariamente inibindo a replicação do DNA. Contudo, não há relatos de uma análise detalhada do ciclo replicativo do VACV e das fases afetadas pelo CDV que demonstrem claramente que a inibição da replicação ocorre devido ao bloqueio direto da síntese de DNA viral.

Objetivos

OBJETIVOS

Como descrito na Introdução, o uso do CDV como um composto antiviral tem apresentado relevância considerável para o tratamento de infecções causadas por poxvírus. Os relatos de infecções pelo vírus Cantagalo ou similares tem aumentado consideravelmente nos últimos anos e não há tratamento disponível. A sensibilidade do CTGV à ação antiviral do CDV é desconhecida, assim como o efeito desse composto sobre as etapas do ciclo replicativo viral. Assim, o objetivo geral desse trabalho é determinar a atividade antiviral do CDV sobre a replicação dos vírus CTGV e VACV-IOC, bem como mapear as fases do ciclo replicativo afetadas pelo tratamento com o antiviral. Os objetivos específicos são:

- Determinar as concentrações inibitórias do CDV na formação de placas virais bem como de partículas infecciosas;
- Avaliar a citotoxicidade do composto sobre as células BSC-40;
- Determinar o IC_{50} para a formação de partículas infecciosas para ambos os vírus;
- Comparar a sensibilidade de outros ortopoxvírus ao CDV;
- Avaliar o efeito do CDV sobre a replicação do DNA viral.

Material e Métodos

1. Células

Células BSC-40 (epitélio de rim de macaco verde africano), obtidas da coleção do Laboratório, eram utilizadas nos ensaios. As células eram cultivadas em placas para cultura de tecido (60 mm de diâmetro) e mantidas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂, em meio de cultura DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium, Invitrogen) suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado por calor, sulfato de gentamicina 50 µg/mL, estreptomicina 0,01%, 5000 unidades de penicilina, NaHCO₃ 0,225%, fungizona 0,25%, piruvato de sódio 0,01%, e aminoácidos não-essenciais 1%.

O repique da monocamada confluyente era feito a cada três ou quatro dias da seguinte maneira: o meio de cultura das células era descartado e a monocamada era lavada duas vezes com PBS 1X (NaCl 0,8%, KCl 0,02%, Na₂PO₄ 0,15%, KH₂PO₄ 0,02%, pH 7,2 - 7,3). Era adicionada tripsina 0,25%; EDTA 1 mM em PBS 1X e após 1 minuto de incubação a 37 °C, as células eram levemente agitadas para que a monocamada se soltasse da placa de cultura. As células eram, então, ressuspensas em meio de cultura para uma proporção de 1:9 e distribuídas para novas placas de cultura de tecidos.

2. Vírus

Neste trabalho, eram utilizados os vírus Cantagalo (CTGV) e vaccinia-IOC (VACV-IOC) (Damaso *et al.*, 2000). O CTGV foi isolado de pústulas de gado bovino a partir de um surto ocorrido em fazendas do noroeste do estado do Rio de Janeiro. O VACV-IOC foi gentilmente cedido ao Laboratório em ampolas liofilizadas de vacina antivariólica pelo Dr. Herman Schatzmayr (Instituto Oswaldo Cruz, RJ) em 1981. Ambos os vírus foram submetidos previamente a três ciclos consecutivos de isolamento de placa

viral (clonagem por plaqueamento) (Damaso *et al.*, 2000). Em alguns ensaios, utilizamos os vírus vaccínia cepas WR (VACV-WR) e Wyeth (VACV-Wyeth), da coleção do Laboratório, e o vírus cowpox cepa Brighton Red, gentilmente cedido pelo Dr. Richard Moyer da University of Florida, USA.

3. Cidofovir

O composto cidofovir (CDV) foi gentilmente cedido ao Laboratório pela Gilead Sciences, Inc., Califórnia, EUA. Soluções estoque de 5 mg/mL eram preparadas em PBS 1X e mantidas a -20 °C.

4. Propagação de estoque viral

Para preparação de estoques, CTGV e VACV-IOC eram propagados em placas para cultura de tecido de 100 mm de diâmetro. Monocamadas confluentes eram infectadas com multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 para CTGV e 0,01 para VACV-IOC em 1 mL de solução salina de Puck (vermelho de fenol 0,02%, NaCl 8%, KCl 0,4%, Glicose 1%, NaHCO₃ 0,35%, MgCl₂.6H₂O 4%). Após 1 hora e 30 minutos de adsorção a 37 °C, com agitação a cada 15 minutos, era adicionado meio de cultura completo. A monocamada e o meio de cultura eram recolhidos após 48 horas de infecção e centrifugados a 900 rpm (Spin VI, Incibrás) durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante era descartado e o precipitado ressuspenso em PBS 1X. Os estoques virais eram mantidos a -70 °C até posterior titulação (Damaso e Moussatché, 1992, modificado por Jesus, 2005).

5. Titulação das amostras virais por ensaio de placa

Primeiramente, eram realizados três ciclos de congelamento a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e descongelamento dos estoques virais. A seguir eram feitas diluições seriadas de 10 vezes em solução salina de Puck a partir do estoque viral. As três últimas diluições eram utilizadas para infectar, em duplicata, monocamadas cultivadas em placas para cultura de tecido de 6 poços com um volume de adsorção de $200\text{ }\mu\text{L}$. Após 1 hora e 30 minutos de adsorção a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob agitação a cada 15 minutos, o inóculo era retirado e adicionava-se meio de cultura completo. As células eram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Após esse período, o meio de cultura era descartado, as células eram coradas com solução de cristal violeta 0,1% em formaldeído 10% e as placas virais eram contadas (Damaso e Moussatché, 1992). O cálculo do título era feito da seguinte maneira: média do número de placas virais obtidas nas diluições x diluição x 5. O resultado era expresso como PFU/mL.

6. Infecção de células para os ensaios experimentais

Células eram cultivadas em placas de cultura até atingirem confluência, como descrito no item 1. O meio de cultura era removido e acrescentado solução salina de Puck contendo vírus (etapa de adsorção). Para infecções com MOI de 4×10^{-4} , 2×10^{-4} ou 1×10^{-3} (100 PFU em $2,5 \times 10^6$ células ou 200 ou 1000 PFU em 1×10^6 células), o inóculo permanecia por 1 hora e 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob agitação a cada 15 minutos. Para infecções com MOI de 1 ou 5 (1 ou 5 PFU/célula), o período de adsorção era de 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob agitação a cada 10 minutos.

Após a adsorção, o inóculo era retirado e adicionava-se meio de cultura completo em ausência ou presença de CDV em concentrações variáveis, de acordo com o

experimento. Este era considerado o tempo zero de infecção. Em alguns ensaios, as monocamadas eram pré-tratadas com CDV 10 ou 15 µg/mL durante diversas horas antes da infecção, como indicado em Resultados.

O tempo de infecção e o processamento das monocamadas variavam conforme o experimento. Para determinação da produção de partículas infecciosas, as células recebiam 500 µL de água deionizada estéril e eram mantidas a -70 °C até posterior titulação dos vírus por ensaio de placas como descrito no item 5.

7. Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade era testada através do método de captação do vermelho neutro (Thompson, 1998). Células cultivadas até confluência em placas de cultura de tecidos de 96 poços eram incubadas com diversas concentrações de CDV em 8 replicatas durante 24 horas a 37 °C. Em seguida, era adicionada a solução do corante vital vermelho neutro para concentração final de 50 µg/mL. Após 3 horas de incubação a 37 °C, no escuro, o meio de cultura contendo vermelho neutro era descartado e adicionavam-se 100 µL de formaldeído 4% a temperatura ambiente. O formaldeído era descartado após 1 minuto de incubação e adicionavam-se 100 µL de metanol 50%. Após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente, no escuro, a absorbância era determinada em espectrofotômetro a 495 nm.

8. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

O gel de poliacrilamida de separação era constituído por Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, acrilamida 10% e bisacrilamida 0,26%, SDS 1%, persulfato de amônio 1% e TEMED 0,03%. O gel de concentração era composto de Tris-HCl 1 M pH 6,8, acrilamida 4,5%, bisacrilamida 0,15%, SDS 1%, persulfato de amônio 1% e TEMED 0,08% (Laemmli, 1970; Damaso e Moussatché, 1992).

As amostras de células infectadas eram preparadas em tampão de amostra. Eram aplicados 20 µL de amostra em cada poço do gel. Todas as amostras eram aquecidas a 100 °C durante 15 minutos e, em seguida, agitadas vigorosamente.

A corrida era feita à voltagem constante (100 V) em tampão de corrida 1X (glicina 192 mM; Tris 25 mM; SDS 0,1%). Após 2 horas de corrida, o gel era incubado sob agitação constante em solução corante de azul de coomassie (azul de Coomassie R250 0,1%; ácido acético 10%; metanol 45%) por 18 horas à temperatura ambiente. Em seguida, o gel era incubado à temperatura ambiente em solução descorante (metanol 35%; ácido acético 10%) sob agitação constante até que a visualização das bandas fosse possível. Incubava-se o gel, então, em solução de secagem (glicerol 1%; etanol 40%) à temperatura ambiente, sob agitação constante, durante três horas. Para a secagem do gel, o mesmo era colocado entre duas folhas de papel celofane para posterior exposição a filme de raios-X (T-MAT G/RA, Kodak).

9. Imunodeteccção de proteínas através de *Western blot*

Para os ensaios de *Western blot*, em seguida à corrida eletroforética em SDS-PAGE, como descrito no item anterior, o gel era incubado, sob agitação constante, em

tampão de transferência (Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20%) à temperatura ambiente por 15 minutos, concomitantemente com a membrana de nitrocelulose (Hybond-C; Amersham/Pharmacia). A transferência das proteínas do gel para a membrana era realizada utilizando-se o aparelho *Semiphor Semi-Dry Transfer Unit* (Hoefer Scientific) à temperatura ambiente com 1,2 mA/cm² na primeira hora e 1 mA/cm² na segunda hora. A membrana era, então, guardada a -20 °C até sua utilização para o ensaio de imunodeteção (adaptado de Damaso e Moussatché, 1998). O gel era corado com descrito no item 9.

O ensaio de *Western blot* era baseado em procedimento adaptado de Damaso *et al.* (2000). Todas as incubações eram feitas à temperatura ambiente sob agitação constante. Primeiramente, a membrana era incubada por 1 hora em solução de bloqueio [leite desnatado 5% em PBS-blot 1X (NaCl 1%; KCl 0,025%; NaHPO₄.7H₂O 0,0271%; KH₂PO₄ 0,025%)]. Em seguida, eram realizadas três lavagens de 5 minutos em PBS-blot 1X contendo Nonidet P-40 (NP-40) 0,05%. A membrana era, então, incubada com o anticorpo primário (Quadro 1) diluído em solução de bloqueio. Seguiam-se três lavagens de 5 minutos com PBS-blot 1X contendo NP-40 0,05% e a incubação por 1 hora com o anticorpo secundário apropriado (anti-IgG de coelho na diluição 1:4000 acoplado à enzima peroxidase [Santa Cruz Biotechnology]) diluído em leite desnatado 5%; PBS-blot 1X contendo NP-40 0,05%. Após duas lavagens de 7 minutos com PBS-blot contendo NP-40 0,05% e uma lavagem com PBS-blot 1X por 2 minutos, seguia-se a detecção das proteínas utilizando-se o kit luminol (Santa Cruz Biotechnology), segundo instruções do fabricante. A membrana era então exposta a filme de raios-X (T-MAT G/RA, Kodak).

Quadro 1: listagem dos anticorpos utilizados.

Anticorpo	Função da proteína	Policlonal/ monoclonal	Diluição	Tempo de incubação
Anti- VACV	Proteínas estruturais do VACV-WR	policlonal	1:3000	1 hora

Os anticorpos anti-F11 e anti-VACV pertencem à coleção do laboratório (Damaso e Moussatché, 1998; Kato *et al.*, 2004).

11. Análise do acúmulo de DNA viral

Para análise do acúmulo de DNA viral durante a infecção, as monocamadas eram infectadas com CTGV ou VACV-IOC com MOI de 1, como descrito anteriormente. Após o período de adsorção, era adicionado meio de cultura contendo ou não 20 µg/mL de CDV. O procedimento seguia o protocolo descrito por Rempel *et al.* (1990) e modificado por Damaso e Keller (1994). Em determinados tempos pós-infecção, as células eram recolhidas em 300 µL de solução de TLD (SSC 10X [NaCl 1,5 M; citrato de sódio 150 mM [pH 7,0]; acetato de amônia 1 M]) e armazenadas a -20 °C. As amostras eram congeladas a -70 °C e descongeladas três vezes. Adicionavam-se 500 µL de TLD a cada amostra e, em seguida, aquecia-as a 100 °C por 10 minutos.

A membrana de nylon (Hybond N+, Amersham) era previamente incubada por 10 minutos em SSC 10X. Eram aplicados de 50 a 70 µL dos extratos em triplicata na membrana, a vácuo, utilizando-se o sistema para slot-blot *Minifold II* (Schleicher & Schuell), segundo instruções do fabricante. Os poços eram lavados com 100 µL de TLD. A membrana era, então, incubada, à temperatura ambiente, por 10 minutos em solução desnaturante (NaOH 0,5 N; NaCl 1,5 M) e, posteriormente, lavadas por duas vezes de 10

minutos em SSC 10X. Após duas lavagens de 10 minutos com SSC 2X, o DNA era covalentemente ligado à membrana através de *cross-linking* (UVC-515 Ultraviolet Multilinker). As membranas eram armazenadas a -20 °C até posterior hibridização com sonda marcada radioisotopicamente.

12. Preparação da sonda radioisotopicamente marcada através de *nick-translation*

O fragmento *Hind* III D (16,1 kpb) do genoma do VACV cepa WR era utilizado como sonda. A reação de *nick-translation* era realizada de acordo com procedimento descrito por Rigby *et al.* (1977), com algumas modificações. A reação continha DNA (0,1-0,3 µg), tampão NTB 1X (Tris-HCl 50 mM, MgSO₄ 10 mM, DTT 0,1 mM, BSA 100 µg/ml [pH 7,5]), dNTPs 1mM (dATP, dGTP e dTTP), α³²P-dCTP (50 µCi), 20 pg de DNase I e 1 U de DNA polimerase I em volume final de 20 µL. A mistura era incubada a 15-16 °C por 1 hora. Após esse período era adicionado 180 µL de TE para interromper a reação.

A sonda era passada por uma coluna de exclusão (Sephadex G-50 em TE) para retirada dos nucleotídeos livres. A coluna, juntamente com a sonda, era centrifugada a 1000 rpm (Spin VI, Incibrás) por 1 minuto à temperatura ambiente. A fração eluída, correspondendo à sonda, era, então, recolhida como descrito por Sambrook *et al.* (1989). A radioatividade era determinada através de contador de cintilação líquida. A sonda era armazenada a -20 °C até posterior utilização.

13. Hibridização do DNA à sonda radioativa

Primeiramente, as membranas de nylon eram incubadas por duas horas a 42-43 °C em solução de pré-hibridização (formamida 50%, SSC 5X, solução de Denhardt's 1X [BSA 0,1%, ficol 0,1%, polivinilpirrolidona 0,1%], tampão fosfato de sódio 50 mM [pH 7,0], DNA de esperma de salmão sonicado 100 µg/mL e SDS 0,1%). Após esse período, eram adicionadas $2,5 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ CPM/mL da sonda, previamente incubada a 100 °C por 10 minutos. A hibridização era realizada a 42-43 °C por 16-20 horas (Damaso e Moussatché, 1992).

Posteriormente, as membranas eram lavadas três vezes durante 20 minutos a 55 °C em solução contendo SSC 0,1X e SDS 1% sob agitação constante. As membranas eram, então, expostas a filme de raios-X (T-MAT G/RA, Kodak) em presença de tela intensificadora a -70 °C.

14. Análise densitométrica

A análise densitométrica dos autorradiogramas era realizada após captura das imagens em formato TIFF através da digitalização dos filmes de raios-X. Os traçados densitométricos eram obtidos através do programa de análise e processamento de imagens Scion Image (Beta Release 4; Scion Corporation). Os valores eram obtidos como unidades arbitrárias.

Resultados

1. Avaliação da replicação viral em presença do CDV

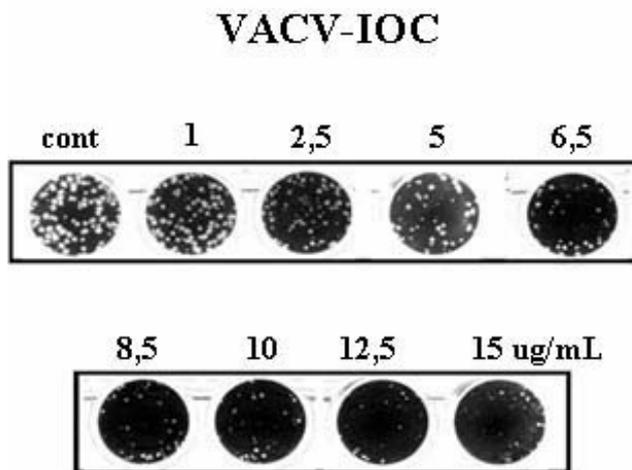
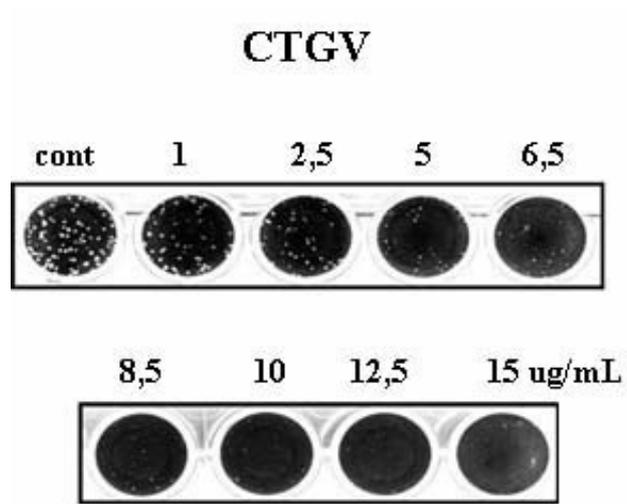
Primeiramente, foi realizado um rastreamento das concentrações de CDV capazes de inibir a replicação de CTGV e VACV-IOC. Para isso, monocamadas de células BSC-40 foram infectadas com 100 PFU ($\text{MOI} = 4 \times 10^{-4}$), em presença de concentrações crescentes de CDV, como descrito em Material e Métodos. Após 48 horas de infecção, as células foram coradas com solução de cristal violeta 0,1% e as placas virais foram contadas.

Podemos observar na Figura 5A um experimento representativo, no qual a droga inibiu a replicação de ambos os vírus de maneira dose-dependente, tanto em relação ao número de placas virais formadas quanto ao tamanho das mesmas. O gráfico da Figura 5B foi construído a partir de quatro experimentos independentes realizados em duplicata. O CTGV se mostrou mais sensível à ação antiviral do CDV em todas as concentrações testadas, apresentando aproximadamente 100% de inibição a partir de 8,5 $\mu\text{g/mL}$ para CTGV. Entretanto, na concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$, ainda é possível observar placas virais para o VACV-IOC (Figura 5A), apesar da inibição já estar bem pronunciada, cerca de 93% (Figura 5B).

Para analisarmos o efeito do CDV na formação de partículas infecciosas intracelulares, as células foram infectadas com 1000 PFU ($\text{MOI} = 1 \times 10^{-3}$) e incubadas com várias concentrações de CDV por 24 horas, quando, então, foram recolhidas para titulação por ensaio de placas, como descrito em Material e Métodos. Os resultados mostrados na Figura 5C revelam que o CDV foi capaz de inibir progressivamente a formação de progênie do CTGV e VACV-IOC, alcançando mais de 90% de inibição com 10 $\mu\text{g/mL}$ de CDV.

O IC_{50} é uma variável muito utilizada para medir a sensibilidade dos microorganismos à ação das drogas. Com base nas curvas apresentadas na Figura 5C,

A



Legenda na página seguinte.

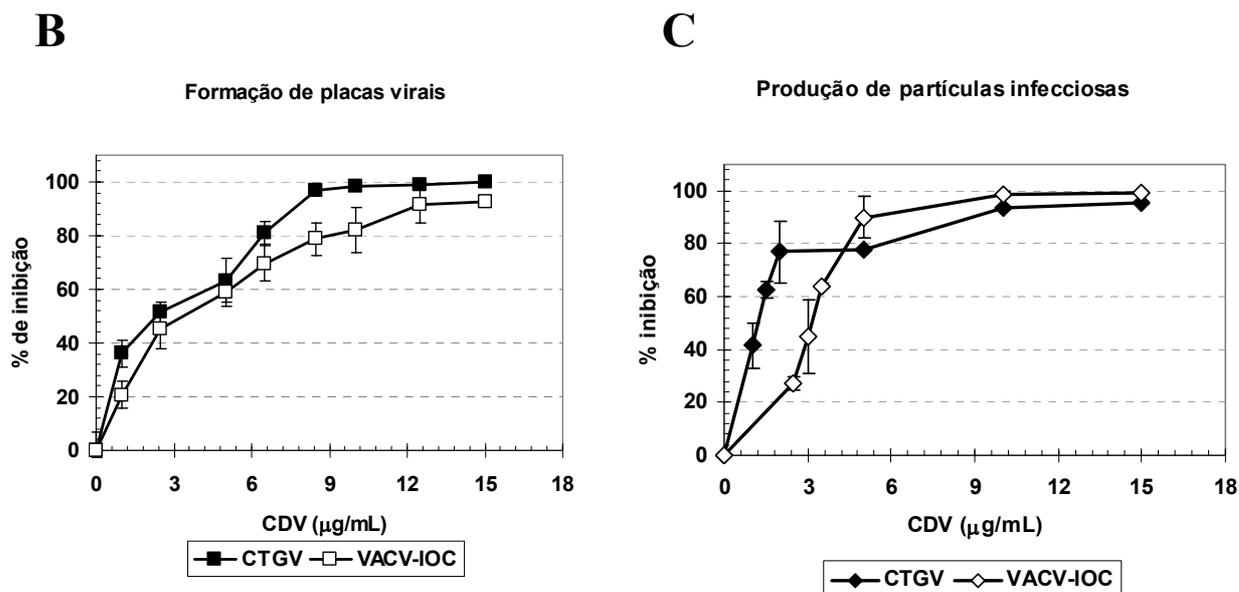


Figura 5: Avaliação da replicação viral em presença do CDV. A e B: Células BSC-40 foram infectadas com 100 PFU/poço ($MOI = 4 \times 10^{-4}$) de CTGV ou VACV-IOC e tratadas com as concentrações de CDV indicadas. Após 48 horas de infecção, as células foram coradas com solução de cristal violeta 0,1% e as placas virais foram contadas. (A) placas de culturas mostrando um experimento representativo; (B) gráfico construído a partir da média de 4 experimentos independentes realizados em duplicata. (C) Monocamadas de BSC-40 foram infectadas com 1000 PFU/poço ($MOI = 1 \times 10^{-3}$) e tratadas com as concentrações de CDV indicadas. As células foram recolhidas após 24 horas de infecção e o título viral determinado através de ensaio de placa, como descrito em Material e Métodos. O gráfico foi construído a partir da média de 2 experimentos independentes, titulados em duplicata.

calculamos o IC₅₀ para o CTGV em 1,2 µg/mL e 3,1 µg/mL para VACV-IOC. Assim como para a formação de placas virais, a produção de partículas infecciosas intracelulares do CTGV se mostrou mais sensível ao CDV do que o VACV-IOC.

2. Avaliação da citotoxicidade do CDV sobre as células BSC-40

O efeito observado sobre a replicação viral poderia ser um efeito direto, ou seja, a droga estaria agindo sobre os vírus, ou indireto, devido à ação tóxica da droga, o que acarretaria em uma replicação viral deficiente. Para descartar esta última hipótese, a citotoxicidade do composto foi analisada. Para isso, foi utilizado o método de captação do corante vital vermelho neutro, como descrito em Material e Métodos. As monocamadas de célula BSC-40 foram tratadas com diversas concentrações de CDV (até 200 µg/mL) e incubadas durante 24 ou 48 horas. Em seguida, foi adicionado o corante e, após os procedimentos descritos em Material e Métodos, a absorbância foi lida a 490 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem do controle (Figura 6).

Observamos que o CDV não se mostrou tóxico às células BSC-40 até a concentração de 200 µg/mL após 24 ou mesmo 48 horas de incubação com a droga. Assim, a inibição observada na formação de placas virais não está relacionada à perda de viabilidade celular, mas sim a um bloqueio em alguma fase do ciclo replicativo viral.

3. Efeito do CDV sobre a replicação de outros *Orthopoxvirus*

Devido ao fato do CTGV ser uma cepa de VACV encontrada na natureza, era interessante comparar sua sensibilidade com outras cepas de VACV e com outros *Orthopoxvirus*. Para isso, foram utilizadas duas cepas de VACV, WR e Wyeth, e o vírus

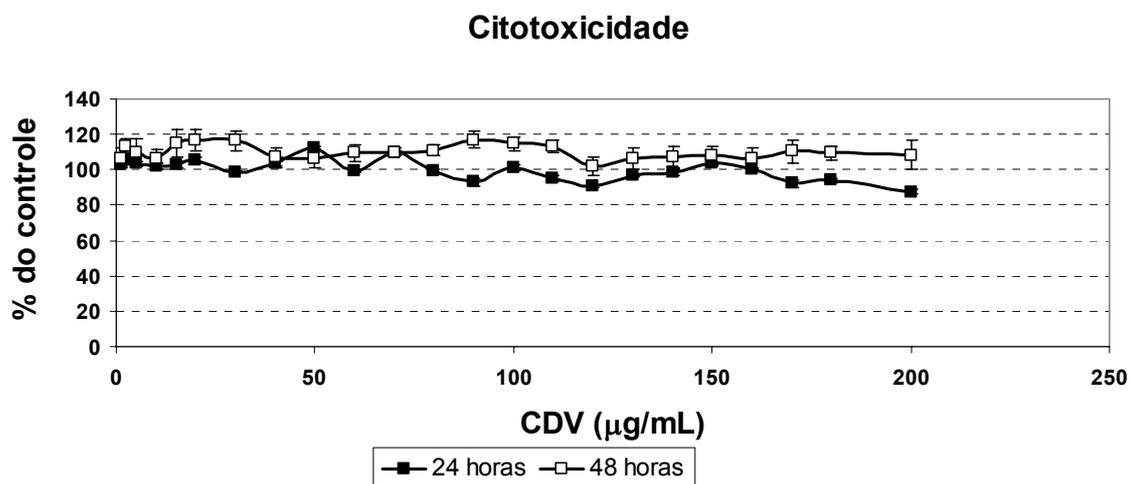


Figura 6: **Determinação da citotoxicidade do CDV sobre as células BSC-40.** As células foram incubadas a 37 °C por 24 ou 48 horas com as concentrações de CDV indicadas nos gráficos. A citotoxicidade foi analisada pelo método de captação do vermelho neutro e a absorbância foi lida a 490 nm, com descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos como porcentagem do controle. Os gráficos foram construídos a partir de 2 experimentos distintos realizados em replicatas de 8.

cowpox. As monocamadas de células BSC-40 foram infectadas 1000 PFU (MOI = 1×10^{-3}) em meio contendo ou não 1,2 $\mu\text{g/mL}$ de CDV (IC₅₀ do CTGV). As células foram recolhidas após 24 horas de infecção e as amostras utilizadas para determinação do título viral por ensaio de placa.

Podemos observar na Figura 7 que a replicação do VACV-Wyeth e VACV-WR se apresentou tão sensível ao CDV quanto o CTGV, alcançando uma inibição de aproximadamente 50%. Já o vírus cowpox se mostrou bem mais resistente que o CTGV, na medida em que a produção de partículas infecciosas foi inibida em aproximadamente 20% em comparação a 50% de inibição demonstrada para o CTGV.

4. Análise do efeito do pré-tratamento das células com CDV sobre a formação das placas virais

Já foi descrito na literatura que o CDV é capaz de promover o estabelecimento de um estado antiviral, devido à meia-vida longa de seus metabólitos (CDVp, CDVpp e CDV-colina) (Aduma *et al.*, 1995). Para observar a possível ocorrência desse efeito durante a replicação do CTGV e VACV-IOC, células BSC-40 foram pré-tratadas durante 1, 3, 5, 14, 17, 20 e 24 horas com 10 $\mu\text{g/mL}$ de CDV. As monocamadas foram então infectadas com MOI = 2×10^{-4} e, após o período de adsorção, foi adicionado meio de cultura sem droga. Como controle positivo da ação antiviral do CDV, células não pré-tratadas foram infectadas com ambos os vírus e receberam meio contendo CDV 10 $\mu\text{g/mL}$ no tempo zero de infecção. As placas virais foram visualizadas e contadas após 48 horas de infecção.

Observando a Figura 8, concluímos que o número das placas virais formadas para CTGV e VACV-IOC foi dependente do tempo de pré-tratamento. Assim, sem pós-tratamento e com apenas 1 hora de pré-tratamento, o CDV 10 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de

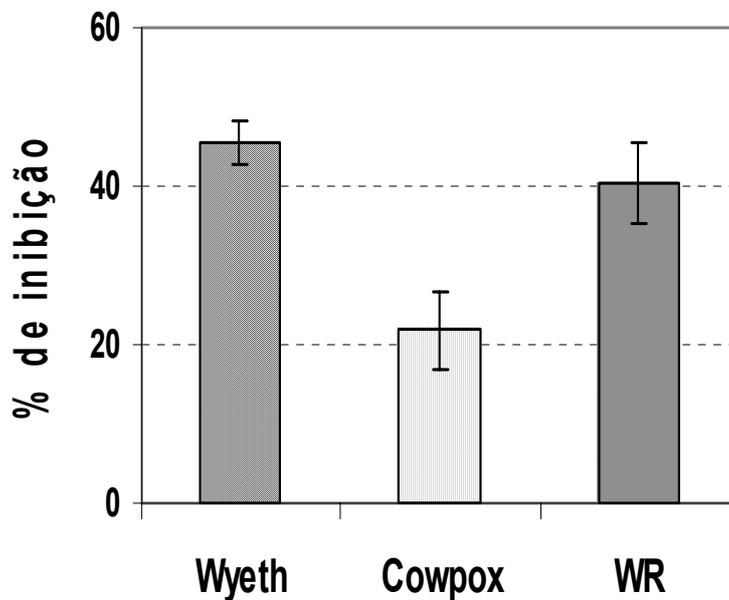


Figura 7: **Efeito do CDV sobre a replicação de outros *Orthopoxvirus***. Monocamadas de BSC-40 foram infectadas com 1000 PFU/poço ($MOI = 1 \times 10^{-3}$) dos vírus cowpox, VACV cepa WR e VACV cepa Wyeth e tratadas com 1,2 $\mu\text{g/mL}$ de CDV. Após 24 horas, as células foram recolhidas e as amostras tituladas por ensaio de placa. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição. O gráfico foi construído a partir de 2 a 5 experimentos independentes, titulados em duplicata.

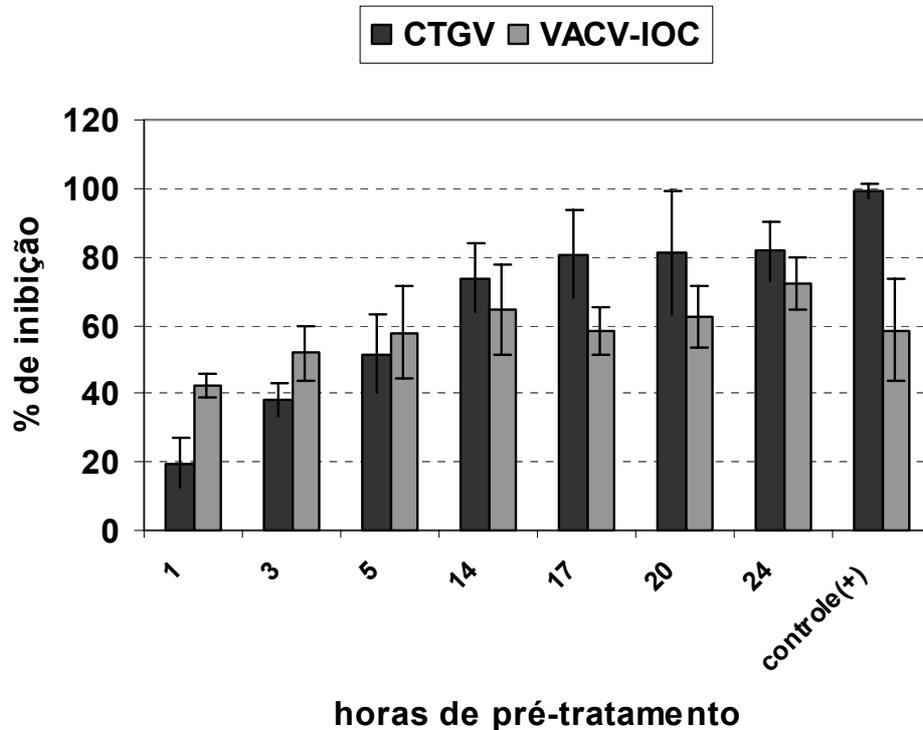


Figura 8: **Análise do efeito do pré-tratamento das células com CDV sobre a formação das placas virais.** Células BSC-40 foram pré-tratadas com 10 µg/mL durante os tempos indicados no gráfico e infectadas com 200 PFU/poço ($MOI = 2 \times 10^{-4}$) de CTGV ou VACV-IOC. No tempo zero, as monocamadas receberam meio sem CDV. Após 48 horas de infecção, as células foram coradas com solução de cristal violeta 0,1 % e as placas virais foram contadas. Para o controle positivo, as monocamadas não foram pré-tratadas e, no tempo zero de infecção, receberam meio contendo CDV 10 µg/mL por 48 horas, quando então as placas foram contadas. O gráfico foi construído a partir de 3 experimentos independentes realizados em duplicata.

estabelecer um estado antiviral, na medida em que observamos inibição de 20% e 40% na formação de placas do CTGV e VACV-IOC, respectivamente. Já com 24 horas de pré-tratamento, houve inibição de aproximadamente 80% e 70% para CTGV e VACV-IOC, respectivamente. No controle positivo, verificamos o padrão de inibição observado nos experimentos anteriores, exceto para VACV-IOC, que apresentou um nível de inibição um pouco mais baixo do que o observado na Figura 5B.

5. Avaliação do efeito inibitório do CDV em condições de MOI mais alta

Para iniciarmos o mapeamento das etapas afetadas em um único ciclo de infecção viral, era necessário elevar a MOI utilizada nos ensaios e diminuir o tempo de adsorção, de tal forma que obtivéssemos uma maior sincronização da infecção. Dessa maneira, era preciso redefinir, para estes novos parâmetros, a concentração de CDV capaz de inibir a produção de partículas infecciosas em 24 horas. Para isso, células BSC-40 foram infectadas com CTGV e VACV-IOC, utilizando MOI de 1 (1 PFU/célula). Após 30 minutos de adsorção (tempo zero), as monocamadas receberam meio contendo 10, 15 ou 20 µg/mL de CDV. A produção de progênie viral intracelular foi determinada após 24 horas de infecção e está apresentada na Tabela 1.

Verificamos uma crescente inibição do título viral com o aumento da concentração de CDV. Observamos que com 20 µg/mL houve inibição de 89,6 e 90,6% na formação de partículas infecciosas de CTGV e VACV-IOC, respectivamente. Assim, escolhemos a concentração de 20 µg/mL para todos os experimentos descritos a seguir, uma vez que obtivemos uma inibição do título viral de aproximadamente 90%, o que nos permite uma avaliação mais clara do efeito inibitório do CDV sobre as fases de expressão gênica viral.

Tabela 1: Avaliação do efeito inibitório do CDV em condições de MOI mais alta.

Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	<i>CTGV</i>		<i>VACV-IOC</i>	
	PFU/mL	% de inibição	PFU/mL	% de inibição
0 (controle)	$1,24 \times 10^8$	–	$8,68 \times 10^7$	–
10	$3,80 \times 10^7$	$69,3 \pm 7,4$	$3,06 \times 10^7$	$64,2 \pm 7,2$
15	$1,67 \times 10^7$	$88,9 \pm 6,8$	$2,08 \times 10^7$	$75,5 \pm 5,9$
20	$1,32 \times 10^7$	$89,6 \pm 3,7$	$0,85 \times 10^7$	$90,6 \pm 9,1$

Células BSC-40 foram infectadas com CTGV ou VACV-IOC (MOI de 1) e tratadas com as concentrações indicadas de CDV. Após 24 horas, as células foram recolhidas e as amostras tituladas através de ensaio de placa. Os dados são referentes à média de 3 a 5 experimentos independentes titulados em duplicata.

6. Análise da síntese de proteínas celulares em presença do CDV

Após termos escolhido a concentração adequada de CDV para inibir a replicação viral nas novas condições experimentais utilizadas, fomos observar se as monocamadas permaneciam metabolicamente ativas em presença desta concentração de CDV.

Para isso, tomamos como parâmetro de análise a síntese de proteínas celulares em presença da droga. Células BSC-40 não infectadas foram tratadas com CDV 20 µg/mL e, nos tempos indicados na Figura 9, foram processadas para a marcação metabólica das proteínas com ³⁵S-metionina, como descrito em Material e Métodos. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida-SDS 11,5%, seguido de exposição a filme de raios-X.

Como pode ser visto na Figura 9, a síntese de proteínas celulares não foi afetada pelo tratamento com CDV 20 µg/mL até 24 horas de incubação, tempo máximo utilizado em nossos experimentos que analisam um ciclo único de infecção. Estes dados confirmam os resultados obtidos anteriormente nos ensaios de citotoxicidade mostrados na Figura 6.

7. Avaliação do acúmulo de DNA viral em presença do CDV

Devido ao fato do CDV ser um análogo de nucleotídeo e de vários estudos terem demonstrado sua ação inibitória sobre a polimerização de nucleotídeos *in vitro*, utilizando DNA polimerase viral purificada (Xiong *et al.*, 1996; Xiong *et al.*, 1997; Magee *et al.*, 2005), a primeira etapa do ciclo analisada foi a replicação do DNA viral. As células foram infectadas com CTGV e VACV-IOC (MOI de 1), como já descrito, e tratadas com 20 µg/mL de CDV. Extratos celulares foram preparados em vários tempos pós-infecção, processados como descrito em Material e Métodos e amostras foram aplicadas, em

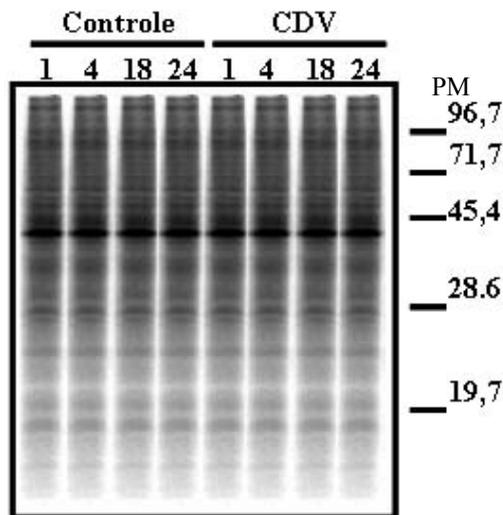


Figura 9: **Análise da síntese de proteínas celulares em presença do CDV.** Monocamadas de BSC-40 foram incubadas ou não com 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CDV. Nos tempos indicados no topo das raias, as células foram incubadas por 30 minutos em meio contendo ^{35}S -metionina, na presença ou ausência de CDV. As células foram, então, recolhidas e as amostras analisadas através de SDS-PAGE 11,5% seguido de autorradiografia. O padrão de peso molecular em kDa está indicado à direita da Figura.

triplicata, sobre membrana de nylon, a qual foi, em seguida, hibridizada com sonda específica marcada radioisotopicamente.

Podemos observar nas Figuras 10A e 10B, em um experimento representativo, que, em células controle, houve o acúmulo progressivo do DNA de CTGV e VACV-IOC ao longo das 24 horas de infecção, respectivamente. Em células tratadas com CDV, também verificamos o acúmulo de DNA de ambos os vírus com o progresso do ciclo, apesar de claramente observarmos uma inibição na replicação do DNA em todos os tempos a partir de 6 horas de infecção, em comparação às células controle.

Nas Figuras 10C e 10D mostramos a quantificação destes resultados obtida por análises densitométricas dos autorradiogramas. As porcentagens de inibição foram calculadas a partir de três experimentos independentes, todos com amostras aplicadas em triplicata. Observamos que, na presença de CDV, há uma redução pouco acentuada no acúmulo de DNA de CTGV (Figura 10A) e VACV-IOC (Figura 10B) a partir de 6 horas de infecção quando comparado à cinética de acúmulo de células controle. O efeito inibitório se intensifica ao longo da infecção e, com 24 horas, a inibição alcançou em média $(54,7 \pm 12,4)\%$ para CTGV e $(54,4 \pm 7,9)\%$ para VACV-IOC.

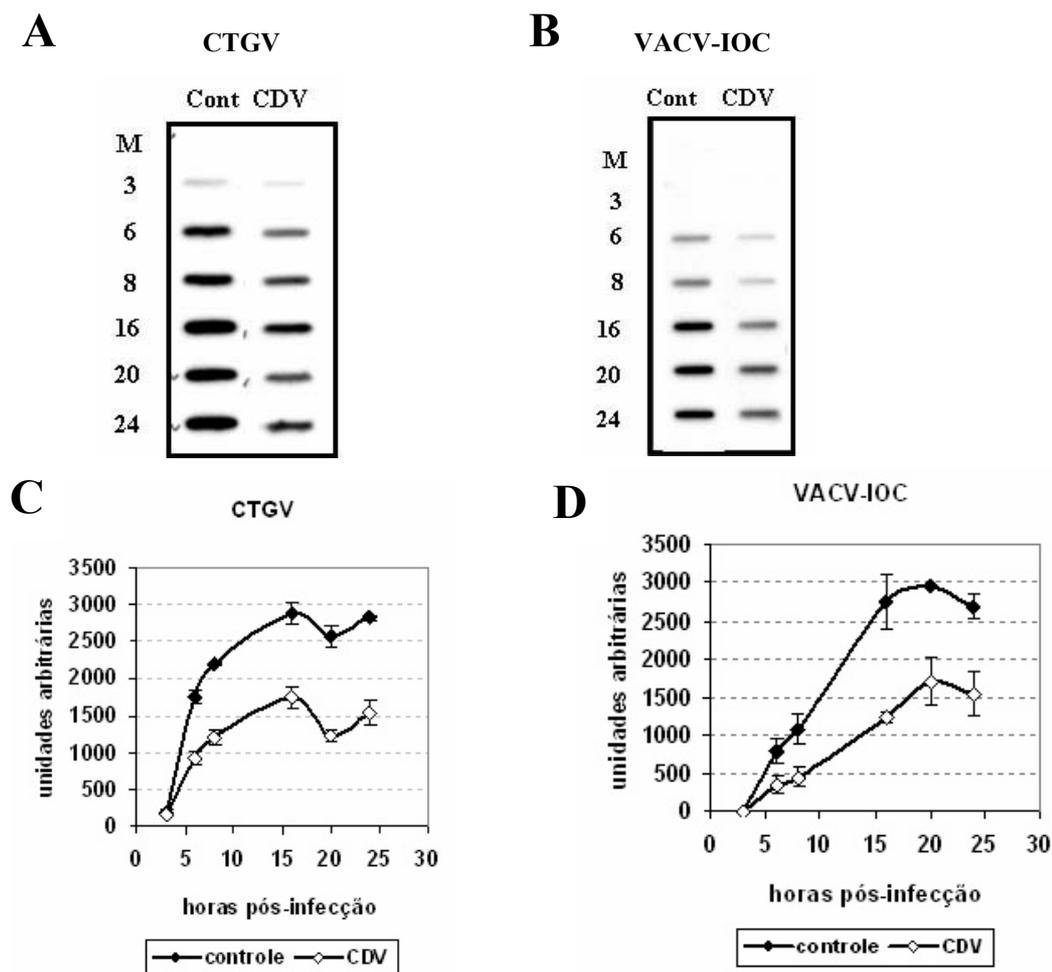


Figura 10: **Avaliação do acúmulo de DNA viral em presença do CDV.** Células foram infectadas com CTGV e VACV-IOC (MOI de 1) e tratadas ou não com CDV 20 µg/mL. Após os tempos indicados, as células foram recolhidas e as amostras transferidas, em triplicata e a vácuo, para membranas de nylon. As membranas foram utilizadas para hibridização com sonda marcada radioisotopicamente, correspondente ao fragmento D do genoma do VACV-WR, como descrito em Material e Métodos. As membranas foram posteriormente expostas a filme de raios-X. **A e B:** Ensaios representativos para CTGV e VACV-IOC, respectivamente. Os gráficos foram construídos após análise dos traçados densitométricos dos autorradiogramas de um experimento representativo para CTGV (**C**) e VACV-IOC (**D**).

8. Efeito do CDV sobre a replicação viral sob condições mais severas de inibição

Os resultados anteriores apontaram para uma ação mais tardia do CDV no ciclo replicativo de CTGV e VACV-IOC. Contudo, nos ensaios realizados, mantivemos uma inibição do título viral em aproximadamente 90%. Nosso próximo passo foi verificar se, sob condições mais severas de inibição, observaríamos efeito semelhante.

Para acentuar o efeito inibitório do CDV sobre a produção de partículas infecciosas, optamos por elevar a concentração intracelular de CDV, por meio do pré-tratamento das células durante 24 horas com 15 µg/mL de CDV. Como dito anteriormente, o CDV é capaz de promover o estabelecimento de um estado antiviral, devido à meia-vida longa de seus metabólitos (Aduma *et al.*, 1995). Assim, as células foram pré-incubadas com CDV 15 µg/mL e, no tempo zero, infectadas com CTGV e VACV-IOC (MOI de 5). A infecção transcorreu em ausência de droga. Após 24 horas de infecção, as células foram recolhidas para determinação do título viral através de ensaio de placas, como descrito em Material e Métodos. Na Tabela 2, podemos observar que após 24 horas de infecção, houve aproximadamente 100% de inibição na formação das partículas infecciosas produzidas em células pré-tratadas com CDV e infectadas por CTGV e VACV-IOC.

Após termos confirmado que o CDV é capaz de estabelecer um estado antiviral, inibindo a formação de partículas infecciosas de forma severa, fomos observar o acúmulo do DNA viral nas condições de pré-tratamento. Desse modo, as células foram pré-tratadas durante 24 horas com CDV 15 µg/mL e infectadas com CTGV e VACV-IOC (MOI de 5), com descrito. Após a adsorção, foi adicionado meio sem droga e as amostras foram processadas para análise da replicação do DNA viral.

A Figura 13 mostra que, para CTGV e VACV-IOC, houve inibição elevada do acúmulo do DNA viral nas células pré-tratadas em relação às células controle após 24

horas de infecção (Figuras 13A e 13B). A análise densitométrica dos autorradiogramas revelou que a inibição nas células pré-tratadas e infectadas com CTGV foi de 84,5% e de 82,3% para VACV-IOC.

Com a inibição significativa observada no acúmulo de DNA viral devido ao pré-tratamento, era interessante observar a expressão proteínas virais tardias sob estas condições. Assim, as células foram pré-tratadas e infectadas como descrito para análise do acúmulo de DNA viral e as amostras recolhidas após 24 horas de infecção e processadas para SDS-PAGE 10%, seguido de *western blot*, utilizando anticorpo anti-proteínas estruturais do VACV-WR, como descrito em Material e Métodos.

Tabela 2: Efeito do pré-tratamento das células com CDV sobre a formação de partículas virais infecciosas.

	<i>CTGV</i>		<i>VACV-IOC</i>	
	PFU/mL	% de inibição	PFU/mL	% de inibição
Controle	2×10^8	0	$8,92 \times 10^7$	0
24 h pré-tratamento	$8,5 \times 10^5$	99,6	3×10^5	96,7

Células BSC-40 foram pré-tratadas durante 24 horas com 15 µg/mL de CDV e posteriormente infectadas com CTGV ou VACV-IOC (MOI de 5). No tempo zero, as células receberam meio sem droga e, após 24 horas, foram recolhidas para titulação das amostras através de ensaio de placa. Controle: células não foram pré-tratadas, porém infectadas e receberam, posteriormente, meio sem droga.

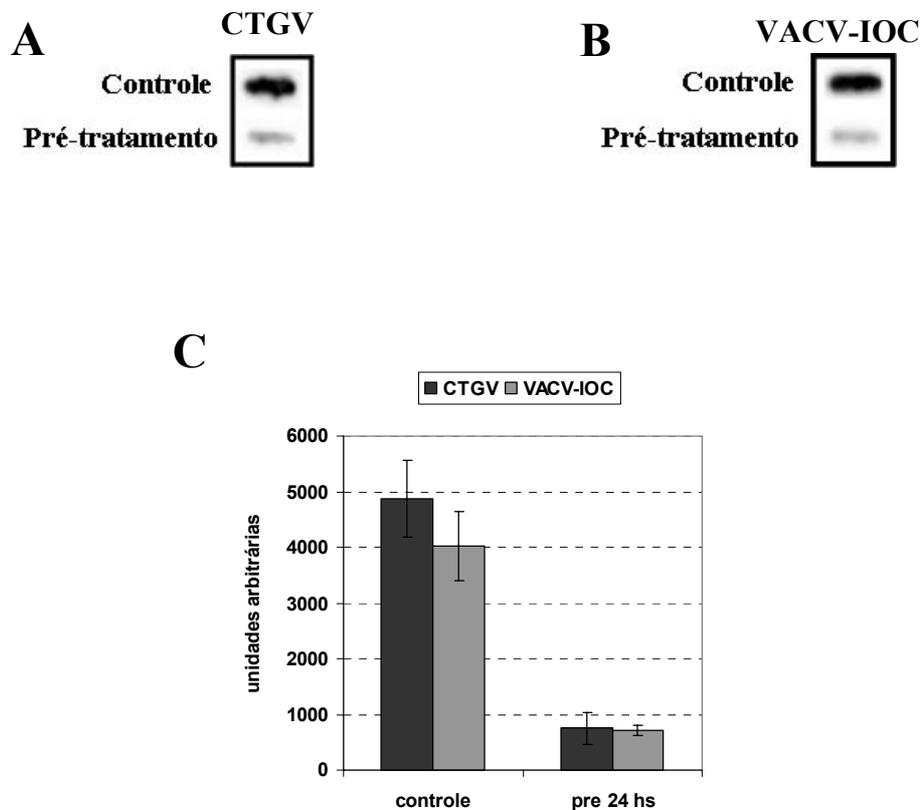


Figura 13: Efeito do pré-tratamento das células com CDV no acúmulo do DNA viral. As células BSC-40 foram pré-tratadas e infectadas como descrito na Figura anterior (MOI de 5) e, no tempo zero, receberam meio sem droga. Após 24 horas, as amostras foram recolhidas, processadas, como descrito em Material e Métodos, e aplicadas em membrana de nylon em triplicata, que foi utilizada para hibridização com sonda marcada radioisotopicamente, correspondente ao fragmento D do genoma do VACV-WR. Controle: células não foram pré-tratadas, porém infectadas e receberam, posteriormente, meio sem droga. (A) e (B) autorradiogramas de experimento representativo de CTGV e VACV-IOC, respectivamente. (C) quantificação dos autorradiogramas.

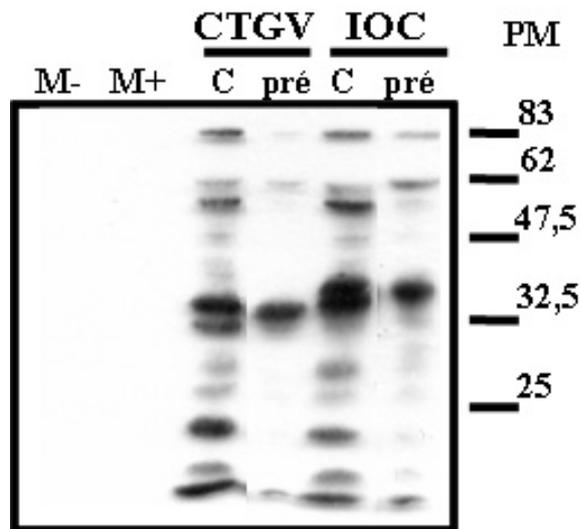


Figura 14: **Efeito do pré-tratamento das células com CDV no acúmulo das proteínas virais.** As células BSC-40 foram pré-tratadas (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e infectadas como descrito na Figura anterior (MOI de 5) e, no tempo zero, receberam meio sem droga. Após 24 horas, as amostras foram recolhidas e analisadas através de SDS-PAGE 10%, seguido de *western blot* utilizando anticorpo anti-proteínas estruturais do VACV-WR. M-: células não-infectadas e não pré-tratadas; M+: células não-infectadas e pré-tratadas com CDV; C: controle - células não pré-tratadas e infectadas; pré: células pré-tratadas e infectadas; o padrão de peso molecular em kDa está indicado à direita.

Na Figura 14, observamos que, assim como detectado para o acúmulo de DNA, houve uma maior inibição do acúmulo de proteínas virais tardias nas células pré-tratadas e infectadas com CTGV e VACV-IOC por 24 horas do que em células controle. A análise densitométrica revelou que a inibição em células pré-tratadas e infectadas com CTGV alcançou 72,6%. Para o VACV-IOC, a inibição foi de 70,9% nas células pré-tratadas. Estes resultados sugerem que, sob estas condições de tratamento, a inibição severa da replicação do DNA viral e a conseqüente redução também acentuada da fase pós-replicativa do ciclo foram provavelmente responsáveis pela inibição observada na produção de partículas infecciosas do CTGV e VACV-IOC.

Discussão

O vírus Cantagalo foi isolado em 1999 a partir de um surto que ocorreu em fazendas do noroeste do estado do Rio de Janeiro. A doença se manifestava com lesões nas mãos e braços dos retireiros e nas tetas e úberes do gado leiteiro. O CTGV foi caracterizado como pertencente à família *Poxviridae*, tendo como provável origem o VACV-IOC (Damaso *et al.*, 2000).

É consenso na literatura que o vírus vaccínia não possui hospedeiro natural. Dessa maneira, os vírus buffalopox e CTGV constituem duas exceções. O buffalopox tem sido isolado a partir de búfalos e humanos na Índia desde a década de 60 (Dumbell e Richardson, 1993; Kolhapure *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 2006). O CTGV, bem como os vírus filogeneticamente próximos, tem causado surtos em várias localidades do Brasil, como Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Goiás e Espírito Santo (Trindade *et al.*, 2003; Nagasse-Sugahara *et al.*, 2004, Leite *et al.*, 2005, Lobato *et al.*, 2005; Damaso *et al.*, 2007). Não há terapia antiviral disponível, assim como não há drogas licenciadas para o tratamento de nenhuma infecção causada por poxvírus.

O VACV-IOC foi utilizado pelo Instituto Oswaldo Cruz para vacinação contra a varíola durante a campanha de erradicação da doença promovida pela OMS. A doença foi considerada erradicada no final da década de 70, quando a vacinação foi, portanto, suspensa. Acredita-se que o vírus possa ter se estabelecido na natureza em alguma época durante o período de vacinação e, ao longo desses anos, acumulou diversos polimorfismos, emergindo como o CTGV (Damaso *et al.*, 2000; Ramos, 2003). Devido ao fato do VACV-IOC só ter sido propagado em laboratório e do CTGV ter se replicado durante, pelo menos, 30 anos na natureza, esses dois vírus constituem um bom modelo de comparação, único dentro da família *Poxviridae*.

Não existe nenhum antiviral comercialmente disponível para o tratamento das infecções causadas por poxvírus. Entretanto, o CDV é a droga de escolha da OMS para o tratamento dessas infecções devido ao fato de ser o antiviral mais promissor atualmente (Keith *et al.*, 2003; WHO, 2006).

O cidofovir é um análogo de nucleosídeo fosfonado que tem demonstrado atividade contra vírus de genoma DNA, tais como papilomavírus, poliomavírus, adenovírus, herpesvírus e poxvírus (De Clercq, 2003). Sua ação antiviral tem sido demonstrada em vários modelos animais bem como na clínica (Meadows, 1997; Davies, 1999; Zabawski e Cockerell, 1999; Ibarra, 2000; Toro *et al.*, 2000; Geerinck, 2001; Neyts e De Clercq, 2003).

Estudos com CDV mostram sua interação com a DNA polimerase do VACV. Além disso, mutantes resistentes ao CDV, isolados a partir de cultura de células, até o momento, sempre possuem mutações nesta enzima. Esses dados sugerem, portanto, que a fase de replicação do DNA seria o alvo do composto antiviral. Contudo, ainda não foi realizado um estudo detalhado para análise das fases do ciclo replicativo em presença da droga (Smee *et al.*, 2002; Magee *et al.*, 2005).

Ao longo dos anos, muitas drogas auxiliaram no estudo e compreensão do ciclo replicativo do VACV, tais como o antibiótico rifampicina, os imunossuppressores ciclosporina A e FK506, os análogos de nucleotídeo citosina arabinosídeo (Ara-C), novobiocina, e N₁-isonicotinoil-N₂-3 - metil - 4 - clorobenzoilhidrazina (IMCBH), além do nucleosídeo adenosina e do análogo de purina azatioprina (Heller *et al.*, 1969; Babiuk *et al.*, 1975; Payne e Kristenson, 1979; Hiller *et al.*, 1981; Damaso e Keller, 1994; Sekiguchi e Shuman, 1997; Damaso e Moussatché, 1998; Damaso *et al.*, 2002; Leão-Ferreira *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 2006). Isso demonstra a importância de se estudar como certas substâncias interferem no ciclo replicativo dos poxvírus. Este trabalho,

portanto, tem como objetivo avaliar o efeito antiviral do CDV sobre a replicação dos vírus CTGV e VACV-IOC e mapear as fases do ciclo replicativo afetadas, realizando uma comparação entre ambos os vírus.

Para iniciarmos o estudo, fomos avaliar a ação do CDV sobre a formação de placas virais de CTGV e VACV-IOC. Para isso, foram testadas várias concentrações do CDV. As curvas dose-respostas para ambos os vírus mostraram um efeito antiviral dose-dependente, tendo o CTGV se mostrado mais sensível que o VACV-IOC para todas as concentrações testadas (Figura 5A). A inibição alcançou 100% para CTGV a partir de 10 µg/mL e 93% para VACV-IOC na concentração de 15 µg/mL (Figura 5B).

Assim como para a formação de placas virais, o CTGV também se mostrou mais sensível com relação ao IC₅₀, o qual foi calculado em relação à produção de partículas virais intracelulares. O CTGV apresentou 50% de inibição de seu título com 1,2 µg/mL enquanto o VACV-IOC apresentou IC₅₀ de 3,1 µg/mL (Figura 5C).

A avaliação da citotoxicidade da droga confirmou que o CDV possui alta seletividade, uma vez que as maiores concentrações que apresentaram atividade antiviral, ou seja, 15 µg/mL para a formação de placas virais e produção de partículas infecciosas intracelulares (Figura 5), foram, pelo menos, dez vezes menores que a maior concentração testada para citotoxicidade (200 µg/mL). Tal concentração não exibiu toxicidade significativa para as células BSC-40 após 24 ou 48 horas de incubação (Figura 6). Mesmo quando elevamos a MOI para 1 e utilizamos 20 µg/mL, ainda trabalhamos com doses não citotóxicas (Tabela 1). Estes dados são corroborados pela atividade normal do aparato traducional celular em presença de CDV 20 µg/mL (Figura 9). Dessa maneira, o efeito antiviral do CDV é devido a uma ação direta sobre o vírus e não à sua citotoxicidade.

Este fato coloca questões interessantes, pois verificamos que CTGV e VACV-IOC apresentam sensibilidades diferentes ao CDV, com IC₅₀ distintos. Assim, podemos supor

que essas diferenças de respostas ao antiviral possam refletir polimorfismos existentes na molécula ou processo alvo do CDV. Outros estudos do laboratório já demonstraram diferenças de respostas a antivirais por esses vírus. A replicação do CTVG é 5 vezes mais sensível ao ST-246 do que a formação de placas do VACV-IOC (Santos e cols., dados não publicados). Por outro lado, a produção de progênie de VACV-IOC é 2,5 vezes mais sensível ao FK-506, quando comparado ao CTGV (Reis *et al.*, 2006).

A comparação com outros *Orthopoxvirus* mostrou que a sensibilidade ao CDV das cepas de VACV (WR e Wyeth), é semelhante à do CTGV. Contudo, o vírus cowpox se mostrou mais resistente que o CTGV (Figura 7). O IC₅₀ para VACV na literatura varia entre 10 µM e 46 µM, dependendo da cepa e do método utilizado para o cálculo (número de placas virais ou avaliação da intensidade do efeito citopático) (Kern *et al.*, 2002; Baker *et al.*, 2003; Keith *et al.*, 2003). Desse modo, tomando apenas os dados publicados na literatura, o CTGV se mostrou mais sensível que todas as outras cepas, com IC₅₀ de 4 µM (equivalente a 1,2 µg/mL), enquanto o VACV-IOC se mostrou tão sensível quanto a cepa VACV-NYCBH, cujo IC₅₀ é de 10 µM (3,1 µg/mL corresponde a 9,8 µM) (Kern *et al.*, 2002). Os resultados para WR que obtivemos, entretanto, diferiram da literatura, em que o IC₅₀ variou entre 32 e 45 µM, enquanto que observamos neste trabalho um comportamento semelhante ao CTGV (Kern *et al.*, 2002; Keith *et al.*, 2003). Não há dados descritos para a cepa Wyeth. Em relação ao vírus cowpox, apenas um dos trabalhos demonstra que ele é mais resistente ao CDV (Kern *et al.*, 2002). Nos outros, sua sensibilidade é semelhante àquela observada para as cepas de VACV (Baker *et al.*, 2003; Keith *et al.*, 2003).

Essas diferenças entre os resultados provavelmente são devido aos diferentes métodos e células utilizados, bem como à quantidade de vírus usada nos ensaios. Apenas neste trabalho, o IC₅₀ foi calculado em relação à formação de partículas virais intracelulares. Nos outros trabalhos, tal cálculo foi baseado na redução do número de

placas virais formadas ou na redução da intensidade do efeito citopático produzido (Kern *et al.*, 2002; Baker *et al.*, 2003; Keith *et al.*, 2003). Acreditamos que o primeiro método talvez não seja o mais apropriado, uma vez que o CDV causa redução tanto no tamanho das placas virais quanto no número das mesmas. Em relação à redução da intensidade do efeito citopático, é difícil realizar uma comparação devido ao fato de não haver quantificação direta do número de placas ou partículas virais.

Para o estudo das fases de expressão gênica afetadas, utilizamos uma MOI mais alta, que nos permite melhor sincronização do ciclo replicativo e também facilita a detecção dos produtos gênicos das fases da replicação viral. A Tabela 1 mostra que houve inibição significativa da formação de partículas virais (aproximadamente 90% para ambos os vírus) na concentração de 20 µg/mL. Esta concentração foi, portanto, a escolhida para dar continuidade aos experimentos, já que não apresentou toxicidade para as células BSC-40 (Figura 6).

A análise da replicação do DNA viral em presença do CDV foi nosso primeiro alvo, tendo em vista que já foi demonstrada a ação do antiviral sobre a síntese de DNA do CMV e do VACV. Verificamos uma inibição progressiva no acúmulo de DNA viral (Figura 10), que alcançou aproximadamente 50% para ambos os vírus.

Esta afirmação é corroborada quando comparamos o grau de inibição obtido neste trabalho com o estudo que demonstra a atividade antiviral da adenosina sobre o ciclo replicativo do VACV cepa WR. Neste caso, observa-se uma inibição também de aproximadamente 50% no acúmulo de DNA (Leão-Ferreira *et al.*, 2002). Além disso, há um prolongamento da expressão das proteínas iniciais, o que é esperado nos casos em que a fase tardia de expressão gênica encontra-se inibida (Baldick e Moss, 1993; Reis *et al.*, 2006). O mesmo ocorre em presença do antiviral ciclosporina A. Neste caso, a síntese de

DNA de VACV-WR é inibida em cerca de 60%, gerando uma redução da fase tardia de 85% e uma expressão gênica inicial mais prolongada do que na situação controle (Damaso e Keller, 1994).

Já foi demonstrado que o VACV produz mais DNA durante sua replicação do que é necessário para ser incorporado nas partículas virais. Desse modo, apenas cerca de 50% do DNA produzido é empacotado (Salzman, 1959; Joklik e Becker, 1964).

Um aspecto interessante de ser abordado, diz respeito à incorporação de CDV no genoma viral. A entrada do CDV na cadeia de DNA pode provocar distorções estruturais. Tais distorções podem fazer com que a DNA polimerase viral tenha dificuldades em posicionar corretamente a extremidade 3', provocando diminuição na taxa da síntese do DNA (Magee *et al.*, 2005).

Tal efeito foi observado, por exemplo, quando pré-tratamos as células com CDV, situação na qual já é descrito que há um acúmulo intracelular dos metabólitos do CDV de meia-vida longa, principalmente CDV colina (Aduma *et al.*, 1995). Nesse caso, observa-se uma inibição de aproximadamente 80% para o acúmulo de DNA e 70% para o acúmulo de proteínas tardias (Figuras 15 e 16). Além disso, observamos um efeito mais pronunciado também na redução da formação das partículas infecciosas (Tabela 2). A inibição observada no acúmulo de proteínas tardias devido a uma inibição do acúmulo de DNA é esperada, uma vez que as proteínas tardias só são sintetizadas após o início da replicação do DNA viral.

Esse efeito de inibição do acúmulo de proteínas pós-replicativas do VACV devido à inibição da síntese do DNA é observado com outras substâncias, como por exemplo, o óxido nítrico, FK-506, adenosina, ciclosporina A e brequinar (Melková e Esteban, 1995; Damaso e Keller, 1994; Damaso e Moussatché, 1998; Leão-Ferreira *et al.*, 2002; Reis *et*

al., 2006, Costa *et al.*, 2007). No caso dos ensaios com brequinar, a reversão do bloqueio na síntese de DNA, por incubação das células com uridina, também reverte proporcionalmente a inibição na formação de partículas infecciosas de VACV-WR (Costa *et al.*, 2007).

Da mesma maneira, o antibiótico novobiocina, que inibe a DNA girase bacteriana, é capaz de inibir a topoisomerase tipo I do VACV e a transcrição dos genes iniciais realizada pelo *core* do VACV *in vitro* (Sekiguchi *et al.*, 1996). Entretanto, em cultura de células, há inibição da morfogênese viral, enquanto as etapas anteriores ocorrem normalmente (Sekiguchi e Shuman, 1997).

Conclusões

- ❖ O CDV exibiu uma ação dose-dependente sobre a replicação dos vírus CTGV e VACV-IOC, levando a diminuição do número e do tamanho das placas virais.
- ❖ Houve 100% de inibição da formação de placas virais a partir de 10 µg/mL para CTGV e 93% de inibição para VACV-IOC com 15 µg/mL da droga.
- ❖ A replicação do CTGV se mostrou mais sensível ao CDV do que VACV-IOC em baixas MOIs, sendo o IC₅₀ de 1,2 µg/mL para CTGV e 3,1 µg/ml para VACV-IOC.
- ❖ O CDV não mostrou citotoxicidade significativa para as células BSC-40 até a concentração de 200 µg/mL, após 24 ou 48 horas de incubação com a droga.
- ❖ As cepas de VACV (WR e Wyeth) possuem sensibilidade ao CDV semelhante à observada para CTGV. Entretanto, o vírus cowpox se mostrou mais resistente.
- ❖ O pré-tratamento das células com CDV leva a um efeito antiviral sobre ambos os vírus, provocando, após 24 horas de pré-tratamento, 80% de inibição da formação de placas virais para o CTGV e 70% para o VACV-IOC.
- ❖ Utilizando MOI de 1 e 20 µg/mL de CDV, houve inibição de aproximadamente 90% do título viral para ambos os vírus após 24 horas de infecção.
- ❖ Nessas condições, o acúmulo de DNA viral foi inibido em cerca de 54,7% para CTGV e 54,4% para VACV-IOC.
- ❖ O pré-tratamento das células com CDV levou a uma inibição de aproximadamente 100% da formação de partículas virais infecciosas, 80% de inibição do acúmulo de DNA viral e 70% de inibição do acúmulo de proteínas virais tardias.

Referências Bibliográficas

- Aduma, P., Connelly, M.C., Srivinas, F.V. e Fridland, A.** (1995) Metabolic diversity and antiviral activities of acyclic nucleoside phosphonates. *Molecular Pharmacology* **47**, 816-822.
- Andrei, G., Snoeck, R., De Clercq, E., Esnouf, R., Fiten, P. e Opdenakker, G.** (2000) Resistance of herpes simplex virus type 1 against different phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purines and pyrimidines due to specific mutations in the viral DNA polymerase gene. *Journal of General Virology* **81(Pt 3)**, 639-648.
- Andrei, G., Gammon, D.B., Fiten, P., De Clercq, E., Opdenakker, G., Snoeck, R. e Evans, D.H.** (2006) Cidofovir resistance in vaccinia virus is linked to diminished virulence in mice. *Journal of Virology* **80(19)**, 9391-9401.
- Ansarah-Sobrinho, C. e Moss, B.** (2004) Role of the I7 protein in proteolytic processing of vaccinia virus membrane and core components. *Journal of Virology* **78(12)**, 6335-6343.
- Babiuk, L.A., Meldrum, B., Gupta, V.S. e Rouse, B.T.** (1975) Comparison of the antiviral effects of 5-methoxymethyl-deoxyuridine with 5-iododeoxyuridine, cytosine arabinoside, and adenine arabinoside. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **8(6)**, 643-650.
- Baldick, C.J. Jr e Moss, B.** (1993) Characterization and temporal regulation of mRNAs encoded by vaccinia virus intermediate-stage genes. *Journal of Virology* **67(6)**, 3515-3527.
- Balzarini, J., Pannecouque, C., De Clercq, E., Aquaro, S., Perno, C.-F, Egberink, H. e Holý, A.** (2002) Antiretrovirus activity of a novel class of acyclic pyrimidine nucleoside phosphonates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46(7)**, 2185-2193.
- Baker, R.O., Bray, M. e Huggins, J.W.** (2003) Potential antiviral therapeutics for smallpox, monkeypox and other orthopoxvirus infections. *Antiviral Research* **57**, 13-23.

- Baxby, D.** (1977). The origins of vaccinia virus. *Journal of Infectious Disease* **136**, 453-455.
- Bray, M., Martinez, M., Smee, D.F., Kefauver, D., Thompson, E. e Huggins, J.W.** (2000) Cidofovir protects mice against lethal aerosol or intranasal cowpox virus challenge. *Journal of Infectious Disease* **181(1)**, 10-19.
- Bray, M., Martinez, M., Kefauver, D., West, M., e Roy, C.** (2002) Treatment of aerosolized cowpox virus infection in mice with aerosolized Cidofovir. *Antiviral Research* **54**, 129-142.
- Bray, M. e Roy, C.J.** (2004) Antiviral prophylaxis of smallpox. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**, 1-5.
- Broyles, S.S., Li, J. e Moss, B.** (1991) Promoter DNA contacts made by the vaccinia early transcription factor. *The Journal of Biological Chemistry* **266(23)**, 15539-15544.
- Broyles, S.** (2003) Vaccinia virus transcription. *Journal of General Virology* **84**, 2293-2303.
- Carter, G.C., Law, M., Hollinshead, M. e Smith, G.L.** (2005) Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. *Journal of General Virology* **86(5)**, 1279-1290.
- Byrd, C.M. e Hruby, D.E.** (2005) A conditional-lethal vaccinia virus mutant demonstrates that the I7L gene product is required for virion morphogenesis. *Virology Journal*, **2:4**.
- Cassetti, M. C., Merchlinsky, M., Wolffe, E. J., Weisberg, A. S. e Moss, B.** (1998). DNA packaging mutant: Repression of the vaccinia virus A32 gene results in noninfectious, DNA-deficient, spherical, enveloped particles. *Journal of Virology* **72**, 5769–5780.

- Castro, A.P.V., Carvalho, T.M.U., Moussatché, N. e Damaso, C.R.A.** (2003) Redistribution of cyclophilin A to viral factories during vaccinia virus infection and its incorporation into mature particles. *Journal of Virology* **77(16)**, 9052-9068.
- Charity, J.C., Katz, E. e Moss, B.** (2007) Amino acid substitutions at multiple sites within the vaccinia virus D13 scaffold protein confer resistance to rifampicin. *Virology* **359(1)**, 227-232.
- Chimerix Inc.** (2007) http://www.chimerix-inc.com/pdfs_news/CMX001.pdf. Acesso em março de 2007.
- Chung, C.S., Hsiao, J.C., Chang, Y.S. e Chang, W.** (1998) A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *Journal of Virology* **72(2)**, 1577-1585.
- Cihlar, T., Fuller, M.D, Mulato, A.S. e Cherrington, J.M.** (1998) A point mutation in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene selected in vitro by cidofovir confers a slow replication phenotype in cell culture. *Virology* **248(2)**, 382-393.
- Condit, R.C. e Niles, E.G.** (2002) Regulation of viral transcription elongation and termination during vaccinia virus infection. *Biochimica et Biophysica Acta* **1577(2)**, 325-336.
- Condit, R.C., Moussatché, N. e Traktman, P.** (2006) In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion. *Advances in Virus Research* **66**, 31-124.
- Connelly, M.C., Robbins, B.L. e Fridland, A.** (1993) Mechanism of uptake of the phosphonate analog (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine (HPMPC) in Vero cells. *Biochemical Pharmacology* **46(6)**, 1053-1057.
- Costa L., Moussatché N. e Damaso C.** (2007). Brequinar inhibits vaccinia virus replicative cycle blocking virus DNA replication. Manuscrito em preparação.

- Dales, S. e Mosbach, E.H.** (1968) Vaccinia as a model for membrane biogenesis. *Virology* **35(4)**, 564-683.
- Damaso, C.R., e Moussatché, N.** (1992) Detection of RNA-protein complex in vaccinia virus core in vitro transcription system. *Journal of General Virology* **73(Pt 5)**, 1243-1249.
- Damaso, C.R. e Keller, S.J.** (1994) Cyclosporin A inhibits vaccinia virus replication in vitro. *Archives of Virology* **134(3-4)**, 303-319.
- Damaso, C.R. e Moussatché, N.** (1998) Inhibition of vaccinia virus replication by cyclosporin A analogues correlates with their affinity for cellular cyclophilins. *Journal of General Virology* **79 (2)**, 339-346.
- Damaso, C.R.A., Esposito, J.J., Condit, R.C. e Moussatché, N.** (2000). An emergent poxvirus from human and cattle in Rio de Janeiro state: Cantagalo virus may derive from brazilian smallpox vaccine. *Virology* **277**, 439-449.
- Damaso, C.R., Oliveira, M.F., Massarani, S.M. e Moussatché, N.** (2002) Azathioprine inhibits vaccinia virus replication in both BSC-40 and RAG cell lines acting on different stages of virus cycle. *Virology* **300(1)**, 79-91.
- Damaso, C.R., Reis, S.A., Jesus, D.M., Lima P.S. e Moussatché, N.** (2007) A PCR-based assay for detection of emerging vaccinia-like viruses isolated in Brazil. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease* **57(1)**, 39-46.
- Davies, E.G., Thrashes, A., Lacey, K. e Harper, J.** (1999) Topical cidofovir for severe molluscum contagiosum. *Lancet* **353(9169)**, 2042.
- De Clercq** (1991) Broad-spectrum anti-DNA virus and anti-retrovirus activity of phosphonylmethoxyalkylpurines and -pyrimidines. *Biochemical Pharmacology* **42(5)**, 963-972.

- De Clercq** (1997) Acyclic nucleoside phosphonates in the chemotherapy of DNA virus and retrovirus infections. *Intervirology* **40**, 295-303.
- De Clercq, E.** (2001) Vaccinia virus as a paradigm for the chemotherapy of poxvirus infections. *Clinical Microbiology Reviews* **14(2)**, 382-397.
- De Clercq** (2002) Cidofovir u the treatment of poxvirus infections. *Antiviral Research* **55**, 1-13.
- De Clercq** (2003) Clinical potential of oh the acyclic nucleoside phosphonates cidofovir, adefovir, and tenofovir in treatment of DNA virus and retrovirus infections. *Clinical Microbiology Reviews* **16(4)**, 569-596.
- De Clercq, E. e Neyts, J.** (2004) Therapeutic potential of nucleoside/nucleotide analogues against poxvirus infections. *Reviews in Medical Virology* **14(5)**, 289-300.
- De Clercq** (2005) Antiviral drug discovery and development: where chemistry meet with biomedicine. *Antiviral Research* **67**, 56-75.
- De Clercq e Holý, A.** (2005) Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* **4(11)**, 928-940.
- De Clercq** (2006) The acyclic nucleoside phosphonates from inception to clinical use: historical perspective. *Antiviral Research*, doi: 10.1016/j.antiviral.2006.10.2006. (in press).
- De Clercq** (2007) Acyclic nucleoside phosphonates: past, present and future. *Biochemical Pharmacology* **73(7)**, 911-922.

- DeMasi, J., Du, S., Lennon, D. e Traktman, P.** (2001) Vaccinia virus telomeres: interaction with the viral I1, I6, and K4 proteins. *Journal of Virology* **75(21)**, 10090-10105.
- De Miranda, P., Beacham, L. M., 3rd, Creagh, T. H. e Elion, G. B.** (1975). The metabolic disposition of ¹⁴C-azathioprine in the dog. *The Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics* **195(1)**, 50-57.
- Du, S. e Traktman, P.** (1996) Vaccinia virus DNA replication: two hundred base pairs of telomeric sequence confer optimal replication efficiency on minichromosome templates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93(18)**, 9693-9698.
- Dumbell, K., e Richardson, M.** (1993). Virological investigation of specimens from buffaloes affected by buffalopox in Maharashtra State, India between 1985 and 1987. *Archives in Virology* **128**, 257-267.
- Elion, G. B.** (1993). The George Hitchings and Gertrude Elion Lecture. The pharmacology of azathioprine. *Annals of New York Academy Sciences* **685**, 400-407.
- Esposito, J.J. e Fenner, F.** (2001) Poxviruses. In *Fields Virology*. Eds D.M. Knipe, p.M. Howley, D.E. Griffin et al. Philadelphia: Lippincot Willoans & Wilkins, pp 2885-2921.
- Fenner, F., Henderson, D.A., Arita, I., Jezek, J. e Ladnyi, I.D.** (1988) Smallpox and its eradication. *Geneva: World Health Organization*.
- Garcia, A.D. e Moss, B.** (2001) Repression of vaccinia virus Holliday junctions resolvase inhibits processing of viral DNA into unit-length genomes. *Journal of Virology* **75(14)**, 6460-6471.

- Geerinck, K., Lukito, G., Snoeck, R., De Vos, R., De Clercq, E., Vanrenterghem, Y., Degreef, H. e Maes, B.** (2001) A case of human orf in an immunocompromised patient treated successfully with cidofovir cream. *Journal of Medical Virology* **64(4)**, 543-549.
- Gilead** (2007) http://www.chimerix-inc.com/pdfs_news/CMX001.pdf . Acesso em março de 2007.
- Goebel, S.J., Johnson, G.P., Perkus, M.E., Davis, S.W., Winslow, J.P. e Paoletti, E.** (1990) The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* **179(1)**, 247-266, 517- 563.
- Grimley, P. M., Rosenblum, E. N., Mims, S. J. e Moss, B.** (1970). Interruption by Rifampin of an early stage in vaccinia virus morphogenesis: Accumulation of membranes which are precursors of virus envelopes. *Journal of Virology* **6**, 519–533.
- Grubisha, O. e Traktman, P.** (2003). Genetic analysis of the vaccinia virus I6 telomere-binding protein uncovers a key role in genome encapsidation. *Journal of Virology* **77**, 10929–10942.
- Heller, E., Argaman, M., Levy, H. e Goldblum, N.** (1969) Selective inhibition of vaccinia virus by the antibiotic rifampicin. *Nature* **222(5190)**, 273-274.
- Heuser, J.** (2005) Deep-etch EM reveals that the early poxvirus envelope is a single membrane bilayer stabilized by a geodetic "honeycomb" surface coat. *The Journal of cell biology* **169(2)**, 269-283.
- Hiller, G., Eibl, H. e Weber, K.** (1981) Characterization of intracellular and extracellular vaccinia virus variants: N1-isonicotinoyl-N2-3-methyl-4-chlorobenzoylhydrazine interferes with cytoplasmic virus dissemination and release. *Journal of Virology* **39(3)**, 903-913.

- Hollinshead, M., Vanderplasschen, A, Smith, G.L. e Vaux, D.J.** (1999) Vaccinia virus intracellular mature virion contain only one lipid membrane. *Journal of Virology* **73(2)**, 1503-1517.
- Holý, A., Votruba, A., Merta, J., Cerný, J., Veselý, J., Vlach, J., Sedivá, K., Rosenberg, I., Otmar, M., Hrebabecký, H., Trávníček, M., Vonka, V., Snoeck, R. e De Clercq, E.** (1990) Acyclic nucleotide analogues: synthesis, antiviral activity and inhibitory effects on some cellular and virus-encoded enzymes *in vitro*. *Antiviral Research* **13**, 295-312.
- Hsiao, J.C., Chung, C.S. e Chang, W.** (1999) Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *Journal of Virology* **73(10)**, 8750-8761.
- Hu, X., Carroll, L.J., Wolffe, E.J. e Moss, B.** (1996) De novo synthesis of the early transcription factor 70-kilodalton subunit is required for morphogenesis of vaccinia virions. *Journal of Virology* **70(11)**, 7669-7677.
- Hu, X., Wolffe, E.J., Weisberg, A.S., Carroll, L.J. e Moss, B.** (1998) Repression of the A8L gene, encoding the early transcription factor 82-kilodalton subunit, inhibits morphogenesis of vaccinia virions. *Journal of Virology* **72(1)**, 104-112.
- Ibarra, V., Blanco, J.R., Oteo, J.A. e Rosel, L.** (2000) Efficacy of cidofovir in the treatment of recalcitrant molluscum contagiosum in an AIDS patient. *Acta Dermatoveneorologica* **80(4)**, 315-316.
- Jesus, D.M.** (2005) Efeito Antiviral do Cidofovir sobre a Replicação do Vírus Cantagalo e da Cepa Vacinal IOC. Monografia, Instituto de Biologia, UFRJ. 47 pg.

- Johnson, J.A. e Gangemi, D.** (1999) Selective inhibition of human papillomavirus-induced cell proliferation by (S)-1-[3-hydroxy-2-(Phosphonylmethoxy)propyl]cytosine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43(5)**, 1198-1205.
- Joklik, W.K. e Becker, Y.** (1964) The replication and coating of vaccinia DNA. *Journal of Molecular Biology* **10**, 452-474.
- Kane, E.M. e Shuman, S.** (1993) Vaccinia virus morphogenesis is blocked by a temperature-sensitive mutation in the I7 gene that encodes a virion component. *Journal of Virology* **67(5)**, 2689-2698.
- Kates, J.R. e Beeson, J.** (1970) Ribonucleic acid synthesis in vaccinia virus. II. Synthesis of poliriboadenylic acid. *Journal of Molecular Biology* **50**, 19-23.
- Kato, S.E.M., Strahl, A.L., Moussatché, N. e Condit, R.C.** (2004) Temperature-sensitive mutants in the vaccinia virus 4b virion structural protein assemble malformed, transcriptionally inactive intracellular mature virions. *Virology* **330**, 127-146.
- Kates, J. e Beeson, J.** (1970) Ribonucleic acid synthesis in vaccinia virus. I. The mechanism of synthesis and release of RNA in vaccinia cores. *Journal of Molecular Biology* **50(1)**, 1-18.
- Katsafanas, G.C. e Moss, B.** (2004) Vaccinia virus intermediate stage transcription is complemented by Ras-GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein (G3BP) and cytoplasmic activation/proliferation-associated protein (p137) individually or as a heterodimer. *The Journal of Biological Chemistry* **279(50)**, 52210-52217.
- Katz, E. e Moss, B.** (1970) Formation of vaccinia virus structural polypeptide from a higher molecular weight precursor: inhibition by rifampicina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **66**, 677-684.

- Keck, J.G., Baldick, C.J. Jr e Moss, B.** (1990) Role of DNA replication in vaccinia virus gene expression: a naked template is required for transcription of three late trans-activator genes. *Cell* **61**, 801-809.
- Keith, K.A., Hitchcock, M.J., Lee, W.A., Holý, A. e Kern, E.R.** (2003) Evaluation of nucleoside phosphonates and their analogs and prodrugs for inhibition of orthopoxvirus replication. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47(7)**, 2193-2198.
- Kern, E.R, Hartline, C., Harden, E., Keith, K., Rodríguez, N., Beadle, J.R. e Hostetler, K.Y.** (2002) Enhanced inhibition of Orthopoxvirus replication in vitro by alkoxyalkyl esters of cidofovir and cyclic cidofovir. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46(4)**, 991-995.
- Kinchington, P.R., Araullo-Cruz, T., Vergnes, J.P., Yates, K. e Goedon, Y.J.** (2002) Sequence changes in the human adenovirus type 5 DNA polymerase associated with resistance to the broad spectrum antiviral cidofovir. *Antiviral Research* **56(1)**, 73-84.
- Kolhapure, R.M., Deolankar, R.P., Tupe C.D., Raut, C.G., Basu, A., Dama, B.M., Pawar S.D., Joshi, M.W., Paddidri, V.S., Goverdhan, M.K. e Banerjee, K.** (1997). Investigation of buffalopox outbreaks in Maharashtra State during 1992-1996. *The Indian Journal of Medical Research* **106**, 441-446.
- Kornbluth, R.S., Smee, D.F., Sidwell, R.W., Snarsky, V., Evans, D.H. e Hostetler, K.Y.** (2006) Mutations in the E9L polymerase gene of cidofovir-resistant vaccinia virus strain WR are associated with the drug resistance phenotype. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50(12)**, 4038-4043.
- Kramata, P., Votruba, I., Otová, B. e Holý, A.** (1996) Different inhibitory potencies of acyclic phosphonmethoxyalkyl nucleotide analogs toward DNA polymerases α , δ and ϵ . *Molecular Pharmacology* **49**, 1005-1011.

- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **7(5259)**, 680-685.
- Leão-Ferreira, L.R., Paes-De-Carvalho, R., De Mello, F.G. e Moussatché, N.** (2002) Inhibition of vaccinia virus replication by adenosine in BSC-40 cells: involvement of A(2) receptor-mediated PKA activation. *Archives of Virology* **147(7)**, 1407-1423.
- Leite, J.A., Drumond, B.P., Trindade, G.S., Lobato, Z.I.P., da Fonseca, F.G., dos Santos, J.R., Madureira, M.C., Guedes, M.I.M.C., Ferreira, J.M.S., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P e Kroon, E.G.** (2005) Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* **11(12)**, 1935-1938.
- Lin, C.L., Chung, C.S., Heine, H.G. e Chang, W.** (2000) Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo. *Journal of Virology* **74(7)**, 3353-3365.
- Lobato, Z.I.P., Trindade, G.S., Frois, M.C.M., Ribeiro, E.B.T., Dias, G.R.C., Teixeira, B.M., Lima, F.A., Almeida, G.M.F. e Kroon, E.G.** (2005) Surto de varíola bovina causada pelo vírus vaccínia na região da zona da Mata Mineira. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **57(4)**, 423-429.
- Magee, W.C., Hostetler, K.Y. e Evans, D.H.** (2005) Mechanism of inhibition of vaccinia virus DNA polymerase by cidofovir diphosphate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49(8)**, 3153-3162.
- Magno, R.C., Lemgruber, L., Vommaro, R.C., de Souza, W. e Attias, M.** (2005) Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. *Microscopy Research and Technique* **67(1)**, 45-52.

- Meadows, K.P., Tyring, S.K., Pavia, A.T. e Rallis, T.M.** (1997) Resolution of recalcitrant molluscum contagiosum virus lesions in human immunodeficiency virus-infected patients treated with cidofovir. *Archives of dermatology* **133(8)**, 987-990.
- Melková, Z. e Esteban, M.** (1995) Inhibition of vaccinia virus DNA replication by inducible expression of nitric oxide synthase. *Journal of Immunology* **155(12)**, 5711-5718.
- Morgan, C.** (1976) Vaccinia virus reexamined: development and release. *Virology* **73**, 43-58.
- Moss, B.** (2001). Poxviridae: the viruses and their replication. *Fundamental Virology*, 4ª edição, pp1249-1283. Lippincott Williams & Wilkins.
- Murono, S., Raab-Traub, N. e Pagano, J.S.** (2001) Prevention and inhibition of nasopharyngeal carcinoma growth by antiviral phosphonates nucleoside analogs. *Cancer Research* **61**, 7875-7877.
- Naesens, L., Lenaerts, L., Andrei, G., Snoeck, R., Beers, D.V., Holý, A., Balzarini, J. e De Clercq, E.** (2005) Antiadenovirus activities of several classes of nucleoside and nucleotide analogues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49(3)**, 1010-1016.
- Nagasse-Sugahara, T.K., Kisielius, J.J., Uead-Ito, M., Curti, S.P., Figueiredo, C.A., Cruz, A.S., Silva, M.M.J., Ramos, C.H., Silva, M.C.C., Sakurai, T. e Salles-Gomes, L.S.** (2004) Human vaccinia-like virus outbreaks in São Paulo and Goiás states, Brazil: virus detection, isolation and identification. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **46(6)**, 315-322.
- Nettleton, P.F., Gilray, J.A., Reid, H.W. e Mercer. A.A.** (2000) Parapoxviruses are strongly inhibited in vitro by Cidofovir. *Antiviral Research* **48**, 205-208.
- Neyts, J., Snoeck, R., Schols, D., Balzarini, J. e De Clercq, E.** (1990) Selective inhibition of human cytomegalovirus DNA synthesis by (S)-1-(3-hydroxy-2-

phosphonylmethoxypropyl)cytosine [(S)-HPMPC] and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine (DHPG). *Virology* **179**, 41-50.

Neyts, J. e De Clercq, E. (1993) Efficacy of (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine for the treatment of lethal vaccinia virus infections in severe combined immunodeficiency (SCID) mice. *Journal of Medical Virology* **41(3)**, 242-246.

Neyts, J. e De Clercq, E. (2003) Therapy and short-term prophylaxis of poxvirus infections: historical background and perspectives. *Antiviral Research* **57**, 25-33.

Neyts, J., Leyssen, P., Verbeken, E. e De Clercq, E. (2004) Efficacy of cidofovir in a murine model of disseminated progressive vaccinia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48(6)**, 2267-2273.

Oh, J e Broyles, S.S. (2005) Host nuclear proteins are recruited to cytoplasmic vaccinia virus replication complexes. *Journal of Virology* **79(20)**, 12852-12860.

Payne, L.G. e Kristenson, K. (1979) Mechanism of vaccinia virus release and its specific inhibition by N1-isonicotinoyl-N2-3-methyl-4-chlorobenzoylhydrazine. *Journal of Virology* **32(2)**, 614-622.

Ploubidou, A., Moreau, V., Ashman, K., Reckmann, I, Gonzalez, C. e Way, M. (2000) Vaccinia virus infection disrupts microtubule organization and centrosome function. *The EMBO journal* **19(15)**, 3934-3944.

Poxvirus Bioinformatics Resource Center (PBR) (2006) www.poxvirus.org

Poxvirus Bioinformatics Resource Center (PBR) (2007) www.poxvirus.org

- Ramos, B. N. A.** (2003) Análise comparativa do vírus vaccínia Cantagalo e o vírus vaccínia vacinal por meio de PCR-RFLP. Monografia, IMPPG, UFRJ. 50 pg.
- Reis, S.A.** (2004) Vírus Cantagalo e cepa vacinal IOC: caracterização do gene B18R e do efeito antiviral do Interferon tipo I. Dissertação de mestrado, IBCCF, UFRJ. 105 pg.
- Reis, S.A., Moussatché, N. e Damaso, C.R.** (2006) FK506, a secondary metabolite produced by *Streptomyces*, presents a novel antiviral activity against Orthopoxvirus infection in cell culture. *Journal of Applied Microbiology* **100(6)**, 1373-1380.
- Rempel, R.E., Anderson, M.K., Evans, E. e Traktman, P.** (1990) Temperature-sensitive vaccinia virus mutants identify a gene with an essential role in viral replication. *Journal of Virology* **64(2)**, 574-583.
- Rigby, P.W., Dieckmann, M., Rhodes, C. e Berg, P.** (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *Journal of Molecular Biology* **113(1)**, 237-251.
- Rodríguez, J.R., Risco, C., Carrascosa, J.L., Esteban, M. e Rodríguez, D.** (1998) Vaccinia virus 15-kilodalton (A14L) protein is essential for assembly and attachment of viral crescents to virosomes. *Journal of Virology* **72(2)**, 1287-1296.
- Roy, C.J., Baker, R., Washburn, K. e Bray, M.** (2003) Aerosolized Cidofovir is retained in the respiratory tract and protects mice against intranasal cowpox virus challenge. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47(9)**, 2933-2937.
- Quenelle, D.C., Collins, D.J. e Kern, E.R.** (2004) Cutaneous infections of mice with vaccinia or cowpox viruses and efficacy of Cidofovir. *Antiviral Research* **63**, 33-40.
- Salzman, N.P.** (1960) The rate of formation of vaccinia deoxyribonucleic acid and vaccinia virus. *Virology* **10**, 150-152.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. e Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory press, E.37-E.38, 2nd edition.
- Scagliarini, A., McInnes, C.J., Gallina, L., Dal Pozzo, F., Scagliarini, L., Snoeck, R., Proserpi, S., Sales, J., Gilray, J.A. e Nettleton, P.F.** (2007) Antiviral activity of HPMPC (cidofovir) against orf virus infected lambs. *Antiviral Research* **73(3)**, 169-174.
- Schatzmayer, H.G., Lemos, E.R., Mazur, C., Schubach, A., Majerowicz, S., Rozentel, T., Schubach, T.M., Bustamante, M.C. e Barth, O.M.** (2000) Detection of poxvirus in cattle associated with human cases in the State of Rio de Janeiro: preliminary report. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **95(5)**, 625-627.
- Schmelz M., Sodeik B., Ericsson M., Wolffe E.J., Shida H., Hiller G. e Griffiths G.** (1994) Assembly of vaccinia virus – the 2nd wrapping cisterna is derived from the trans-Golgi Network. *Journal of Virology* **68**, 130–147.
- Schramm, B. e Locker, J.K.** (2005) Cytoplasmic organization of Poxvirus DNA replication. *Traffic* **6**, 839-846.
- Sekiguchi J., Stivers, J.T., Mildvan, A.S. e Shuman, S.** (1996) Mechanism of inhibition of vaccinia DNA topoisomerase by novobiocin and coumermycin. *Journal of Biological Chemistry* **271(4)**, 2313-2322.
- Sekiguchi J. e Shuman S.** (1997). Novobiocin inhibits vaccinia virus replication by blocking virus assembly. *Virology* **235**, 129-137.
- Senkevich, T.G., Ojeda, S., Townley, A., Nelson, G.E. e Moss, B.** (2005) Poxvirus multiprotein entry-fusion complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102(51)**, 18572-18577.

- Singh R.K., Hosamani M., Balamurugan V., Satheesh C.C., Shingal K.R., Tatwarti S.B., Bambal R.G., Ramteke V. e Yadav M.P.** (2006). An outbreak of buffalopox in buffalo (*Bubalus bubalis*) dairy herds in Aurangabad, India. *Revue Scientifique et Technique* **25**, 981-987.
- Sippel, A. e Hartmann, G.** (1968) Mode of action of rifampicin in the RNA polymerase reaction. *Biochimica et Biophysica Acta* **157**, 218-219.
- Sirianni, N., Wang, J., e Ferris, R.L.** (2005) Antiviral activity of Cidofovir on a naturally human papillomavirus-16 infected squamous cell carcinoma of the head and neck (SSCCHN) cell line improves radiation sensitivity. *Oral Oncology* **41**, 423-428.
- Smee, D.F., Barnett, B.B, Sidwell, R., Reist, E.J. e Holý, A.** (1995) Antiviral activities of nucleosides and nucleotides against wild-type and drug-resistant strains of murine cytomegalovirus. *Antiviral Research* **26(1)**, 1-9.
- Smee, D.F., Bailey, K.W., Wong, M. e Sidwell, R.** (2001a) Effects of Cidofovir on the pathogenesis of a lethal vaccinia virus respiratory infection in mice. *Antiviral Research* **52**, 55-62.
- Smee, D.F., Bailey, K.W. e Sidwell, R.** (2001b) Treatment of lethal vaccinia virus respiratory infections in mice with cidofovir. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **12(1)**, 71-76.
- Smee, D.F, Sidwell, R.W., Kefauver, D., Bray. M. e Huggins, J.W.** (2002) Characterization of wild-type and cidofovir-resistant strains of camelpox, cowpox, monkeypox, and vaccinia viruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46(5)**, 1329-1335.
- Smee, D.F, e Sidwell, R.W.** (2003) A review of compounds exhibiting anti-poxvirus activity in animal models. *Antiviral Research* **57**, 41-52.

- Smee, D.F., Wandersee, M.K., Vailey, K.W., Hostetler, K.Y., Holý, A. e Sidwell, R.W.** (2005) Characterization and treatment of cidofovir-resistant vaccinia (WR strain) virus infections in cell culture and in mice. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **16(3)**, 203-211.
- Smith, G.L., Vanderplasschen, A. e Law, M.** (2002) The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *Journal of General Virology* **83**, 2915-2931.
- Snoeck, R., Andrei, G. e De Clercq, E.** (1996) Patterns of resistance and sensitivity to antiviral compounds of drug-resistant strains of human cytomegalovirus selected in vitro. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease* **15(7)**, 574-579.
- Sodeik, B., Griffiths, G., Ericsson, M., Moss, B. e Doms, R.W.** (1994). Assembly of vaccinia virus: effects of rifampin on the intracellular distribution of viral protein p65. *Journal of Virology* **68(2)**, 1103-1114.
- Sodeik, B. e Locker, J.** (2002) Assembly of vaccinia virus revisited: *de novo* membrane synthesis or acquisition from the host? *TRENDS in Microbiology* **10(1)**, 15-24.
- Stitteelaar, K.J, Neyts, J., Naesens, L., van Amerongen, G., van Lavieren, R.F., Holý, A., De Clercq, E., Niesters, H.G., Fries, E., Mass, C., Mulder, P.G., van der Jeijst, B.A. e Osterhaus, A.D.** (2006) Antiviral treatment is more effective than smallpox vaccination upon lethal monkeypox virus infection. *Nature* **439(7077)**, 745-748.
- Szajner, P., Jaffe, H., Weisberg, A.S. e Moss, B.** (2004) A complex of seven vaccinia virus proteins conserved in all chordopoxviruses is required for the association of membranes and viroplasma to form immature virions. *Virology* **330**, 447-459.
- Thompson, K.D.** (1998) Antiviral activity of viracea against acyclovir susceptible and acyclovir resistant strains of herpes simplex virus. *Antiviral Research* **39**, 55-61.

- Toro, J.R., Sanchez, S., Turiansky, G. e Blauvelt, A.** (2000) Topical cidofovir for the treatment of dermatologic conditions: verruca, condyloma, intraepithelial neoplasia, herpes simplex and its potential use in smallpox. *Dermatologic Clinics* **21(2)**, 301-9.
- Traktman, P.** (1996) Poxvirus DNA replication. DNA Replication in Eukaryotic Cells. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 775-798.
- Trindade, G.S., da Fonseca, F.G., Marques, J.T, Nogueira, M.L., Mendes, L.C.N., Borges, A.S., Peiró, J.R., Pituco, E.M., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P. e Kroon, E.G.** (2003) Araçatuba Virus: a vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle. *Emerging Infectious Diseases* **9(2)**, 155-160.
- Tuske, S., Sarafianos, S.G., Clarck Jr, A.D., Ding, J., Naeger, L.K., White, K.L., Miller, M.D., Gibbs, G.S., Boyer, P.L., Clarck, P., Wang, G., Gaffney, B.L., Jones, R.A., Jerina, D.M., Hughes, S.H. e Arnold, E.** (2004) Structures of HIV-1 RT-DNA complexes before and after incorporation of the anti-AIDS drug tenofovir. *Nature Structural and Molecular Biology* **11(5)**, 469-474.
- Unger, B., e Traktman, P.** (2004). Vaccinia virus morphogenesis: A13 phosphoprotein is required for assembly of mature virions. *Journal of Virology* **78**, 8885–8901.
- Ward, B.M. e Moss, B.** (2001) Vaccinia virus intracellular movement is associated with microtubules and independent of actin tails. *Journal of Virology* **75(23)**, 11651-63.
- Wey, C.M. e Moss, B.** (1975) Methylated nucleotides block 5'-terminus of vaccinia virus messenger RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72(1)**, 318-322.
- World Health Organization** (2006) Smallpox eradication: destruction of variola virus stocks. *Executive Board 117th session*, 16 janeiro.

http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB117/B117_33-en.pdf.

Xiong, X., Smith, J.L., Kim, C., Huang, E.S. e Chen, M.S. (1996) Kinetic analysis of the interaction of cidofovir diphosphate with human cytomegalovirus DNA polymerase. *Biochemical Pharmacology* **51(11)**, 1563-1567.

Xiong, X., Smith, J.L. e Chen, M.S. (1997) Effect of incorporation of cidofovir into DNA by human cytomegalovirus DNA polymerase on DNA elongation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41(3)**, 594-599.

Yoder, J.D., Chen, T.S., Gagnier, C.R., Vemulapalli, E., Maier, C.S. e Hruby, D.E. (2006) Pox proteomics: mass spectrometry analysis and identification of Vaccinia virion proteins. *Virology Journal* **3(10)**, 1-16.

Zabawiski, E.J. Jr. e Cockerell, C.J. (1999) Topical cidofovir for molluscum contagiosum in children. *Pediatric Dermatology* **16(5)**, 414-5.

Zhang, Y. e Moss, B. (1992). Immature viral envelope formation is interrupted at the same stage by lac operator-mediated repression of the vaccinia virus D13L gene and by the drug rifampicin. *Virology* **187(2)**, 643-653.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)