

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
CENTRO DE ESTUDOS GERAIS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA**

**BRUNO RODRIGUES SIMONETTI**

**Detecção de vírus semelhante ao  
vaccinia em bovinos no estado do Rio  
de Janeiro e estudo da atividade  
antiviral dos derivados oxoquinolínicos**

**Orientadora: Izabel Christina de Palmer Paixão  
Co-orientador: Hermann Gonçalves Schatzmayr**

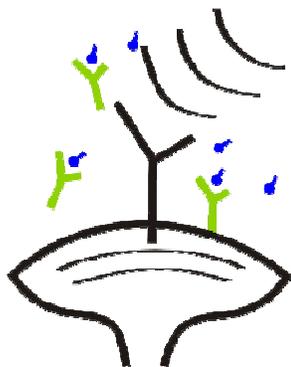


**NITERÓI  
2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
CENTRO DE ESTUDOS GERAIS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA

**BRUNO RODRIGUES SIMONETTI**

**Detecção de vírus semelhante ao  
vaccinia em bovinos no estado do Rio  
de Janeiro e estudo da atividade  
antiviral dos derivados oxoquinolínicos**

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL  
FLUMINENSE VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE  
EM NEUROIMUNOLOGIA

**Orientadora: Izabel Christina de Palmer Paixão  
Co-orientador: Hermann Gonçalves Schatzmayr**



**NITERÓI  
2009**

S 598 Simonetti, Bruno Rodrigues

Detecção de vírus semelhante ao vaccinia em bovinos no estado do Rio de Janeiro e estudo da atividade antiviral dos derivados oxoquinolínicos/Bruno Rodrigues Simonetti. – Niterói, RJ: [s.n.], 2009.

123f.

Dissertação. – (Mestrado em Neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense, 2009.

1.Poxvírus. 2.Quinolonas. 3.Síntese Orgânica. 4. Antiviral.  
I.Título

CDD.: 576.6484

**BRUNO RODRIGUES SIMONETTI**

**Detecção de vírus semelhante ao vaccinia  
em bovinos no estado do Rio de Janeiro e  
estudo da atividade antiviral dos derivados  
oxoquinolínicos**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Virologia Molecular do Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biologia – UFF, em colaboração com o Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ.

Orientadora: Izabel Christina de Palmer Paixão

Co-orientador: Hermann Gonçalves Schatzmayr

Niterói  
2009

# **BRUNO RODRIGUES SIMONETTI**

## **Detecção de vírus semelhante ao vaccinia em bovinos no estado do Rio de Janeiro e estudo da atividade antiviral dos derivados oxoquinolínicos**

Dissertação de mestrado submetida  
à Universidade Federal Fluminense  
como requisito parcial para  
obtenção de grau de Mestre em  
Neuroimunologia.

Niterói, 29 de abril de 2009.

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Ledy do Horto dos Santos Oliveira  
UFF

---

Dra. Diana Negrão Cavalcante  
UFF

---

Dra. Elba Regina Sampaio Lemos  
FIOCRUZ

---

Viveca Giongo (Revisora e Suplente)  
UFF

*A alegria está na luta,  
na tentativa, no sofrimento  
envolvido. Não na vitória  
propriamente dita.*

***Mahatma Gandhi***

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus pela proteção, saúde e por mais uma conquista.*

*Aos meus orientadores doutora Izabel Christina de Palmer Paixão e doutor Hermann Gonçalves Schatzmayr que foram extremamente profissionais em todos os momentos.*

*Ao grande profissional e eterno amigo José da Costa Farias Filho (“Zequinha”). Pessoa exemplar e de bom caráter. Agradeço por tudo nestes últimos anos.*

*Ao corpo docente do programa de pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal Fluminense e a todos os funcionários da UFF e FIOCRUZ. Agradecimentos especiais à Dra Monika O. Barth Schatzmayr do Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral do IOC*

*Agradeço aos meus pais José e Sandra pelo carinho, pelas orientações, pelo amor oferecido e por serem pessoas maravilhosas.*

*Agradeço ao meu querido irmão André que tem me ajudado cada vez mais. Um verdadeiro irmão.*

*Agradeço a toda a minha família. Mesmo longe estão sempre presentes.*

*Agradecimento especial à Fabiana pelas longas conversas e trocas de idéias. Pessoa de extrema importância em minha vida.*

*Aos meus maiores amigos (Rafael, Thiago e Vinícius). Pessoas que me acompanham há anos e estão sempre ao meu lado, me dando força para novos projetos e conquistas.*

*À Clarisse por ter me encorajado em mais uma etapa na vida.*

*Agradeço também a querida Gaya... uma cachorra maluca.*

## SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1 - HISTÓRICO.....	24
1.2 - POXVÍRUS E CONSIDERAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS.....	29
1.3 - O VÍRUS.....	37
1.4 - CICLO REPLICATIVO.....	41
1.5 - ASPECTOS GERAIS SOBRE SINAIS E SINTOMAS CLÍNICOS.....	44
1.6 - SUBSTÂNCIAS ANTIVIRAIS.....	48
1.6.1 - Cidofovir (CDV).....	48
1.6.2 - Derivados Oxoquinolínicos.....	51
<b>2 - OBJETIVOS.....</b>	<b>53</b>
2.1 - OBJETIVO GERAL.....	53
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
<b>3 - MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>54</b>
3.1 - ESTUDO DA PRESENÇA DE <i>ORTHOPOXVIRUS</i> NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.....	54
3.1.1 - Amostras clínicas e desenho de estudo.....	54
3.1.2 - Análise laboratorial.....	55
3.1.2.1 - <i>Cultura de células VERO</i> .....	55
3.1.2.2 - <i>Metodologia molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR) específica para o gene da hemaglutinina (HA)</i> .....	56
3.2 - ATIVIDADE ANTIVIRAL E CITOTÓXICA DE ANTIVIRAIS.....	58
3.2.1 - Vírus Cantagalo – Instituto Oswaldo Cruz (CTGV-IOC).....	58
3.2.2 - Vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1).....	59
3.2.3 – Substâncias antivirais.....	59

3.2.4 - Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs).....	61
3.2.5 - Avaliações dos derivados oxoquinolínicos.....	61
3.2.5.1 - Avaliação do efeito citotóxico dos derivados ( $CC_{50}$ ).....	61
3.2.5.2 - Avaliação da inibição do efeito citopático ( $TCID_{50}$ ).....	63
3.2.5.3 - Avaliação da inibição da produção do CTGV-IOC ( $EC_{50}$ ).....	65
3.2.6 - Comparativo dos derivados em PBMCs e HIV-1.....	66
3.2.6.1 - Avaliação da viabilidade de PBMCs através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolio (XTT).....	66
3.2.6.2 - Atividade inibitória anti-HIV-1 em PBMC.....	67
<b>4 - RESULTADOS.....</b>	<b>68</b>
4.1 – ESTUDO DA CIRCULAÇÃO DE <i>ORTHOPOXVIRUS</i> NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.....	68
4.1.1 - Caracterização das lesões produzidas por <i>Orthopoxvirus</i> .....	68
4.2 – ANÁLISE LABORATORIAL.....	71
4.2.1 - Identificação de <i>Orthopoxvirus</i> .....	71
4.2.1.1 - Observação ao microscópio eletrônico.....	71
4.2.1.2 - Isolamento viral.....	72
4.2.1.3 - Neutralização de redução de placa.....	72
4.2.1.4 - Extração, amplificação e revelação de fragmentos de DNA do gene da HA.....	72
4.2.2 - Avaliação dos derivados oxoquinolínicos.....	76
4.2.2.1 - Valores referentes à avaliação do efeito citotóxico ( $CC_{50}$ ).....	76
4.2.2.2 - Avaliação da inibição do efeito citopático viral ( $TCID_{50}$ ).....	77
4.2.2.3 - Avaliação da inibição da produção viral ( $EC_{50}$ ).....	79
4.2.2.4 - Comparativo de resultados com os derivados na presença do	

<i>HIV-1</i> .....	82
<b>5 - DISCUSSÃO</b> .....	84
<b>6 - CONCLUSÃO</b> .....	94
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	95
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	96
<b>PRODUÇÃO VINCULADA À LINHA DE PESQUISA</b> .....	110

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% – Porcentagem

°C – Grau Celsius

μL – Microlitro

μM – Micromolar

AMEV – Entomopoxvirus *Amsacta moorei*

AZT – Zidovudina

BPV – Vírus buffalopox

CC<sub>50</sub> – Citotoxicidade em 50%

CCR5 – *Chemokine receptor 5*

CDV – Cidofovir

Cl – Cloro

CLEV – Entomopoxvirus *Chironomus luridus*

cm – Centímetros

CMV – Citomegalovírus

CN – Controle negativo

CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono

CP – Controle positivo

CPE – Efeito citopático

CPV – Vírus cowpox

CTGV – Vírus Cantagalo

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EC<sub>50</sub> – Concentração da droga capaz de inibir em 50% a replicação viral

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EEV – Vírus envelopado extracelular

GAGs – Glicosaminoglicanos

H<sub>2</sub>O – Água

HA – Hemaglutinina

HCl – Ácido clorídrico

HFF – *Human foreskin fibroblast*

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HPMPA – (S) - 9 - (3-hidroxi-2-fosfonilmetoxiproil) adenina

HPMPC – (S) - 1 - (3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil) citosina

HSV-1 – Vírus herpes simples tipo – 1

HSV-2 – Vírus herpes simples tipo – 2

IL-2 – Interleucina-2

IMV – Vírus maturo intracelular

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

ITRs – Inverted terminal repeats

kb – Quilobyte

kbp – Quilo pares de base

M – Molar

mg/mL – Miligramas por mililitro

MIX – Mixtures

mL – Mililitro

mM – Milimolar

MMEV – Entomopoxvirus *Melolontha melolontha*.

MOI – Multiplicidade de infecção

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide

N – Normal

NIH – National Institute of Health

nm – Nanomolar

OMS – Organização Mundial da Saúde

Orf – Vírus que causa a dermatite pustular contagiosa ou ectima contagioso

pb – Pares de base

PBMCs – células mononucleares de sangue periférico

PBS – Salina tamponada com fosfato

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PFU – Unidades formadoras de placas virais

pH – Potencial hidrogeniônico

PHA – Fitohemaglutinina

PTA – Ácido fosfotúngstico

-R – *Resistant*

RFLP – Fragmentos polimórficos por enzima de restrição

RNA – Ácido ribonucléico

RPMI – Mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular

SDS – Dodecilsulfato de sódio

SFB – Soro fetal bovino

SI – Índice de Seletividade

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

Tat – Transativador de transcrição

TCID<sub>50</sub> – Diluição requerida de vírus para infectar 50% das células inoculadas

U/mL – Unidades por mililitro

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

UHT – Ultra high temperature

USA – United States of America

UV – Luz ultravioleta

VERO – Células de rim de macaco verde africano

VV – Vírus Vaccinia

VZV – Vírus Varicella-zoster

-WT – Wild Type

XTT – 2,3-bis [2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl] 2H-tetrazolium-carboxanilida

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### FIGURAS:

FIGURA 1 – Cabeça mumificada de Ramses V com pústulas faciais que podem ser decorrentes de infecção por smallpox.....	24
FIGURA 2 – Vítima de varíola.....	26
FIGURA 3 – Mapa do Estado do Rio de Janeiro. Em vermelho, regiões que apresentaram casos de infecção por CTGV em bovinos, no período de 1999-2000.....	32
FIGURA 4 – Mapa do Brasil. Em vermelho, estados que confirmaram ao menos um caso positivo de infecção por vírus semelhante ao vaccinia em mamíferos, de 1970 a 2008.....	35
FIGURA 5 – Microscopia eletrônica: comparativo de distintos vírus e respectivos tamanhos.....	38
FIGURA 6A – Representação esquemática da partícula viral madura.....	40
FIGURA 6B – Representação esquemática da partícula viral com envoltório.....	40
FIGURA 7 – Representação esquemática das etapas da replicação do vírus smallpox.....	43
FIGURA 8 – Vesículas e pústulas com conteúdo purulento em úbere de animal adulto.....	45
FIGURA 9 – Lesões em região do úbere causadas por <i>Orthopoxvirus</i> .....	45
FIGURA 10 – Extensões hemorrágicas em úbere de animal adulto.....	46
FIGURA 11 – Estrutura química do CDV: (S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil)citosina [(S)-HPMPC, HPMPC, Cidofovir, Vistide].....	49

FIGURA 12 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA F9 (Carbetoxi).....	60
FIGURA 13 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA F10 (Carboxiamida).....	60
FIGURA 14 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA F12 (Fenilamina).....	60
FIGURA 15 – Pústulas com conteúdo purulento em úbere de animal adulto.....	68
FIGURA 16 – Lesões em região do úbere causadas por <i>Orthopoxvirus</i> .....	69
FIGURA 17 – Extensões hemorrágicas em úbere de animal adulto.....	69
FIGURA 18 – Lesão na região das fossas nasais provocada por <i>Orthopoxvirus</i> .....	70
FIGURA 19 – Lesão provocada por infecção de <i>Orthopoxvirus</i> localizada na língua de bezerro.....	70
FIGURA 20 – Imagem em 280.000x de magnificação, com equipamento Zeiss modelo EM-900, apresentando a morfologia típica de <i>Orthopoxvirus</i> .....	71
FIGURA 21 – Foto de gel de agarose 1,5% visualizado através de emissão de luz UV em transiluminador. Fragmentos de aproximadamente 1171 pb.....	73
FIGURA 22 – Mapa do Estado do Rio de Janeiro. Em vermelho, regiões que apresentaram casos de infecção por <i>Orthopoxvirus</i> em bovinos, no período de 2006-2008.....	74
FIGURA 23 – Estruturas químicas das substâncias Cidofovir e F9.....	81

## **GRÁFICO:**

GRÁFICO 1 – Resposta dose dependente da substância F9 para CTGV- IOC.....	79
--	----

## **QUADROS:**

QUADRO 1 – Frequência de infecção por <i>Orthopoxvirus</i> em propriedades rurais no Estado do Rio de Janeiro.....	75
QUADRO 2 – Resultados laboratoriais de amostras de bovinos suspeitos de infecção por <i>Orthopoxvirus</i> em regiões do Estado do Rio de Janeiro.....	75
QUADRO 3 – Valores referentes ao método $CC_{50}$ dos derivados oxoquinolínicos e Cidofovir.....	77
QUADRO 4 – Valores referentes ao método $TCID_{50}$ dos derivados oxoquinolínicos.....	78
QUADRO 5 – Valores referentes ao método $EC_{50}$ da substância F9.....	80
QUADRO 6 – Comparativo entre os resultados dos índices obtidos com a substância F9.....	81
QUADRO 7 – Comparativo de valores $EC_{50}$ e SI entre a substância F9 e o Cidofovir.....	82
QUADRO 8 – Quadro comparativo dos derivados oxoquinolínicos para o HIV-1 em PBMCs.....	83

**TABELAS:**

TABELA 1 – Classificação de poxviroses e suas características – vertebrados.....	21
TABELA 2 – Classificação de poxviroses e suas características – invertebrados.....	22

## RESUMO

Vários relatos da literatura indicam a associação da ocorrência de surtos de infecção por poxvirus com a circulação de linhagens de *Orthopoxvirus* semelhantes à vaccinia nas regiões Centro Oeste, Sudeste, Nordeste e Norte do Brasil. Estes episódios podem caracterizar doença zoonótica emergente e merecem atenção especial em relação à vigilância epidemiológica ativa nas regiões, uma vez que do ponto de vista econômico, representam perdas significativas se introduzidos em rebanhos de gado leiteiro. Além disso, considerando-se que não existem tratamentos específicos e vacinas eficazes, torna-se necessária a obtenção de novos medicamentos no combate à esta zoonose. Ao longo dos últimos anos, foram recebidas e estudadas no Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral do Instituto Oswaldo Cruz, cento e cinquenta e duas (152) amostras, dentre soro, líquido vesicular e crostas, provenientes de casos clínicos suspeitos de infecção por vírus semelhante ao vaccinia em bovinos. Registros fotográficos e variados métodos diagnósticos como isolamento viral, microscopia eletrônica, teste de neutralização para a determinação de anticorpos e metodologia molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR), específica para o gene da hemaglutinina (HA), foram realizados. Também foram avaliados três derivados oxoquinolínicos (F9, F10 e F12) através de ensaios de citotoxicidade ( $CC_{50}$ ) e atividade antiviral em culturas de células VERO e células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) utilizando-se, respectivamente, os vírus Cantagalo/IOC (CTGV-IOC) e HIV tipo 1 (HIV-1). A atividade antiviral foi avaliada através dos ensaios de inibição do efeito citopático ( $TCID_{50}$ ) e inibição da produção viral ( $EC_{50}$ ). A inclusão do HIV-1 nas avaliações teve como principal objetivo comparar os resultados obtidos a partir do CTGV-IOC, uma vez que as quinolonas apresentam atividades específicas de acordo com o vírus e o meio celular utilizado. Através dos métodos diagnósticos, observamos positividade de 76,9% das amostras avaliadas no teste de neutralização e 70,9% no teste de PCR. Dentre os derivados oxoquinolínicos testados, a substância F9 foi a menos citotóxica nas duas linhagens celulares e os três compostos apresentaram atividade antiviral para ambos os vírus, CTGV-IOC e HIV-1, sugerindo o seu provável potencial como agentes antivirais. Além disto, nossos resultados evidenciam a dispersão e contínua circulação de vírus semelhante ao vaccinia, em bovinos de diversas propriedades do estado do Rio de Janeiro.

Palavras-chave: PCR, derivados oxoquinolínicos, vírus vaccinia, CTGV-IOC.

## ABSTRACT

Many reports have indicated the relationship between poxvirus infection outbreaks and the circulation of *Orthopoxvirus* strains similar to vaccinia virus in the Central West, Southeast, Northeast and North regions of Brazil. These episodes may characterize an emergent zoonotic disease and deserve special attention related to the active epidemiological survey in these regions, as they represent expressive economic losses if they were introduced in the dairy cattle farms. Besides, considering that there are no specific treatment or efficient vaccines, the development of new medications to combat this zoonose is highly desirable. Throughout the last years, the Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, have received and have studied one hundred fifty-two samples among sera, vesicular fluids, and crusts from bovine clinical cases suspected of vaccinia-like virus infection. Photographic documents and different diagnostic methods such as viral isolation, electron microscopy observation, neutralization test for antibodies determination, and molecular methodology using polymerase chain reaction (PCR) specific for the hemagglutinin gene (HA) were carried out to obtain the results. Also, three oxoquinolinic derivatives (F9, F10, and F12) were evaluated through cytotoxicity assay ( $CC_{50}$ ) and antiviral activity assay using VERO cell culture to Cantagalo/IOC virus (CTGV-IOC) and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) culture to HIV type 1 (HIV-1). The antiviral activity was evaluated through the cytopathic effect inhibition ( $TCID_{50}$ ) and viral production inhibition ( $EC_{50}$ ) assays. HIV was included in our evaluation to compare the results obtained from CTCV-IOC as quinolones present specific activities according to the virus and the cell culture medium used in the assay. According to the diagnostic methods, we observed positive results for 76.9% of the samples analyzed in the neutralization test, and 70.9% in the PCR test. Among the oxoquinolinic derivatives evaluated, the F9 substance was the less cytotoxic for both cell lineages, and the three compounds analyzed presented antiviral activity for both viruses, CTGV-IOC and HIV-1, suggesting their probable potential as antiviral agents. In addition, our results highlight the dispersion and continuous circulation of a vaccinia-like virus in bovines of diverse properties in the state of Rio de Janeiro.

Key words: PCR, oxoquinolinic derivatives, vaccinia virus, CTGV-IOC.

## 1- INTRODUÇÃO

Os poxvirus, família Poxviridae, constituem um antigo e complexo grupo de vírus capazes de afetar muitas espécies animais. Esta família compreende vírus DNA que replicam em hospedeiros vertebrados e invertebrados. Dos oito gêneros hoje conhecidos, quatro infectam o homem: *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Yatapoxvirus* e *Moluscipoxvirus*. O gênero *Orthopoxvirus* inclui vários patógenos de importância humana e/ou veterinária, tais como os vírus da varíola, monkeypox, cowpox, camelpox, vaccinia, dentre outros. Apresentam extensa reatividade sorológica cruzada e hibridização cruzada de DNA genômico (MOSS, 2001).

Os vírus que compõem o gênero *Orthopoxvirus* estão entre os principais microorganismos causadores de doenças no homem gerando, assim, maior interesse em estudos e pesquisas por parte do meio científico.

O diagnóstico clássico das orthopoxviroses inclui o isolamento viral em membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha e em culturas celulares suscetíveis, detecção de partículas virais por microscopia eletrônica utilizando métodos de contrastação negativa e sorológicos (NAGASSE-SUGAHARA *et al.*, 2004). A identificação é realizada pela observação de lesões características produzidas na membrana corioalantóide.

A microscopia eletrônica direta é um método eficiente para a visualização das partículas virais e que demanda períodos relativamente curtos para a prática metodológica. Métodos imunológicos tais como testes de inibição da hemaglutinação, neutralização e imunoenzimáticos também podem ser utilizados, apresentando variações de sensibilidade e especificidade.

Atualmente, técnicas de biologia molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR), análise de fragmentos polimórficos por intermédio de enzimas de restrição (RFLP) e sequenciamento automatizado de genoma viral são métodos referenciados para a identificação e caracterização desses vírus (NAGASSE-SUGAHARA *et al.*, 2004).

O vírus da varíola (smallpox) foi responsável por importantes epidemias no mundo, espalhando-se rapidamente e sem controle (SHCHELKUNOV *et al.*, 2005). Atualmente, uma tarefa considerada difícil é a apreciação dos conceitos da varíola quase 30 anos após a declaração oficial da erradicação deste vírus. Outra situação relevante é a possibilidade de liberação intencional de cepas de vírus da varíola, ainda existentes, através de ações bioterroristas e sua utilização na forma de armas biológicas.

A classificação geral das poxviroses e suas características estão apresentadas nas tabelas 1 e 2 de acordo com Shchelkunov e colaboradores, elaborada em 2005.

Poucas poxviroses apresentam valor clínico significativo ou estão envolvidas em doenças humanas (FENNER *et al.*, 1989). Algumas poxviroses de importância veterinária têm sido estudadas, as quais acometem animais de laboratório, animais de companhia, de produção e de zoológico. Muitos surtos emergentes ocorrem naturalmente e alguns destes vírus, como o monkeypox vírus, podem causar doenças em seres humanos através do contato direto com animais infectados (JESEK *et al.*, 1986; HEYMANN *et al.*, 1998; SHCHELKUNOV *et al.*, 2005).

TABELA 1 – Classificação de poxviroses e suas características – vertebrados

<b>Subfamília – Chordopoxvirinae (vertebrados)</b>		
<b>Gênero</b>	<b>Protótipo</b>	<b>Espécies patogênicas para o homem</b>
<i>Orthopoxvirus</i>	Vírus vaccinia	Cowpox, monkeypox, varíola, vaccinia (e as subespécies, buffalopox e rabbitpox).
<i>Parapoxvirus</i>	Vírus Orf (dermatite pustular contagiosa ou ectima contagioso)	Orf, paravaccinia (pseudocowpox), e vírus da estomatite papular bovina
<i>Avipoxvirus</i>	Vírus fowlpox	Não há descrição
<i>Capripoxvirus</i>	Vírus sheeppox	Não há descrição
<i>Leporipoxvirus</i>	Vírus myxoma	Não há descrição
<i>Suipoxvirus</i>	Vírus swinepox	Não há descrição
<i>Molluscipoxvirus</i>	Vírus do molusco contagioso	Vírus do molusco contagioso.
<i>Yatapoxvirus</i>	Vírus do tumor de macaco de Yaba	Vírus tanapox e vírus do tumor de macaco de Yaba (em um caso de inoculação acidental).

(SHCHELKUNOV *et al.*, 2005)

TABELA 2 – Classificação de poxviroses e suas características – invertebrados

<b>Subfamília – Entomopoxvirinae (invertebrados)</b>	
<b>Gênero</b>	<b>Protótipo</b>
<i>Entomopoxvirus A</i>	Entomopoxvirus <i>Melolontha melolontha</i> (MMEV).
<i>Entomopoxvirus B</i>	Entomopoxvirus <i>Amsacta moorei</i> (AMEV).
<i>Entomopoxvirus C</i>	Entomopoxvirus <i>Chironomus luridus</i> (CLEV).

(SHCHELKUNOV, *et al.*, 2005)

O vírus monkeypox, semelhante à varíola, afeta diversos roedores normalmente nativos de florestas das regiões central e oeste da África, principalmente na República Democrática do Congo, havendo também relatos de acometimento de populações humanas no continente africano (HEYMANN *et al.*, 1998; SHCHELKUNOV *et al.*, 2005). A ausência de vacinação e as condições gerais de saúde deficientes em alguns países, promovendo, por consequência, baixa imunidade em grande parte da população africana, resultaram em notificações de casos de infecção pelo vírus monkeypox em humanos, que apresentaram lesões semelhantes àsquelas provocadas pelo vírus da varíola humana.

As manifestações clínicas e o curso da doença são, também, semelhantes aos causados pela varíola, sendo que o vírus monkeypox apresenta menor eficiência na transmissão direta entre os seres humanos quando comparado ao vírus da varíola (SHCHELKUNOV *et al.*, 2005). Seu poder de penetração em outros continentes também deve ser considerado. Um surto de monkeypox em humanos, nos Estados Unidos, no ano de 2003, foi o primeiro relato fora do continente africano. A doença foi importada para o país

através da comercialização de animais de companhia originados do oeste africano, alertando os serviços de saúde pública mundial (SHCHELKUNOV *et al.*, 2005).

Acredita-se que, atualmente, o vírus cowpox (CPV), causador de lesões vesiculares dolorosas, persiste em determinados animais reservatórios, principalmente roedores nativos de parte da Europa e determinadas regiões da Ásia. Além destes, outros hospedeiros como gado bovino, animais de zoológico e, raramente, felinos de companhia, são infectados e considerados possíveis hospedeiros intermediários, transmissores virais para o homem (BAXBY *et al.*, 1979; CHANTREY *et al.*, 1999; MEYER *et al.*, 1999; SHCHELKUNOV *et al.*, 2005).

O vírus buffalopox (BPV), o qual possui uma história natural pouco elucidada, é uma das subespécies do vírus vaccinia que causa lesões localizadas em búfalos destinados à produção de leite e no gado leiteiro, além de lesões orofaríngeas em humanos através da ingestão de leite não pasteurizado (DUMBELL & RICHARDSON, 1993; KATARIA & SINGH, 1970). Clinicamente, as lesões causadas pelo BPV são similares às vesículas por cowpox, embora menos dolorosas do que os casos mais brandos de lesões vesiculares causadas pelo vírus vaccinia. Surtos de infecção por buffalopox foram, primeiramente, observados durante a época de vacinação contra varíola no Egito, Indonésia e Índia, sendo este último país com notificações mais recentes e em maior quantidade (MATHEW, 1967; KOLHAPURE *et al.*, 1997; SHCHELKUNOV *et al.*, 2005).

O uso de vacinas contendo vírus vivo, em populações não controladas, envolve o risco de recombinações entre poxvirus do tipo selvagem e cepas que

podem ter sido recentemente introduzidas. Embora as recombinações possam ser convenientes para a propagação da vacina, elas podem gerar efeitos deletérios. Para prever o impacto destas campanhas é essencial que a vigilância epidemiológica de poxviroses ocorra naturalmente, conforme tem sido conduzida em locais como no oeste e centro da Europa, observando a vacinação com o vírus vaccinia (VV) e vírus da raiva (BOULANGER *et al.*, 1996; SANDVIK *et al.*, 1998; REGNERY, 2007).

### 1.1 - HISTÓRICO

A varíola foi considerada oficialmente erradicada da população mundial em 1977, através da vacinação utilizando-se o vírus vaccinia. Acredita-se que a varíola tenha surgido a 3.000 anos na Índia ou no Egito, sendo causadora de uma das doenças mais devastadoras da humanidade (SHCHELKUNOV *et al.*, 2005). A figura 1 ilustra um possível caso de infecção por smallpox.



FIGURA 1 - Cabeça mumificada de Ramses V com pústulas faciais que podem ser decorrentes de infecção por smallpox (RUFFER, 1921).

Disponível em <<http://www.resonancepub.com/images/ramses.gif>> data de acesso 23/11/2008.

A varíola é causada por um vírus exclusivamente humano, do qual se desconhecem animais reservatórios e depende do contato direto dos indivíduos infectados ou assintomáticos com os sadios para disseminar e manter-se na população. Além disso, se considerada uma doença ancestral, deveríamos observar os requisitos para que o vírus se tornasse endêmico, tais como o número suficiente de indivíduos suscetíveis e a existência de um contingente elevado dentro da população que oferecesse condições de sustentabilidade do vírus (SHCHELKUNOV *et al.*, 2005). A verdadeira origem deste vírus é desconhecida, mas é evidente que, em adição a uma população densamente crítica, a disseminação a partir de um ponto de origem foi favorecida pela emergência do comércio entre as nações e grupos, além de conflitos armados, facilitando o contato entre as diferentes populações (SHCHELKUNOV *et al.*, 2005).

A origem do vírus vaccinia, que substituiu o vírus cowpox durante as vacinações em massa de humanos contra o vírus smallpox, há aproximadamente 100 anos, é um grande mistério para a ciência moderna. Não está claro, ainda, se o vírus vaccinia é o resultado de uma seleção artificial do vírus da varíola altamente imunogênico (induzindo a produção de anticorpos), porém, com baixa virulência. Amostras derivadas deste vírus têm sido observadas no Brasil desde 1999 (DAMASO *et al.*, 2000; SIMONETTI *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2007). Entretanto, a disponibilidade de uma vacina, contendo vírus vivo, efetiva contra a varíola, envolvendo o vaccinia como seu principal constituinte, a ausência de um reservatório natural e os esforços conjuntos da comunidade médica mundial sob os auspícios da Organização Mundial da Saúde (OMS) permitiram que a varíola, uma doença infecciosa

humana altamente patogênica, fosse erradicada em 1977, sendo a primeira na história da humanidade (SHCHELKUNOV *et al.*, 2005).

Durante séculos, surtos epidêmicos se repetiram através dos continentes, dizimando populações e alterando o curso da história. A doença que não possui tratamento eficaz até hoje, matou cerca de 30% dos infectados, deixando cicatrizes, também denominadas “pockmarks” (marcas decorrentes de pústulas) em 65 a 80% dos sobreviventes. Estas marcas ficavam, em sua maioria, no rosto e podiam causar cegueira (SHCHELKUNOV *et al.*, 2005). Na figura 2 é apresentado um caso de paciente vítima de varíola com lesões vesiculares no rosto.



FIGURA 2 - Vítima de varíola

Disponível em <<http://www.acponline.org/graphics/bioterro/smallpox2.jpg>> data de acesso 25/11/2008.

A demonstração de Edward Jenner, em 1798, que poderia haver proteção contra smallpox, através da inoculação com cowpox ou vírus semelhante, trouxe a primeira oportunidade de um possível controle da doença na população humana.

No início da década de 50, 150 anos após a introdução da vacina, foi estimado que cerca de 50 milhões de casos de infecção pelo vírus da varíola tivessem ocorrido por ano, em todo o mundo. Em 1967, este número reduziu-se a 10 a 15 milhões de casos, devido à vacinação. Neste mesmo ano, quando a Organização Mundial de Saúde elaborou um plano para a erradicação da varíola, a doença ameaçava 60% da população mundial, com registros elevados de casos de óbitos e sequelas graves como cicatrizes e, por vezes, cegueira em sobreviventes e sem um tratamento específico. (<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/smallpox/en/>>).

No Brasil, a erradicação da varíola foi obtida através de vacinações extensas da população, sendo aplicadas cerca de 80 milhões de doses até meados da década de 70, quando a vacinação foi suspensa.

Ao longo do século 20, surgiu uma variante do vírus da varíola na forma benigna, denominado alastrim ou varíola menor, com taxa de letalidade abaixo de 1%. Esta cepa predominou no Brasil a partir de sua identificação, substituindo as amostras mais virulentas e em circulação no país quando a varíola foi definitivamente erradicada. O último caso de varíola no continente americano ocorreu no estado do Rio de Janeiro em abril de 1971 (FENNER *et al.*, 1988).

Através do sucesso da campanha de erradicação global, a varíola foi finalmente controlada, com a ocorrência de um único e último caso natural ocorrendo em Merak na Somália em 1977 (MOYER, 2005). Um caso fatal, adquirido em laboratório, ocorreu no Reino Unido em 1978. A erradicação foi certificada com base em intensa verificação por uma comissão de cientistas eminentes em dezembro de 1979 e, subsequentemente, endossada pela

Assembléia da Organização Mundial de Saúde, em 1980. (<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/smallpox/en/>>). No mesmo ano a OMS recomendou a paralisação da vacinação no mundo, uma vez que a campanha foi acompanhada por diversos casos de efeitos colaterais e complicações em seres humanos. O resultado final foi a obtenção de proteção da maior parte da população mundial, não apenas contra a varíola mas também para outras infecções causadas pelos vírus cowpox e monkeypox (SHCHELKUNOV *et al.*, 2005).

Cepas virais ainda são mantidas em dois laboratórios no mundo, o que levou o “Smallpox Eradication Advisory Group” a concluir que o risco de escape acidental, a partir destes laboratórios, não poderia ser reduzido a zero. Assim, recomendou-se a adoção de medidas de vigilância continuada e a criação de um estoque internacional de vacina contra varíola (FENNER *et al.*, 1988).

Os Encontros do Comitê de *Orthopoxvirus* da Organização Mundial de Saúde, realizados em 1994 e 1999 recomendaram que nenhum outro, além dos dois centros de colaboração da OMS, nos Estados Unidos e da Federação Russa, poderia possuir mais do que 20% da sequência do DNA do vírus da Varíola (<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/smallpox/en/>>).

Existem informações e notificações alertando para a possibilidade de destruição destas cepas no ano de 2011. As mesmas não foram eliminadas devido às características do vírus da varíola e à questão do bioterrorismo, que exigiram mais estudos sobre a patogenia da doença em primatas e o desenvolvimento de novas drogas antivirais.

## 1.2 - POXVÍRUS E CONSIDERAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS

Relatos de possíveis casos de varíola são ainda recebidos pela Organização Mundial de Saúde, 25 anos após a erradicação. Cada relato é epidemiologicamente investigado em campo e através de métodos laboratoriais para o diagnóstico confirmatório em laboratórios de referência da OMS (HEYMANN, 2004).

O uso potencial da varíola ou outras orthopoxviroses, por exemplo, monkeypox, como arma de bioterrorismo, tem estimulado esforços para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da doença e outras infecções por poxvirus (VIGNE, 2009). Até o presente momento, apenas o cidofovir é aprovado para uso em tratamentos emergenciais em casos de surtos de varíola.

No Brasil, as vacinas utilizadas, preparadas em grande parte no Instituto Oswaldo Cruz, no estado do Rio de Janeiro, eram suspensões de vírus vaccinia vivo, contendo aproximadamente 100 milhões de partículas virais em cada mililitro. Como este agente viral era, muito provavelmente, originário de bovinos, várias descrições de infecções de animais a partir de humanos vacinados foram apresentadas em diversos países, inclusive no Brasil (LUM *et al.*, 1967; TOPCIU *et al.*, 1976; MESQUITA & SCHATZMAYR, 1969). O inverso foi igualmente observado, a partir de bovinos com lesões na região do úbere infectando seres humanos em contato direto com estes animais, caracterizando-se, portanto, uma zoonose (SCHATZMAYR *et al.*, 2000).

Nas áreas rurais, as vacinações contra varíola humana utilizaram o sistema de deslocamento de uma propriedade rural para outra. Também foi

utilizada a aparelhagem semiautomática de vacinação, a qual trabalhava com frascos para 50 doses de vacina permitindo, assim, atingir grande número de pessoas em curto espaço de tempo. Técnicas e conhecimentos deficientes em Biossegurança resultavam em cuidados mínimos com os restos de vacina, que ficavam nos frascos nos locais de vacinação, bem como durante o ajuste da aparelhagem contendo produto com alto título infectante. Assim, já ao final do período de vacinações, começaram a surgir dados epidemiológicos indicando que, amostras de vírus, semelhantes às amostras utilizadas nas campanhas estavam circulando na natureza. Um poxvirus, posteriormente identificado como similar ao vaccinia, foi isolado no estado do Pará a partir do sangue de um roedor silvestre na década de 70 (FONSECA *et al.*, 1998) e, em São Paulo, uma amostra semelhante, denominada vírus Cotia, foi obtida de um camundongo sentinela colocado em uma reserva florestal pelo Instituto Adolpho Lutz (LOPES *et al.*, 1965). Este último episódio demonstrou a presença, em artrópodos, de vírus semelhante ao vaccinia no momento das investigações.

Especulações abordam a introdução do vírus Cantagalo (CTGV) na natureza. A campanha de vacinação no Brasil permaneceu até 1973, considerando o relato do último caso em 1972. Uma rotina de vacinação foi sustentada por períodos que antecederam o final da década de 70 (FENNER *et al.*, 1988). É provável que o CTGV tenha permanecido no meio ambiente durante os 20 anos seguintes, estabelecendo ciclos de transmissão eficiente em animais ainda não definidos, os quais transmitiram tal patógeno a bovinos produtores de leite e estes à população rural. Desconhece-se a ocorrência de outros surtos de CTGV e os respectivos períodos anteriores ao ano de 1999.

Não existem relatos ou notificações no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (DAMASO *et al.*, 2000).

Durante a campanha de vacinação contra a varíola era relativamente comum que animais domésticos fossem infectados pelo vírus vaccinia quando em contato com indivíduos recém vacinados (MALTSEVA *et al.*, 1966; LUM *et al.*, 1967; TOPCIU *et al.*, 1976). Em 1964, mais de 400 bovinos produtores de leite e 20 ordenhadores foram infectados em uma fazenda em El Salvador, na América Central, a partir de um funcionário recém vacinado (LUM *et al.*, 1967). Muitos destes casos foram considerados de menor importância com o final das campanhas de vacinação e após a declaração oficial de erradicação da varíola. Assim, não houve mais o registro de relatos e notificações, pois acreditavam que, com a suspensão da vacinação, não haveria mais infecções deste tipo (FENNER *et al.*, 1988).

A partir do ano de 1999 começaram a ser observados casos em humanos e bovinos no Rio de Janeiro, incluindo a região noroeste do estado e o Vale do Paraíba, onde foi identificado o primeiro caso humano (SCHATZMAYR *et al.*, 2000). Uma amostra viral, isolada a partir de um bovino, foi estudada e caracterizada por pesquisadores da Universidade Federal do Rio de Janeiro, observando-se extrema identidade com os vírus vacinal utilizado pelo Instituto Oswaldo Cruz no preparo da vacina contra a varíola, até meados da década de 70. O alinhamento das sequências de bases do CTGV e VV-IOC apresentou 98,2% de identidade e a sequência de aminoácidos 96,7% (DAMASO *et al.*, 2000). Assim, foi atribuída a este vírus, semelhante ao vaccinia, a denominação Cantagalo, referente ao município de mesmo nome,

situado na região noroeste do estado do Rio de Janeiro e indicando a localização do animal utilizado para os estudos.

A figura 3 mostra a localização dos primeiros casos de infecção em bovinos e seres humanos pelo CTGV entre os anos 1999 e 2000, confirmados através da técnica de microscopia eletrônica e métodos moleculares. Na época havia também casos suspeitos em outras propriedades da região noroeste do estado do Rio de Janeiro, como o município de Miracema (DAMASO *et al.*, 2000).

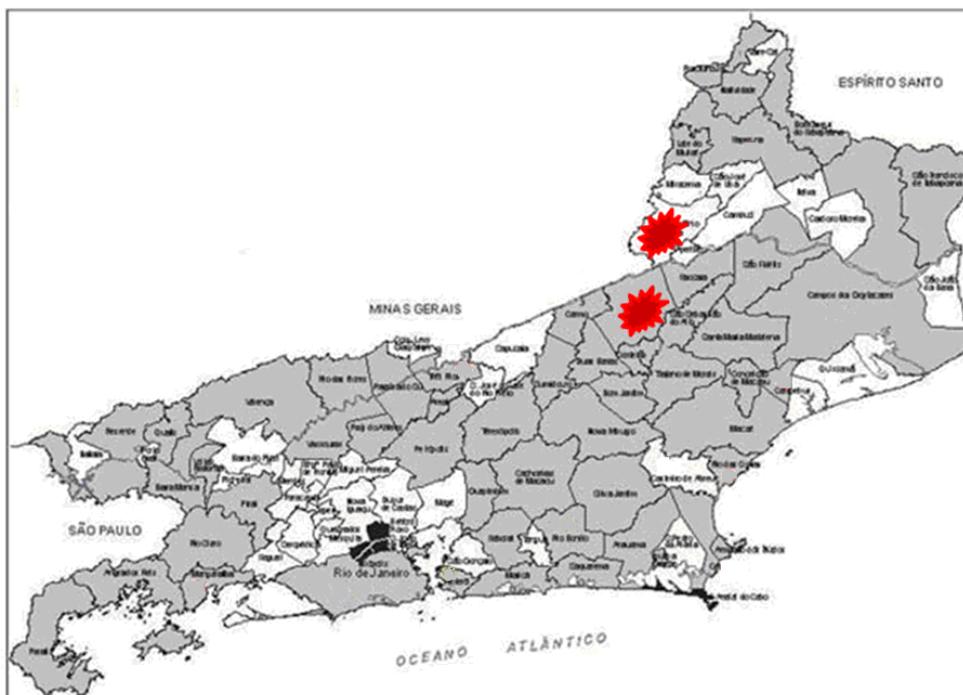


FIGURA 3 - Mapa do Estado do Rio de Janeiro. Em vermelho, regiões que apresentaram casos de infecção por CTGV em bovinos, no período de 1999-2000 (adaptado de DAMASO *et al.*, 2000).

Isolado a partir de amostras de lesões obtidas durante episódios de exantema e afetando o gado leiteiro, o agente viral foi observado, eventualmente, em ordenhadores de diversas fazendas no estado do Rio de Janeiro (DAMASO *et al.*, 2000).

A divulgação dos resultados obtidos, através de técnicas de sequenciamento genômico e análise filogenética, sugerem que o CTGV possa ter derivado da linhagem vacinal (VV-IOC) desenvolvida pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC) e usada para a erradicação da varíola na região por várias décadas, caracterizando assim, uma longa permanência do vírus VV e sua adaptação na natureza (DAMASO *et al.*, 2000). Desta forma foi possível estabelecer, com maior precisão, a relação genética entre o CTGV-IOC e o VV-IOC e outras linhagens. O grupo evoluiu, provavelmente, a partir de amostras ancestrais que infectavam roedores, sendo que estes mamíferos ainda albergam vários gêneros e espécies de poxvirus. A origem do VV-IOC, utilizada pelo Instituto Oswaldo Cruz para produzir a vacina durante a campanha de erradicação da varíola no Brasil (FENNER *et al.*, 1988), permanece desconhecida. Existe a probabilidade de que esta tenha vindo da França, na época em que havia um grande esforço e colaboração mundial para a erradicação da doença (DAMASO *et al.*, 2000).

Em resumo, no Estado do Rio de Janeiro foram notificados, até o momento, casos de infecção por vírus semelhante ao vaccinia em bovinos nas regiões Serrana e Noroeste Fluminense, tais como os municípios de Cambucí e Cantagalo. O primeiro município a ter um caso confirmado foi o de Cantagalo, em 1999. Diversas publicações confirmaram a presença, em bovinos e seres humanos, de vírus semelhante ao vaccinia nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Goiás e Bahia configurando-se uma zoonose em expansão (COSTA *et al.*, 2007; SCHATZMAYR *et al.*, 2005; SCHATZMAYR & COSTA, 2005; SIMONETTI *et al.*, 2007).

No período compreendido entre o mês de outubro de 2001 a janeiro de 2003, o Instituto Adolpho Lutz (São Paulo, Brasil) recebeu amostras de fluidos vesiculares e crostas de pacientes com suspeita clínica de “estomatite vesicular” ou “varíola bovina”. Estes pacientes eram provenientes de regiões rurais do vale do Paraíba, localizado no leste do estado de São Paulo. A maior parte dos casos foi observada em propriedades produtoras de leite onde os infectados apresentaram lesões com aspecto vesículo-pustular nas mãos, braços, antebraços e, alguns, na face (NAGASSE-SUGAHARA *et al.*, 2004).

No ano de 2007, Damaso e colaboradores relataram duas estratégias de identificação do vírus Cantagalo baseadas na amplificação do gene da hemaglutinina (HA) pela reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida pela análise de fragmentos polimórficos por intermédio de enzimas de restrição (RFLP). O protocolo de PCR foi associado à análise de restrição usando a endonuclease *SnaB* I, gerando um único padrão de digestão para os amplicons do CTGV. O perfil de restrição pode identificar 41 isolados de CTGV dentre 43 espécimes clínicos, diferenciando-se dos outros *Orthopoxvirus* e cepas do vírus vaccinia. Alternativamente, utilizaram o ensaio *1-step* PCR com primers (alteração em 18 nucleotídeos) que marcaram especificamente a sequência HA do CTGV. Este protocolo produziu resultados similares mais rapidamente do que a primeira estratégia, eliminando procedimentos pós-PCR. Os resultados obtidos foram confirmados e sustentados pela análise de Western Blot.

O mapa do Brasil, na figura 4, representa as localidades que, desde o ano de 1970 até o ano de 2008, notificaram ao menos um caso de infecção por vírus semelhante ao vaccinia. Esta representação foi elaborada através de publicações, referências e notificações institucionais.

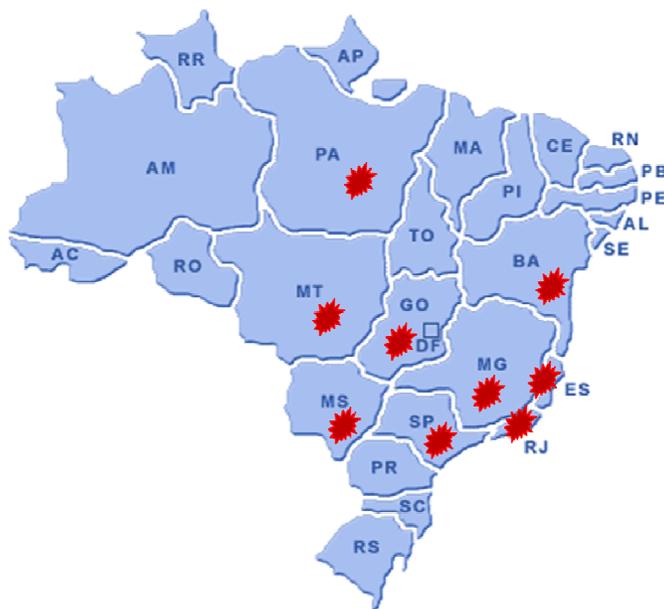


FIGURA 4 - Mapa do Brasil. Em vermelho, estados que confirmaram ao menos um caso positivo de infecção por vírus semelhante ao vaccinia em mamíferos, de 1970 a 2008 (adaptado de FONSECA *et al.*, 1998; FONSECA *et al.*, 1999; DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2003; TRINDADE *et al.*, 2004; NAGASSE-SUGAHARA *et al.*, 2004; SCHATZMAYR *et al.*, 2005; SCHATZMAYR & COSTA, 2005; Hermann Schatzmayr, comunicação pessoal).

A investigação de novos casos deverá ser conduzida buscando estabelecer a origem da infecção, a busca ativa de casos ainda não conhecidos e seu devido tratamento. Também se faz necessária a adoção de medidas de controle e a busca de respostas farmacológicas eficientes, através de testes e metodologias adequadas para posterior aplicação segura.

As orthopoxviroses patogênicas para o homem permanecem como alvo de constantes notificações, seguidas de investigações, estudos e pesquisas por parte dos cientistas de diferentes partes do mundo. Em apoio aos programas de pesquisa, o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (National Institute of Health, NIH - USA), desenvolveu o Centro de Recursos de

Bioinformática Poxvírus (<http://www.poxvirus.org>), oferecendo diversas ferramentas para pesquisadores interessados em estudar as poxviroses, como comparativos genômicos e seus resultados (LEFKOWITZ *et al.*, 2006).

Por ser uma doença emergente, algumas peculiaridades persistem e não estão totalmente esclarecidas. A infecção não foi observada em bovinos machos ou outros animais como suínos e caprinos, sendo dados importantes para o diagnóstico diferencial com outras patologias vesiculares. Apenas bovinos fêmeas apresentaram o desenvolvimento de tal patologia. As lesões normalmente predominam na região do úbere do animal, podendo surgir nas regiões da boca e fossas nasais. Alguns bezerros também desenvolveram a doença, porém, com lesões em maior quantidade na língua e focinho. Esta característica, observada nos animais jovens, confirma o fato do vírus se replicar e desenvolver no local de contato com lesões de animais infectados, onde ocorre a inoculação viral no novo hospedeiro. O mais provável é que o patógeno seja transmitido da mãe para o filho através do contato direto com as lesões do úbere durante a amamentação. Até o momento, não foi identificado o real motivo de tal diferença entre idade, sexo e espécie dos animais, prevalecendo, assim, a necessidade de maiores estudos (SCHATZMAYR *et al.*, 2005; SCHATZMAYR & COSTA, 2005).

A possibilidade de eliminação de partículas virais no leite produzido por bovinos infectados não está esclarecida. Mesmo assim, não é recomendável a ingestão de leite no estado *in natura* sob qualquer hipótese, uma vez que, o BPV, subespécie de *Orthopoxvirus*, promove o aparecimento de lesões orofaríngeas nos humanos através da ingestão de leite não pasteurizado (DUMBELL & RICHARDSON, 1993). Os métodos de tratamento do leite para

comercialização e consumo, através dos processos de pasteurização ou UHT (ultra high temperature), padronizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, podem ser considerados como uma barreira de Biossegurança adicional contra esta possível via de contaminação e disseminação do vírus entre os seres humanos (Hermann Schatzmayr, comunicação pessoal).

Outra observação interessante é o surgimento súbito de casos nas propriedades rurais sem qualquer histórico de contaminação por vírus vaccinia ao redor da região. Ocorrências e notificações da doença foram obtidas, por vezes, em animais isolados, sugerindo a disseminação do vírus através de mamíferos alados. Morcegos hematófagos poderiam servir de hospedeiro intermediário, mesmo não desenvolvendo a doença, mas disseminando-a entre os animais durante os voos noturnos e alimentação. Ainda assim, esta é uma alternativa que necessita de extensas observações, pesquisas e estudos (Hermann Schatzmayr, comunicação pessoal).

### 1.3 - O VÍRUS

Os poxvirus apresentam tamanhos que podem variar de 115 a 360 nanômetros. São os maiores e mais complexos vírus existentes conhecidos no limite de resolução da microscopia óptica (MOSS, 2001). Mais de 50 sequências genômicas completas representando os múltiplos gêneros, espécies e isolados de poxvirus estão disponíveis publicamente (LEFKOWITZ *et al.*, 2006). A figura 5, obtida através de diferentes metodologias de

microscopia eletrônica, apresenta um comparativo entre distintos vírus e seus respectivos tamanhos.

Vírus Influenza: 100nm

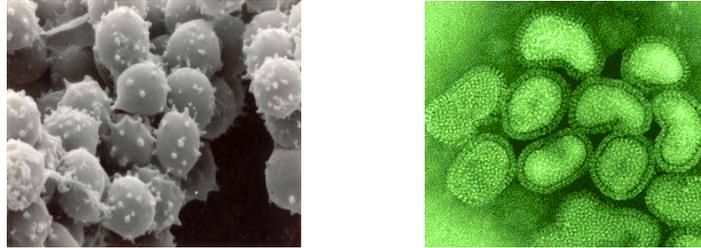
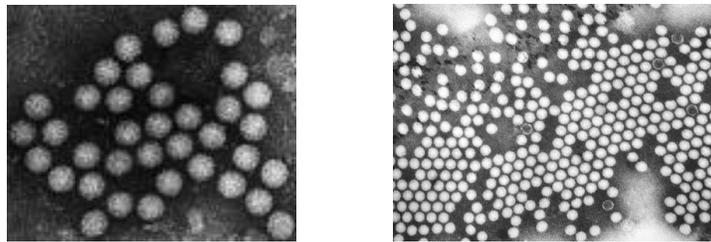


Foto Barth, OM (IOC). Disponível em <<http://www.geocities.com/amirhali/fpclass/virus-influenza.jpg>> e <[http://www.cpsimoes.org/blog/fotos/influenza\\_virus.gif](http://www.cpsimoes.org/blog/fotos/influenza_virus.gif)> data de acesso

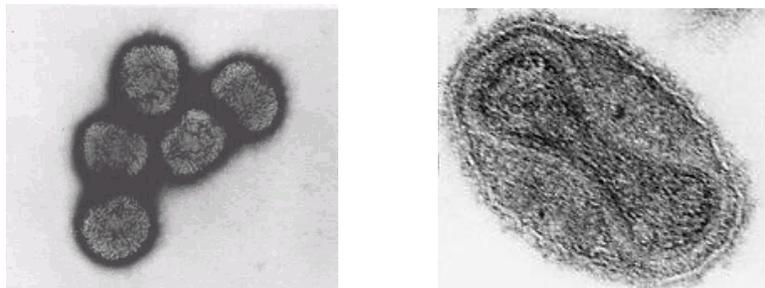
29/11/2008.

Vírus da Poliomielite: 25nm



Disponível em <<http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/Cromovibac/poli4.jpg>> e <<http://bioinfo.bact.wisc.edu/themicrobialworld/Poliovirus.jpg>> data de acesso 29/11/2008.

Vírus da varíola: 260 x 150 nm



Disponível em <<http://bioweb.wku.edu/courses/Biol115/wyatt/Micro/variola.gif>> e <<http://z.about.com/d/dermatology/1/0/h/variolaelec2.jpg>> data de acesso 29/11/2008.

FIGURA 5: Microscopia eletrônica: comparativo de distintos vírus e respectivos tamanhos

Os vírus que compõem a família Poxviridae apresentam um complexo capsídeo simétrico e núcleos contendo ácido nucléico, cercados por múltiplas membranas originando formas estruturais retangulares ou ovais. Duas formas morfológicas são descritas pela metodologia de contraste negativo de microscopia eletrônica, a forma “M” que apresenta superfície áspera ou rugosa, e a forma “C”, com cápsula e superfície lisas (NAGASSE-SUGAHARA *et al.*, 2004). Apresentam moléculas de DNA lineares contendo terminações repetidas invertidas (“Inverted Terminal Repeats” – ITRs) de tamanho variado (<0,1 – 12,4 kb). O mecanismo de como os sítios de DNA repetidos são gerados e mantidos pelas ITRs não são conhecidos (LEFKOWITZ *et al.*, 2006). (LEFKOWITZ *et al.*, 2006). A molécula de DNA de cadeia dupla codifica mais de 200 proteínas diferentes, incluindo proteínas estruturais e um sistema para a transcrição primária dos genes virais (<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/smallpox/en/>>).

Existem duas partículas virais infecciosas distintas: o vírus maduro intracelular (IMV), figura 6A, e o vírus envelopado extracelular (EEV), figura 6B. Quando envelopado, apresenta-se retangular ou ovóide, com comprimento de 220-450nm e largura de 140-260nm. A superfície do envoltório apresenta-se em túbulos ou filamentosa.

O genoma, interno a um complexo nucleoproteico, apresenta diferentes tamanhos, variando entre 130 a 375 kbp, dependente da espécie viral. É covalentemente fechado nas suas terminações formando telômeros “hairpin-like”. A maior parte das regiões terminais do genoma contém diversas bases helicoidais resultando em duas isoformas e as duas sequências de DNA são

covalentemente unidas para a produção da terminação “harpin” (LEFKOWITZ *et al.*, 2006).

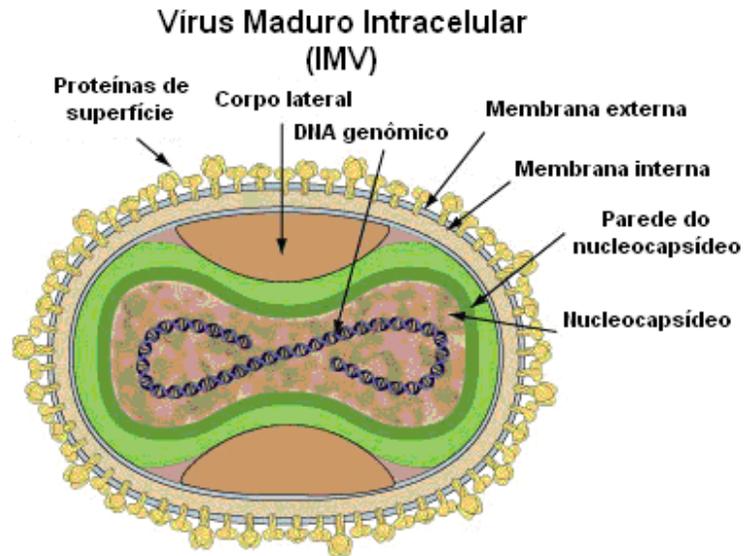


FIGURA 6A: Representação esquemática da partícula viral madura - Swiss Institute of Bioinformatics © 2008. Disponível em <<http://www.poxvirus.org>> data de acesso 30/11/2008.

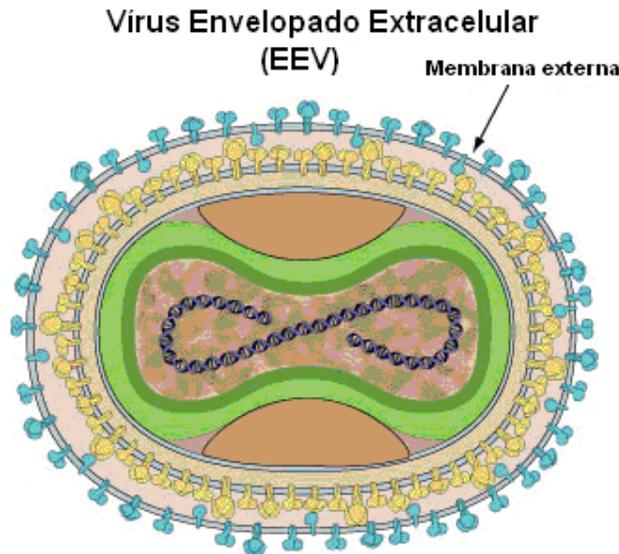


FIGURA 6B: Representação esquemática da partícula viral com envoltório - Swiss Institute of Bioinformatics © 2008. Disponível em <<http://www.poxvirus.org>> data de acesso 30/11/2008.

Muitos dos genes terminais codificam proteínas que atuam na resposta antiviral do hospedeiro, processos de apoptose, apresentação e reconhecimento do antígeno, funcionalidade de interferon e processos de

sinalização imune sendo, assim, denominados genes de virulência (LEFKOWITZ *et al.*, 2006).

O gene da hemaglutinina (HA) codifica para uma glicoproteína que pode ser detectada na membrana plasmática da célula infectada e no tegumento que recobre a membrana externa de virions envelopados extracelulares. A glicoproteína é sintetizada na fase tardia da infecção pelos *Orthopoxvirus* e nenhum outro gênero de poxvirus codifica tal gene, o qual pode ser indiretamente evidenciado pela presença de anticorpos contra a proteína hemaglutinina (NAKANO e ESPOSITO, 1989). É, também, detectável por métodos de hemadsorção e hemaglutinação com eritrócitos de galinha apropriadamente selecionados para estes testes. A identificação do gene da hemaglutinina é um bom indicador de infecção por *Orthopoxvirus*. Devido ao gene da HA apresentar diferenças nas sequências de nucleotídeos entre as espécies deste gênero, são necessários sequenciamento e análise filogenética para diferenciação das orthopoxviroses. A inibição da hemaglutinação e da hemadsorção, com soros de pacientes, também são bons indicadores para a constatação de infecções por *Orthopoxvirus* (DAMASO *et al.*, 2000).

#### 1.4 - CICLO REPLICATIVO

A progressão do ciclo de replicação viral ocorre totalmente no citoplasma celular e é controlada, em grande parte, por fatores codificados pelo vírus, o que confere um caráter quase autônomo de replicação em relação à célula hospedeira. A replicação segue algumas etapas, descritas a seguir e ilustradas na figura 7:

1) Ligação aos receptores celulares e penetração - não se sabe ao certo o mecanismo pelo qual ocorre este processo e existe, provavelmente, uma variação de receptores adequados e diferentes vias de penetração do vírus na célula. De acordo com o Centro de Pesquisa em Bioinformática de Poxvirus, as partículas virais se ligam aos glicosaminoglicanos (GAGs) na superfície das células-alvo ou por componentes da matriz extracelular, desencadeando a fusão de membrana e liberando o nucleocapsídeo viral no citoplasma celular (SHCHELKUNOV *et al.*, 2005, <<http://www.poxvirus.org>>).

2) Fase precoce – genes iniciais ou precoces são transcritos no citoplasma pela enzima viral RNA polimerase. A expressão precoce se inicia 30 minutos após a infecção (SHCHELKUNOV *et al.*, 2005, <<http://www.poxvirus.org>>).

3) Descapsidação – o núcleo viral sofre um processo de descapsidação ao final da expressão dos genes precoces, fazendo com que haja liberação das proteínas, enzimas e sequências do DNA viral no citoplasma da célula (SHCHELKUNOV *et al.*, 2005, <<http://www.poxvirus.org>>).

4) Fase intermediária – genes intermediários são expressos, desencadeando a replicação de DNA genômico em aproximadamente 100 minutos após a infecção. Este processo forma grandes concatâmeros os quais são clivados para formar o genoma do vírus (SHCHELKUNOV *et al.*, 2005, <<http://www.poxvirus.org>>).

5) Fase tardia – caracteriza-se pela expressão de genes tardios, 140 minutos a 48 horas após o início da infecção, produzindo todas as estruturas protéicas (SHCHELKUNOV *et al.*, 2005, <<http://www.poxvirus.org>>).

6) Montagem e liberação da partícula viral – diversos processos complexos ocorrem pela via presente no citoesqueleto seguidos de liberação ou mesmo por transferência para células adjacentes. Enzimas topoisomerase tipo I estão envolvidas no processo de formação da partícula viral para o enovelamento do DNA e liberação do vírus. A reunião da progênie de virions inicia-se, provavelmente, em associação com membranas internas de células infectadas, produzindo uma partícula esférica imatura. Esta partícula viral transforma-se no virion maduro intracelular em formato retangular (IMV) (SHCHELKUNOV *et al.*, 2005, <<http://www.poxvirus.org>>).

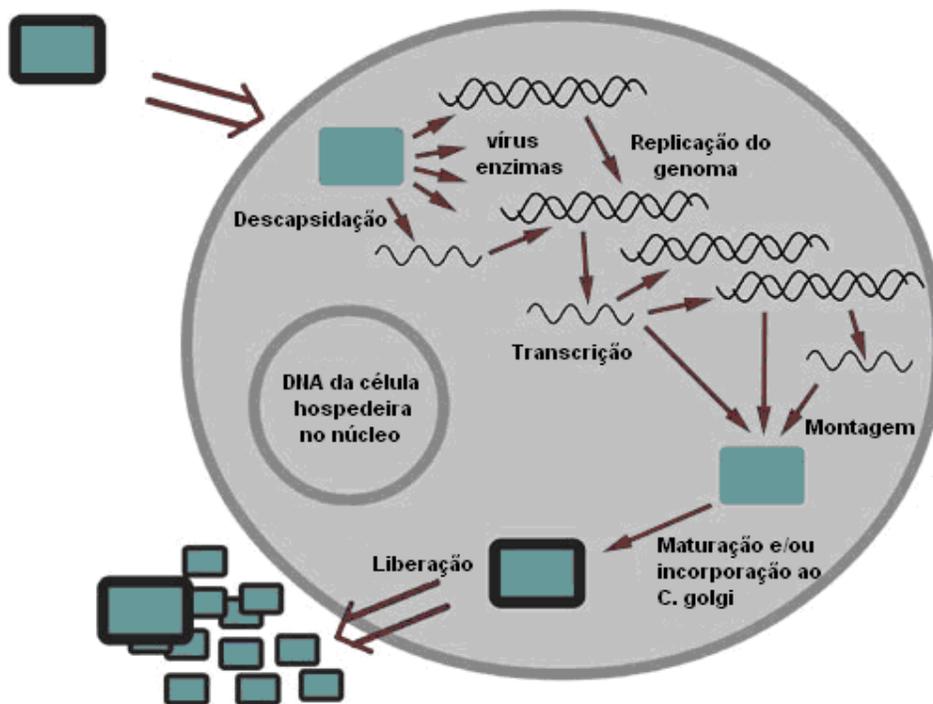


FIGURA 7 – Representação esquemática das etapas da replicação do vírus smallpox.

Disponível em <[www.chem.ox.ac.uk/smallpox/science.html](http://www.chem.ox.ac.uk/smallpox/science.html)> data de acesso 07/07/2008.

O virion IMV pode ser liberado através da lise da célula ou adquirir uma segunda membrana a partir do trans-Golgi, sendo liberado como virion envelopado externo (EEV) (SHCHELKUNOV *et al.*, 2005).

## 1.5 - ASPECTOS GERAIS SOBRE SINAIS E SINTOMAS CLÍNICOS

O vírus vaccinia (VV), membro do gênero *Orthopoxvirus*, permanece com sua origem obscura e é alvo de discussões (BAXBY, 1977 e SHCHELKUNOV *et al.*, 2005). De forma semelhante ao vírus cowpox, a infecção pelo VV pode causar lesões no local de contato ou inoculação. Algumas cepas do vírus vaccinia usadas para a produção da vacina contra a varíola causam efeitos colaterais, tais como encefalite generalizada ou progressiva (MOSS, 2001), miocardite, pericardite, isquemia e vaccinia generalizada (CASEY, 2006).

Uma das principais características virais é a capacidade de promover a passagem transplacentária, sendo a imunidade celular o principal fator de controle da replicação viral e evolução da infecção no organismo.

As lesões causadas por *Orthopoxvirus* apresentam-se nas formas proliferativas, ulceradas ou em crostas. Quando as partículas virais atingem a derme, observa-se o desenvolvimento de eritema cutâneo característico, que se inicia com o aparecimento de pápulas, as quais evoluem para vesículas, pústulas e crostas que terminam por cicatrizar (DAMASO *et al.*, 2000; SCHATZMAYR *et al.*, 2005; SCHATZMAYR & COSTA, 2005; SIMONETTI *et al.*, 2007).

O quadro clínico nos animais caracteriza-se pela presença de infecção típica por *Orthopoxvirus* (SCHATZMAYR *et al.*, 2005; SCHATZMAYR & COSTA, 2005; SIMONETTI *et al.*, 2007). O processo infeccioso se inicia pela formação de vesículas no úbere de bovinos com aproximadamente dois centímetros de diâmetro (figura 8).



FIGURA 8 – Vesículas e pústulas com conteúdo purulento em úbere de animal adulto. Disponível em <<http://www.scielo.br/img/revistas/abmvz/v57n4/26061f1.jpg>> data de acesso 09/11/2008.

Estas vesículas evoluem para a forma de pústulas com conteúdo purulento e, posteriormente, para crostas (SCHATZMAYR *et al.*, 2005; SCHATZMAYR & COSTA, 2005) (figura 9).



FIGURA 9 - Lesões em região do úbere causadas por *Orthopoxvirus*. Disponível em <<http://www.scielo.br/img/revistas/rsbmt/v41n5/a15fig03.jpg>> data de acesso 10/11/2008.

A manipulação continuada da ordenha dos animais em produção pode causar a liberação das crostas, formando extensões hemorrágicas com certa facilidade (SCHATZMAYR *et al.*, 2005; SCHATZMAYR & COSTA, 2005) (figura 10).



FIGURA 10 - Extensões hemorrágicas em úbere de animal adulto.

Disponível em <<http://rehagronoticia.w3erp.com.br/w3dados/imgs/pub/00567.jpg>> data de acesso 15/10/2008.

O quadro clínico do animal evolui por cerca de três semanas e, além de ocorrer a interrupção da produção de leite, surgem mastites podendo evoluir para a perda definitiva de parte do úbere. Esta consequência gera, por vezes, impacto econômico significativo, em especial em pequenas propriedades ou produtores de comercialização restrita (SCHATZMAYR *et al.*, 2005; SIMONETTI *et al.*, 2007).

A sintomatologia clínica restringe-se a bovinos fêmeas adultas em produção e bezerros, nos quais se tem observado lesões vesiculares ao redor

das narinas, boca e língua, sendo esta última em menor número (SCHATZMAYR *et al.*, 2005; SCHATZMAYR & COSTA, 2005).

A infecção não foi observada em bovinos machos ou outros animais como suínos, sendo este um dado importante no diagnóstico diferencial com outras patologias vesiculares (SCHATZMAYR *et al.*, 2005; SCHATZMAYR & COSTA, 2005).

Em seres humanos, a evolução clínica ocorre igualmente em três semanas, com a formação e evolução de vesículas a crostas e lesões distribuídas nas mãos principalmente, braços e face, sendo esta última na forma mais rara. Além das lesões, o quadro clínico pode variar, apresentando febre, por vezes elevada, astenia rigorosa, reação ganglionar subaxilar intensa, dor nas regiões lesionadas, prostração, sudorese, calafrios e quadros de incapacidade temporária. Em pacientes imunodeficientes, a sintomatologia pode evoluir por um período maior, uma vez que a imunidade celular é de extrema importância para o controle da enfermidade causada por poxvirus. Os enfermos, geralmente ordenhadores, normalmente apresentam histórico de contato direto com lesões de animais infectados (SCHATZMAYR *et al.*, 2005; SCHATZMAYR & COSTA, 2005).

Uma vez que a vacinação contra a varíola foi suspensa no Brasil há pouco mais de 30 anos, a presença destas infecções, em bovinos e seres humanos, indica que amostras virais, derivadas do vírus da vaccinia, estão em circulação na natureza, em reservatórios ainda não definidos. Um dos hospedeiros considerados são os roedores silvestres, visto que o grupo pox é capaz de adaptar-se facilmente a estes animais, como é o caso do cowpox no continente europeu. De acordo com determinados estudos, no Brasil as

notificações clínicas têm acontecido nas estações de seca, a partir do mês de maio até novembro, especulando-se que nesta época roedores portadores de vírus se aproximem dos animais em busca de alimento. São necessários, no entanto, mais estudos a respeito do assunto e de outros mecanismos, como a possibilidade de circulação de vírus em mosquitos, considerada igualmente importante (SCHATZMAYR *et al.*, 2005; SCHATZMAYR & COSTA, 2005).

## 1.6 - SUBSTÂNCIAS ANTIVIRAIS

### 1.6.1 - Cidofovir (CDV)

O Cidofovir [(S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil) citosina, HPMPIC], (CDV), com sua estrutura química apresentada na figura 11, teve suas propriedades antivirais designadas e mencionadas pela primeira vez no ano de 1986. Um ano depois um protótipo desta classe de compostos denominado nucleosídeo acíclico fosfonado (S)-HPMPA [(S) - 9 - (3 - hidroxi - 2 - fosfonilmetoxipropil) adenina] foi descrito como um agente anti-polimerase viral de amplo espectro, com atividade contra o vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2), vírus varicella-zoster (VZV), variantes de HSV-1 e VZV deficientes em timidina quinase, citomegalovírus humano (CMV), vírus da febre de suínos africanos, vírus vaccinia (VV) e adenovírus humano (DE CLERCQ *et al.*, 1986). Porém, só foi licenciado, como Cidofovir, no ano de 1996 para tratamento clínico de retinite causada por citomegalovírus (CMV) em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Este fármaco, comercialmente denominado e registrado como Vistide, apresenta,

virtualmente, amplo espectro de ação contra todos os vírus DNA, incluindo, herpesvírus, adenovírus, poliomavírus, papilomavírus e poxvírus. Os poxvirus vaccinia, varíola, cowpox, monkeypox, camellpox, vírus do molusco contagioso e Orf têm apresentado sensibilidade aos efeitos inibitórios do cidofovir. *In vivo*, o cidofovir tem demonstrado elevada eficiência, mesmo após administração de doses únicas sistêmicas (via intraperitoneal) ou intranasal (aerolizadas), protegendo camundongos de laboratório de infecção respiratória letal causada tanto pelo vírus vaccinia como por cowpox (DE CLERCQ *et al.*, 1986, 1987; SAFRIN *et al.*, 1997; DE CLERCQ, 2001; HUGGINS *et al.*, 2002; KERN *et al.*, 2002; DE CLERCQ, 2002).

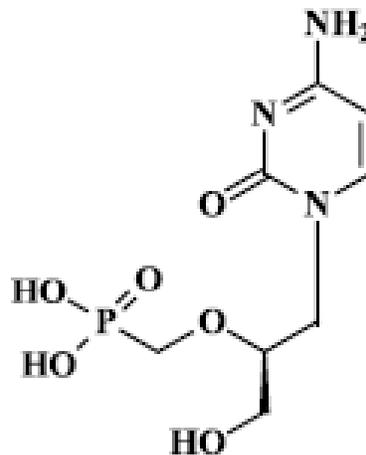


FIGURA 11 - Estrutura química do CDV: (S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil) citosina [(S)-HPMPC, HPMPC, Cidofovir, Vistide] (DE CLERCQ, 2002).

Resultados satisfatórios no tratamento de infecção pelo vírus vaccinia, em casos graves de imunodeficiência em camundongos de experimentação, já foram relatados. Em humanos, alguns relatos mencionam que tal fármaco, administrado pelas vias tópica ou intravenosa, apresentou resultado satisfatório no tratamento de infecção persistente pelo vírus do molusco contagioso ou

vírus Orf em pacientes imunocomprometidos (DE CLERCQ *et al.*, 1989; NEYTS & DE CLERCQ, 1993; BRAY *et al.*, 2000, 2002; SMEE *et al.*, 2000, 2001, 2002). Estes resultados indicam que o cidofovir poderá ser efetivo na terapia e profilaxia a curto prazo de infecções causadas por poxvírus em seres humanos (DE CLERCQ, 2002). Assim, a atividade do CDV contra orthopoxviroses é de particular interesse para as comunidades científicas de pesquisa em saúde.

Com a denominação comercial Vistide<sup>®</sup>, este medicamento apresenta-se em frascos de 75mg/mL concentrado para solução de perfusão. Cada frasco para soluções injetáveis contém o equivalente a 375mg/5mL (75mg/mL) de cidofovir anidro e pH ajustado para 7,4. Por ser a droga de eleição para as orthopoxviroses, além de se apresentar na forma líquida e ter um pH ideal para cultura de células, o cidofovir é, atualmente, o fármaco de maior interesse para avaliações de ação diante dos *Orthopoxvirus* (© Gilead Sciences, Inc., 2000).

Porém, apesar de o CDV ser um inibidor altamente eficaz na replicação de *Orthopoxvirus* em cultura de células de tecido, e altamente eficaz na prevenção da mortalidade de camundongos infectados pelos vírus vaccinia ou cowpox quando administrado via parenteral, este fármaco apresenta baixa absorção no organismo humano quando administrado por via oral (CUNDY *et al.*, 1996ab). Assim, a sua biodisponibilidade oral é a maior limitação para a utilização desta droga, em larga escala, em situações emergenciais como um surto por smallpox. Alguns efeitos colaterais também são notados como o aumento dos níveis séricos de creatinina e a possibilidade de desenvolvimento de lesões renais (DE CLERCQ, 2002). Além disso, o mecanismo exato de ação do cidofovir contra o VV ou qualquer outro poxvirus não foi determinado. Muito

do que se conhece segue o modelo de atuação deste fármaco contra o CMV, cujo alvo molecular é a síntese de DNA viral (DE CLERCQ, 2002). Com isso, a necessidade de estudos mais aprofundados se faz presente, juntamente com a pesquisa de novos compostos farmacológicos eficientes em terapias antivirais.

#### 1.6.2 - Derivados Oxoquinolínicos

Diversos autores relataram as propriedades de derivados oxoquinolínicos para um grande número de microorganismos, incluindo vírus, tais como Herpesvirus, Coronavírus e vírus da Hepatite C. De maneira importante, já foi mostrado que a presença de um radical cloreto, na estrutura química de derivados quinolínicos, geralmente melhora sua atividade antiviral (RICHTER *et al.*, 2004; LUCERO *et al.*, 2006; STEVENS *et al.*, 2007; TORRES *et al.*, 2008). Existem, atualmente, diversos trabalhos científicos que visam a obtenção de novos compostos quinolínicos com potencial atividade antiviral, além do relato de pesquisas relacionadas à síntese de quinolonas contendo substituintes triazólicos (RICHTER *et al.*, 2004; LUCERO *et al.*, 2006; STEVENS *et al.*, 2007; TORRES *et al.*, 2008).

O grupo do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense, coordenado pela professora Maria Cecília de Souza (MATTA *et al.*, 1999), é responsável pela síntese de derivados oxoquinolínicos, e nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo, desde 1995, estudos de atividade antiviral utilizando estas substâncias.

Os derivados quinolínicos constituem a única classe de drogas que pode contribuir para o controle de reservatórios do vírus da imunodeficiência humana

tipo 1 (HIV-1) em estado latente. O primeiro relato importante para as quinolonas como classe de drogas baseou-se em seu espectro antibacteriano, inibindo a topoisomerase tipo II procariótica, denominada DNA girase e, em alguns casos, topoisomerase IV. Em adição às propriedades antibacterianas, as quinolonas têm demonstrado inibir a replicação *in vitro* do HIV-1 tanto em infecções agudas como crônicas em linhagens celulares, interferindo na transcrição mediada pela proteína Tat (transativador de transcrição - transactivator of transcription) (STEVENS *et al.*, 2007). Tat é uma das seis proteínas regulatórias essenciais para a replicação do HIV; assim a inibição da função Tat é um alvo considerado nas terapias antivirais (RICHTER *et al.*, 2004).

Além das atividades inibitórias na replicação do HIV-1, os derivados quinolínicos apresentam atividades que interferem em determinados mecanismos de replicação do citomegalovírus humano, vírus varicella-zoster e vírus do herpes simplex tipos 1 e 2 (HSV-1 e 2), permanecendo desconhecido o sistema de inibição do HSV humano (STEVENS *et al.*, 2007). Diversos estudos complementares para outras classes virais também são necessários, uma vez que as características farmacológicas e estruturais destes derivados têm demonstrado efeitos antivirais consideráveis.

Neste trabalho, além de implantarmos a técnica de PCR para o diagnóstico de infecções por poxvirus, estudamos os efeitos dos derivados oxoquinolínicos na replicação do CTGV-IOC e HIV-1, em caráter comparativo. Considerando a ausência de vacinas e a carência de substâncias antivirais eficientes, o estudo envolvendo novos compostos é de suma importância para o melhor e maior entendimento do mecanismo de ação dos poxvirus.

## 2 - OBJETIVOS

### 2.1 - OBJETIVO GERAL

Implantar a técnica de PCR para o diagnóstico de infecções por poxvirus em bovinos procedentes de propriedades localizadas no Estado do Rio de Janeiro, onde existem casos suspeitos de infecção pelos vírus vaccinia e suas variantes. É nosso objetivo, também, estudar a atividade antiviral e citotóxica dos derivados oxoquinolínicos na replicação *in vitro* dos vírus Cantagalo-IOC e HIV-1.

### 2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as lesões em bovinos suspeitos de infecção por *Orthopoxvirus* em diferentes propriedades no Estado do Rio de Janeiro.
- Amplificar o gene da hemaglutinina (HA), específico para o gênero *Orthopoxvirus* dentre as poxviroses, utilizando a metodologia de reação em cadeia da polimerase.
- Avaliar a atividade citotóxica em células VERO e PBMCs pelo método MTT dos derivados oxoquinolínicos, denominados F9, F10 e F12.
- Avaliar a atividade antiviral dos derivados oxoquinolínicos para CTGV-IOC e HIV-1

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 – ESTUDO DA PRESENÇA DE *ORTHOPOXVIRUS* NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

##### 3.1.1 – Amostras clínicas e desenho de estudo

Trata-se de um estudo transversal, com demanda espontânea. As amostras clínicas, utilizadas no desenvolvimento deste trabalho, foram procedentes de propriedades particulares com suspeita de infecções por vírus semelhante ao vaccinia (VV) em bovinos ou em localidades onde os trabalhadores rurais apresentavam sintomatologia clínica característica de infecção por poxvirus, no Estado do Rio de Janeiro. Bovinos apresentando lesões características de infecção por *Orthopoxvirus* foram fotografados em diferentes estágios da doença (COSTA *et al.*, 2007).

A população de estudo foi composta por animais oriundos dos municípios de Cantagalo, Cordeiro, Aperibé, Santo Antonio de Pádua, Cambuci, Miracema, Valença, Barra do Piraí, Campos dos Goytacazes, Rio das Flores, Piraí, Rio Claro, Resende e região do Vale do Rio Paraíba, todos localizados no Estado do Rio de Janeiro. As coletas do material clínico foram realizadas mediante apresentação prévia de todas as autorizações necessárias.

Cento e cinquenta e duas amostras (152) foram obtidas de bovinos que apresentavam sintomatologia suspeita, pertencentes ou próximos a áreas de ocorrência de surtos de infecção por poxvirus. Um total de 135 amostras de

soro, 35 de crosta e 4 amostras de líquido vesicular foram coletadas e encaminhadas ao Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz e armazenadas em cilindros de nitrogênio líquido ou freezer a -70°C até a manipulação para a realização das análises utilizando as metodologias laboratoriais propostas.

As coletas seguiram todos os procedimentos de Biossegurança necessários e sob todas as regras de ética para a manipulação animal, com o objetivo de reduzir ao máximo o risco de contaminação e o sofrimento dos animais.

### 3.1.2 – Análise laboratorial

#### *3.1.2.1 - Cultura de células VERO*

Culturas de células oriundas de rim de macaco verde africano (VERO) foram mantidas em garrafas de 10 mL, próprias para crescimento e manutenção celular. Essas foram utilizadas nas avaliações de citotoxicidade e efeito antiviral dos derivados oxoquinolínicos na presença do vírus Cantagalo do Instituto Oswaldo Cruz (CTGV-IOC). O meio de cultura celular (Eagle Earle) acrescido de soro fetal bovino a 10%, L-glutamina a 2%, penicilina e estreptomicina a 1,5%, bicarbonato de sódio 7,5% e pH de 7,3 foi utilizado para o crescimento e manutenção das células. O ambiente adequado para o desenvolvimento celular foi mantido a 37°C e com 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.1.2.2 - Metodologia molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR) específica para o gene da hemaglutinina (HA)

A reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) é um método de amplificação numérico-quantitativa para a produção de múltiplas cópias de fragmentos de ácido desoxirribonucléico (DNA) sem o uso de organismo vivo (MULLIS, 1990). A PCR é uma das técnicas moleculares mais comuns utilizadas em laboratórios de pesquisas médicas e biológicas para diversas investigações, tais como o sequenciamento de genes e diagnóstico de doenças hereditárias, investigação de vínculo genético, medicina forense, detecção e auxílio ao diagnóstico de doenças infecciosas, genética molecular e desenvolvimento de organismos transgênicos.

A utilização da PCR para a investigação de vírus semelhante ao vaccinia, foi direcionada para a detecção do gene da hemaglutinina no genoma do CTGV, através dos métodos descritos por Ropp e colaboradores (1995), os quais identificaram e diferenciaram as orthopoxvíruses.

Trinta e uma amostras, dentre crostas e líquidos vesiculares, obtidas de bovinos que apresentavam sintomatologia suspeita, pertencentes ou próximos a áreas de ocorrência de surtos de infecção por poxvirus no estado do Rio de Janeiro, foram submetidas ao protocolo de avaliação molecular. Foram utilizados os seguintes controles positivos: vírus Cantagalo IOC – CTGV IOC, vírus Cantagalo UFRJ – CTGV UFRJ e o vírus Vaccinia Wyeth (VV Wyeth – vacina americana). O controle negativo foi utilizado conforme descrito no protocolo do QIAGEN mini kit.

Os tecidos de origem animal (crostas) foram previamente macerados em meio de manutenção celular (Eagle Earle) para o início do protocolo de extração de DNA viral. Todas as amostras foram aliqüotadas em volume de 200 µL sendo submetidas ao protocolo de extração, utilizando-se conjunto laboratorial comercial (QIAGEN *mini kit*), envolvendo lavagens com soluções tampão, centrifugações, incubações e filtrações em colunas específicas.

A metodologia de amplificação foi realizada através do uso do conjunto laboratorial comercial PCR MIX, PROMEGA, contendo: PCR MIX, *primers*, DNA *template* e H<sub>2</sub>O *nuclease free*. Os *primers* utilizados (HAOUTF: 5`- CCA TTG GAA AAA ACA CAG TAC - 3` e HAOUTR: 5`- CCA AAT ATA TTC CCA TAG TC - 3`) foram aplicados para a amplificação do segmento de 1171 pares de base (pb) do gene da hemaglutinina (HA), uma vez que o gênero *Orthopoxvirus* é o único que apresenta este gene na família dos Poxvírus. As condições de otimização da reação, em cicladores térmicos, foram: um ciclo de 95°C por 3 minutos e 4°C por 10 minutos; 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos e um ciclo de 72°C por 7 minutos, permanecendo a 4°C até a execução da etapa de revelação.

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% e a revelação e obtenção dos resultados foram feitas após tratamento do gel de agarose com solução de brometo de etídio e observação através de um transiluminador com luz ultravioleta (UV).

## 3.2 – ATIVIDADE ANTIVIRAL E CITOTÓXICA DE ANTIVIRAIS

### 3.2.1 - Vírus Cantagalo – Instituto Oswaldo Cruz (CTGV-IOC)

A cepa de vírus Cantagalo utilizada na realização dos experimentos foi obtida a partir do isolamento viral de uma amostra clínica de bovino infectado e coletada no município de mesmo nome, no ano de 1999, no estado do Rio de Janeiro. As amostras coletadas a partir de lesões de pele dos animais foram tratadas em meio de cultura Eagle Earle com adição de antibiótico (penicilina e estreptomicina a 1,5%). O material foi adicionado à cultura de células da linhagem VERO, suscetíveis a poxvirus. O inoculado celular desenvolveu efeitos citopáticos semelhantes aos observados em infecções pelo vírus vaccinia. A presença do vírus foi confirmada através de visualização por microscopia eletrônica e técnicas de biologia molecular, reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento genômico. Os resultados obtidos foram comparados aos apresentados por Damaso em 1999 (Hermann Schatzmayr, comunicação pessoal).

Alíquotas do vírus Cantagalo foram armazenadas, em ambiente adequado a -70°C, no Departamento de Virologia da Fundação Oswaldo Cruz. Esta suspensão de vírus apresentou titulação igual a  $1 \times 10^7$  pfu/mL (unidades formadoras de placas) e foi utilizada de acordo com a necessidade de realização dos experimentos descritos.

### 3.2.2 - Vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1)

Utilizamos o isolado viral Ba-L, com tropismo para monócitos e macrófagos (ou seja, trópico para receptores CCR5), doado pelo Dr. Michel A. Norcross, CBER/FDA, MD, USA. O isolado viral foi mantido em alíquotas preservadas a -70 °C, até o momento de uso.

### 3.2.3 – Substâncias antivirais

Produtos sintetizados no Departamento de Química Orgânica, do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense, foram utilizados para as avaliações propostas. Três substâncias distintas, com bases heterocíclicas nitrogenadas, análogas à purina, com o radical cloro (Cl) na posição C3, foram utilizadas. A solução estoque contendo estes compostos continha 100% de dimetilsulfóxido (DMSO) em concentração final igual a 50 mM.

Estas substâncias se diferenciavam de acordo com a substituição de determinado radical na posição C3 do anel purínico. A droga F9 (6-cloro-3-carboxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolina), ilustrada na figura 12 (código QpCl), apresentava o radical éster, a droga F10 (6-cloro-3-carboxiamida-4-oxo-1,4-dihidroquinolina), na figura 13 (código QpCINH<sub>2</sub>), apresentava o radical amida e a droga F12 (6-cloro-3-fenilamina-4-oxo-1,4-dihidroquinolina), na figura 14 (código QpCINHBz), o radical fenil amina.

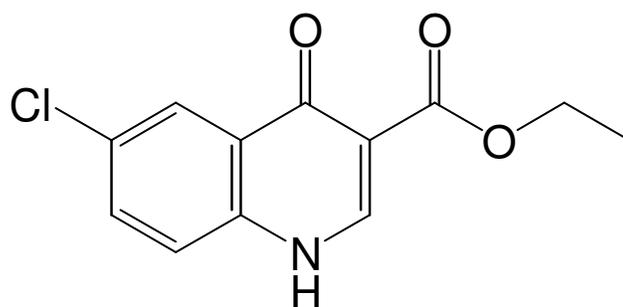


FIGURA 12 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA F9 (Carbetoxi)

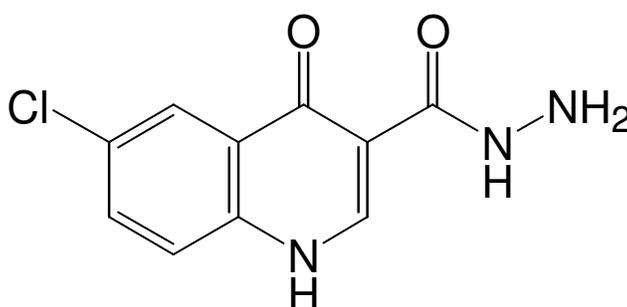


FIGURA 13 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA F10 (Carboxiamida)

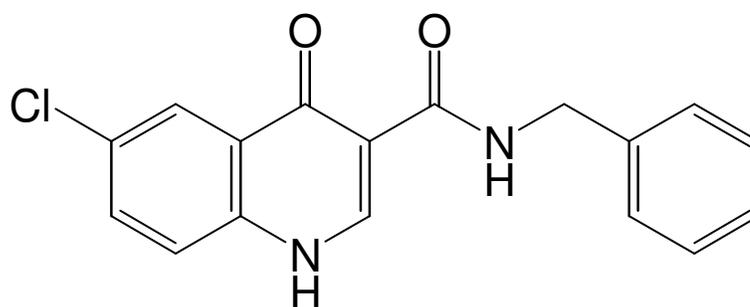


FIGURA 14 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA F12 (Fenilamina)

### 3.2.4 - Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)

Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram obtidas através do método de gradiente de densidade em Ficol-Hipaque (Hystopaque, Sigma Chem. Co., St Louis, MO). Estas células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (HyClone, Logan, UT), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 mg/mL), 2 mM glutamina, estimuladas com 5mg/mL de Fitohemaglutinina (PHA, Sigma) durante 2 a 3 dias, lavadas e novamente mantidas em meio de cultura contendo 5U/mL de Interleucina-2 (IL-2) recombinante humana (Sigma), para posteriores ensaios de infecção viral.

### 3.2.5 - Avaliações dos derivados oxoquinolínicos

#### *3.2.5.1 - Avaliação do efeito citotóxico dos derivados (CC<sub>50</sub>)*

A citotoxicidade dos derivados oxoquinolínicos foi avaliada em cultura de células VERO, as quais foram adicionadas a placas de 96 cavidades. A passagem das células nas placas de 96 cavidades foi feita através da adição de 5 mL de tripsina a 0,25% com EDTA a 0,02%.

A contagem celular foi realizada através da câmara de Neubauer. A quantidade de células por cavidade,  $4 \times 10^4$  células/mL, foi mantida em meio de cultura Eagle Earle (100  $\mu$ L) contendo soro fetal bovino a 10%, L-glutamina a 2%, penicilina e estreptomicina a 1,5%, bicarbonato de sódio a 7,5% e pH de 7,3. As células foram mantidas a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas.

A avaliação da citotoxicidade das substâncias teve sua continuidade através do preparo de quatro concentrações distintas (50 $\mu$ M, 250 $\mu$ M, 500 $\mu$ M e 1000 $\mu$ M), sempre realizadas em triplicata para cada derivado oxoquinolínico. Cada cavidade na placa recebeu a respectiva diluição.

Após 72 horas, mantendo a temperatura de 37°C e com o nível de CO<sub>2</sub> a 5%, pôde-se dar início ao processo de leitura das cavidades. Para isto, foi utilizado o sal de tetrazolio MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium), um composto hidrossolúvel, seguindo o ensaio colorimétrico laboratorial MTT. Este teste permitiu a avaliação de acordo com a alteração de coloração em cada cavidade na placa. O composto MTT, inicialmente amarelo e facilmente incorporado por células viáveis, pode sofrer alteração para a cor púrpura, não solúvel em água, de acordo com a ação da enzima desidrogenase mitocondrial das células. Quanto maior for a intensidade púrpura (armazenada no citoplasma celular), maior será a atividade mitocondrial traduzindo, por consequência, maior viabilidade celular e menor citotoxicidade da droga avaliada.

As placas foram mantidas a 37°C por 4 horas. Em seguida, a reação foi interrompida através da adição de 100  $\mu$ L da solução dodecilsulfato de sódio (SDS) em 10% ácido clorídrico (HCl) 0,01N, a qual permaneceu nas cavidades por 12 horas.

Finalmente, a placa foi levada ao leitor colorimétrico, onde pode ser realizada a avaliação de citotoxicidade dos compostos oxoquinolínicos em células VERO, através da leitura em comprimento de onda de 540 nm (MOSMANN, 1983).

### 3.2.5.2 - Avaliação da inibição do efeito citopático (TCID<sub>50</sub>)

Foram utilizadas culturas de células VERO, primariamente mantidas em garrafas de cultura de 10 mL em meio de crescimento e manutenção contendo 10% de soro fetal bovino. Após a contagem celular, feita em câmara de Neubauer, foi feita a passagem das células para as cavidades das placas. A quantidade ideal de células por poço,  $4 \times 10^4$  células/mL, foi obtida de acordo com a contagem celular e a diluição necessária. Foram adicionados, a cada placa, diferentes volumes de meio Eagle Earle: para as placas de 24 cavidades adicionou-se 400  $\mu$ L / cavidade e para as de 96 cavidades, 100  $\mu$ L / cavidade. A promoção do crescimento e desenvolvimento da monocamada celular foram obtidos através da utilização de meio de cultura contendo soro fetal bovino a 10%. As condições ambientais adequadas para o desenvolvimento celular foram estabelecidas a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas para a completa formação da monocamada, em todas as cavidades utilizadas.

Foi feito, inicialmente, o preparo da placa contendo 24 cavidades, divididas em quatro áreas distintas: controle celular (VERO), controle viral (CTGV-IOC), controle da diluição da droga (50 $\mu$ M, em duplicata) e as cavidades destinadas à avaliação do efeito antiviral dos compostos oxoquinolínicos, também em duplicata.

Após 72 horas, foram adicionados 200  $\mu$ L do vírus Cantagalo ( $10^7$ pfu) nas cavidades correspondentes. O CTGV-IOC foi diluído de acordo com o volume de células adicionado anteriormente por cavidade, alcançando a razão MOI ("multiplicity of infection") igual a um. O meio de cultura permaneceu em contato com as células por uma hora em ambiente contendo 5% de CO<sub>2</sub> a

37°C, tempo suficiente para adsorção viral. Ao final do período mencionado, o meio de todas as cavidades da placa foi retirado e foram adicionados 400 µL de meio Eagle Earle nas cavidades de controle negativo e controle positivo e 400 µL de meio contendo os derivados oxoquinolínicos diluídos nas cavidades de controle de diluição de droga e cavidades destinadas à avaliação da atividade antiviral. As diluições das substâncias foram feitas a partir de uma solução estoque de 50 mM em DMSO 100%, alcançando a concentração, em duplicata na placa, de 50 µM em meio de manutenção celular, contendo 2% de soro fetal bovino. Em seguida, a placa foi mantida em ambiente com 5% de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C por 24 horas.

Ao término do tempo de incubação de 24 horas, a placa de 24 cavidades foi submetida a três ciclos de congelamento e descongelamento, com o objetivo de promover a lise das células e, conseqüentemente, a liberação de seu conteúdo no meio de cultura, contendo ou não partículas virais. Ao final do terceiro ciclo a placa contendo 96 cavidades, previamente preparada, pôde receber o sobrenadante descongelado, sofrendo assim uma diluição seriada (de 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-8</sup>), em meio Eagle Earle. Ao final do preenchimento de todas as respectivas cavidades da placa, esta foi mantida em ambiente contendo 5% de CO<sub>2</sub> e à temperatura de 37°C (REED & MUENCH, 1938).

A placa foi visualizada diariamente em microscópio óptico e o procedimento foi interrompido quando a cavidade destinada ao controle viral apresentou efeito citopático na cavidade referente à diluição 10<sup>-7</sup>. Todas as cavidades foram visualizadas e foi feita a titulação das amostras, sendo comparadas ao título do CTGV-IOC.

### 3.2.5.3 - Avaliação da inibição da produção do CTGV-IOC ( $EC_{50}$ )

A avaliação do efeito inibitório dos derivados oxoquinolínicos, em células infectadas com CTGV-IOC, foi realizada em cultura de células VERO através da obtenção do valor  $EC_{50}$  (concentração da substância capaz de inibir 50% da produção de partículas virais). Placas de 24 cavidades, contendo células VERO, foram utilizadas. A quantidade de células por poço foi de  $9,8 \times 10^4$  células/mL. Foi adicionado 1 mL de meio celular por poço. As células foram mantidas a  $37^\circ\text{C}$ , com 5% de  $\text{CO}_2$  por 72 horas para a completa formação da monocamada em todos os poços utilizados.

A placa de 24 cavidades foi dividida em quatro áreas distintas: controle celular (VERO), controle viral (CTGV-IOC), controle de diluição das substâncias (25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ ) e cavidades para avaliação da inibição viral (contendo droga, vírus e célula).

O CTGV, com uma titulação igual a  $10^7$ , foi diluído até alcançar  $10^{-4}$  e MOI igual a um (1) em meio Eagle Earle. O produto diluído foi adicionado às cavidades de controle de diluição viral e àquelas destinadas à avaliação do efeito inibitório. O volume de 200  $\mu\text{L}$  deste produto foi mantido por uma hora nas respectivas cavidades da placa, em ambiente apresentando 5% de  $\text{CO}_2$  e temperatura igual a  $37^\circ\text{C}$ .

Ao final do tempo requerido, o meio de todas as cavidades da placa foi removido. Adicionou-se 1 mL de meio de manutenção nas cavidades destinadas ao controle celular e ao controle viral. Em seguida, foram preparadas diluições da substância F9 a partir de uma solução DMSO 50% a 100 mM nas concentrações de 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , cada uma em

triplicata, com 1 mL de meio celular apropriado por cavidade. O derivado oxoquinolínico foi adicionado à placa e mantido em ambiente contendo 5% de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C por um período de 72 horas.

Ao final do período de incubação, foi adicionado, por cavidade, 1 mL de cristal violeta contendo formalina a 10%. Este composto permaneceu por 12 horas nas cavidades para melhor fixação e coloração da monocamada celular. O volume foi retirado e apropriadamente descartado. Foi realizada a contagem das placas por cavidade e os resultados foram avaliados e comparados entre si através de cálculos, tabelas e gráficos específicos para esta metodologia.

### 3.2.6 - Comparativo dos derivados em PBMCs e HIV-1

Alguns métodos de avaliação dos derivados oxoquinolínicos também foram realizados em culturas PBMCs infectadas ou não com o HIV tipo 1, a fim de obter dados comparativos.

#### *3.2.6.1 - Avaliação da viabilidade de PBMCs através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolio (XTT)*

O efeito dos derivados oxoquinolínicos sobre a viabilidade celular foi avaliado pelo método XTT: 2,3-bis [2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl] 2H-tetrazolium-carboxanilida (XTT, Sigma). Para testar o efeito dos compostos sobre a atividade mitocondrial, PBMCs de indivíduos normais ( $2 \times 10^5$  células / 200µL / poço), em placas de 96 poços (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) foram expostas a diferentes concentrações das substâncias, durante 3 a 7 dias. Ao final desse

período, a atividade celular foi determinada por colorimetria pela adição de 50 mL da solução de XTT, e os resultados foram analisados pela leitura da absorbância a 450nm (SCUDIERO *et al.*, 1988). Os valores obtidos foram representativos de uma média de três experimentos realizados.

#### *3.2.6.2 - Atividade inibitória anti-HIV-1 em PBMC*

As PBMCs foram infectadas com isolados virais monocitotrópicos Ba-L, utilizando-se 5 a 10 ng/ml de Ag p24 do HIV-1, durante 2 a 3 horas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram lavadas três vezes para a remoção do vírus residual, ressuspensas em meio de cultura RPMI suplementado com 5U/mL de IL-2 e plaqueadas em placas de 96 poços ( $2 \times 10^5$  células/200µL) em triplicata, e tratadas com concentrações indicadas dos compostos em teste.

As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante sete dias e a replicação viral foi medida por dosagem do Ag p24, por ensaio enzimático (ELISA).

## 4 - RESULTADOS

### 4.1 – ESTUDO DA CIRCULAÇÃO DE *ORTHOPOXVIRUS* NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

#### 4.1.1 - Caracterização das lesões produzidas por *Orthopoxvirus*

Com o objetivo de caracterizarmos as lesões observadas na maior parte dos animais avaliados, foram feitos registros fotográficos de bovinos em diversos estágios da doença em propriedades do Estado Rio de Janeiro. As lesões eram compatíveis com aquelas presentes na infecção por *Orthopoxvirus*. O processo infeccioso normalmente apresentava vesículas no úbere de bovinos com, aproximadamente, 2 cm de diâmetro (figura 15).

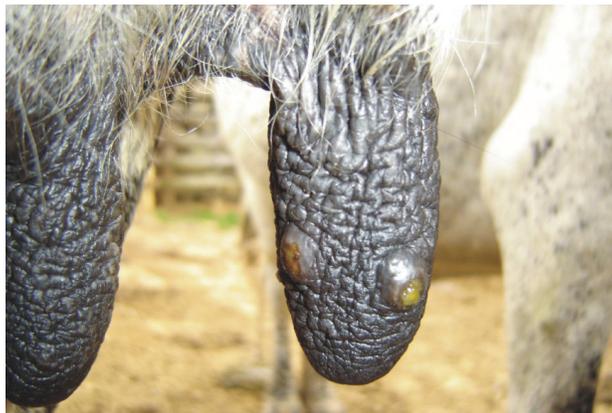


FIGURA 15 - Pústulas com conteúdo purulento em úbere de animal adulto.

(COSTA *et al.*, 2007)

As vesículas evoluíam para a forma de pústulas com conteúdo purulento e posteriormente para crostas (figura 16).



FIGURA 16 - Lesões em região do úbere causadas por *Orthopoxvirus*.

(COSTA *et al.*, 2007; SIMONETTI *et al.*, 2007)

Como observado em grande parte das propriedades, os animais em produção continuavam sendo manipulados, ordenhados. Assim, as crostas, por vezes, se soltavam e formavam, com certa facilidade, extensões hemorrágicas (figura 17).



FIGURA 17 - Extensões hemorrágicas em úbere de animal adulto.

(COSTA *et al.*, 2007)

Além dos bovinos adultos do sexo feminino, em alguns bezerros também foram notadas lesões vesiculares ao redor das narinas (figura 18), boca e língua (figura 19).



FIGURA 18 - Lesão na região das fossas nasais provocada por *Orthopoxvirus*.

(COSTA *et al.*, 2007)



FIGURA 19 - Lesão provocada por infecção de *Orthopoxvirus* localizada na língua de bezerro.

(COSTA *et al.*, 2007)

## 4.2 – ANÁLISE LABORATORIAL

### 4.2.1 - Identificação de *Orthopoxvirus*

Os resultados obtidos no LMMV/IOC na identificação da presença de vírus semelhante ao vaccinia, em bovinos localizados em diferentes regiões do Estado do Rio de Janeiro, são, em seguida, apresentados assim como os resultados da reação de PCR, realizada por nós:

#### 4.2.1.1 - Observação ao microscópio eletrônico

A microscopia eletrônica, executada no LMMV/IOC, apresentou boa sensibilidade. Dentre 22 amostras submetidas à técnica, 13 diferentes fragmentos de tecido de origem bovina (59%) demonstraram morfologia típica de *Orthopoxvirus* (quadro 2 e figura 20).

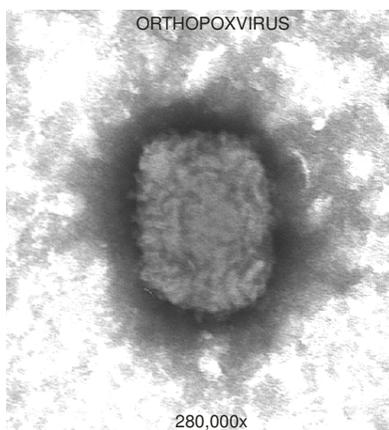


FIGURA 20 - Imagem em 280.000x de magnificação, com equipamento Zeiss modelo EM-900, apresentando a morfologia típica de *Orthopoxvirus*. Foto Barth, OM/IOC.

#### *4.2.1.2 - Isolamento viral*

Das 27 amostras testadas no LMMV/IOC, através da técnica de isolamento viral, 13 apresentaram positividade (48,1%), com observação de ECP em células VERO em meio Eagle Earle. Nos outros 14 espécimes clínicos, os resultados foram negativos para o isolamento viral (quadro 2).

#### *4.2.1.3 - Neutralização de redução de placa*

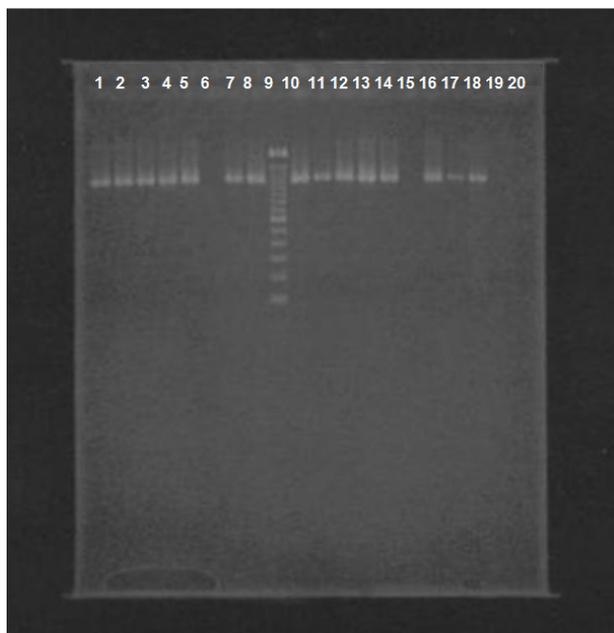
A determinação do título de anticorpos, realizada no LMMV/IOC, foi a principal metodologia responsável pelo diagnóstico da maioria dos casos. Diluições acima de 1/10 foram aceitas como positivas, mesmo com a observação de titulações tão altas quanto 1/1280. Um total de 100 amostras (76,9%) apresentou resultado positivo, dentre as 130 avaliadas. A coleta de amostras dos animais ocorreu em diferentes estágios da doença (quadro 2).

#### *4.2.1.4 - Extração, amplificação e revelação de fragmentos de DNA do gene da HA*

Das trinta e uma amostras, dentre crostas e líquidos vesiculares, obtidas de bovinos que apresentavam sintomatologia suspeita, pertencentes ou próximos a áreas de ocorrência de surtos de poxviroses no Estado do Rio de Janeiro, vinte e duas apresentaram resultados positivos (70,9%) (quadro 2). Todas foram submetidas ao procedimento de extração de DNA, referente ao protocolo de extração de conjunto laboratorial comercial (QIAGEN *mini kit*) e

amplificação de fragmento pela reação em cadeia da polimerase (PCR), através do uso de conjunto laboratorial comercial (PCR MIX, PROMEGA), conforme descrito em materiais e métodos.

Os produtos da amplificação (amplicons) do gene da hemaglutinina (HA), específico para o gênero *Orthopoxvirus* na família dos poxvírus (NAKANO & ESPOSITO, 1989; DAMASO *et al.*, 2000), apresentaram fragmentos de aproximadamente 1171 pares de base (pb). Na figura 21 está ilustrado o resultado obtido para a amplificação do fragmento genômico em algumas amostras analisadas.



Cavidades 1 - 8 e 10 - 15:  
amostras de bovinos  
Cavidade 9: Ladder 100pb  
Cavidade 16: CP CTGV/IOC  
Cavidade 17: CP CTGV/UFRJ  
Cavidade 18: CP VV Wyeth  
Cavidade 19: CN H<sub>2</sub>O livre de  
nuclease

FIGURA 21 - Foto de gel de agarose 1,5% visualizado através de emissão de luz UV em transiluminador. Fragmentos de aproximadamente 1171 pb.

Através dos resultados obtidos a partir das amostras positivamente confirmadas, pode ser feito um mapa geográfico do Estado do Rio de Janeiro



QUADRO 1 – Frequência de infecção por *Orthopoxvirus* em propriedades rurais no Estado do Rio de Janeiro

Localidade	Frequência
Valença	35,5%
Barra do Pirai	19,3%
Resende	16,1%

(COSTA *et al.*, 2007)

Todos os resultados obtidos com as metodologias aplicadas ao presente projeto estão dispostas no quadro 2.

QUADRO 2 – Resultados laboratoriais de amostras de bovinos suspeitos de infecção por *Orthopoxvirus* em regiões do Estado do Rio de Janeiro

Método	Resultado positivo	Resultado negativo	Total
Isolamento viral	13	14	27
Microscopia eletrônica	13	9	22
Teste de neutralização	100	30	130
Teste de PCR	22	9	31

(SIMONETTI *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2007)

O teste de neutralização avaliou a maior quantidade de amostras (soro) disponíveis. Dentre as outras metodologias, aplicadas à visualização ou detecção de partículas virais ou à detecção do genoma viral, o teste de PCR

apresentou melhor resultado, com 22 amostras positivas dentre as 31 analisadas.

#### 4.2.2 - Avaliação dos derivados oxoquinolínicos

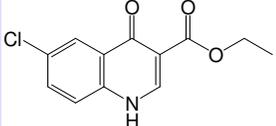
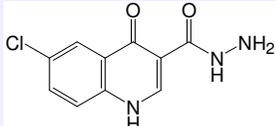
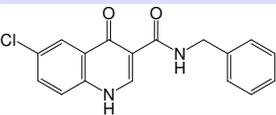
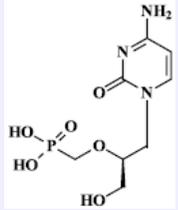
##### 4.2.2.1 - Valores referentes à avaliação do efeito citotóxico ( $CC_{50}$ )

O método de avaliação  $CC_{50}$  permite indicar qual a concentração da substância é capaz de manter 50% de viabilidade das células em meio de cultura.

Dentre os derivados oxoquinolínicos analisados, dois compostos, F9 e F12 apresentando, respectivamente, o radical éster e o radical fenil amina na posição C3, foram aprovados por apresentarem baixa citotoxicidade (F9 = 715,25  $\mu$ M e F12 = 690,25  $\mu$ M). O derivado oxoquinolínico F10 apresentou elevada citotoxicidade quando comparado aos outros derivados, com valor equivalente a 179,30  $\mu$ M.

No quadro 3, são apresentados os valores comparativos dos derivados oxoquinolínicos testados e o valor do  $CC_{50}$  do Cidofovir, substância disponível para o tratamento de casos em surtos de poxviroses. A substância F9 foi a que apresentou menor citotoxicidade dentre as avaliações realizadas.

QUADRO 3 – Valores referentes ao método CC<sub>50</sub> dos derivados oxoquinolínicos e Cidofovir

Substância	Concentração
<p><b>F9</b></p> 	715,25 µM
<p><b>F10</b></p> 	179,30 µM
<p><b>F12</b></p> 	690,25 µM
<p><b>CC<sub>50</sub> do Cidofovir</b></p> 	<p><b>318 µM</b> (WILLIAMS-AZIZ <i>et al.</i>, 2005)</p>

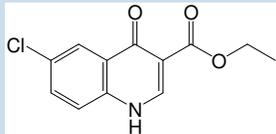
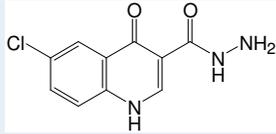
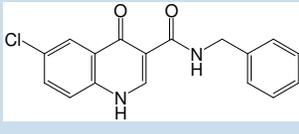
#### 4.2.2.2 - Avaliação da inibição do efeito citopático viral (TCID<sub>50</sub>)

Com o objetivo de investigarmos se a presença dos radicais éster e fenil amina poderia interferir na replicação do CTGV-IOC, foi feita a avaliação da atividade antiviral dos derivados oxoquinolínicos através do TCID<sub>50</sub> (“tissue culture infectious dose 50”).

Os valores obtidos resultaram dos cálculos de título infeccioso, a partir do efeito citopático observado nas cavidades das placas.

As três drogas avaliadas apresentaram índices significativos, indicados no quadro 4, quando utilizada a concentração de 50 µM.

QUADRO 4 – Valores referentes ao método TCID<sub>50</sub> dos derivados oxoquinolínicos

Substância (50µM)	TCID <sub>50</sub> ml <sup>-1</sup>	%
<b>F9</b> 	<b>10<sup>5,72</sup></b>	<b>66,7</b>
<b>F10</b> 	<b>10<sup>5,71</sup></b>	<b>66,7</b>
<b>F12</b> 	<b>10<sup>5,18</sup></b>	<b>66,7</b>

CTGV IOC = 1 x 10<sup>7</sup> pfu

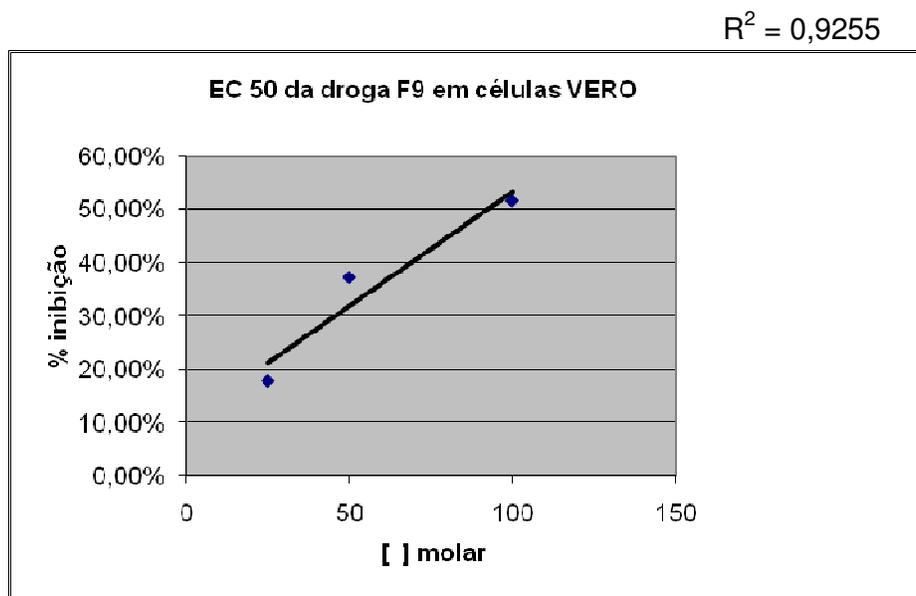
Considerando os valores obtidos das substâncias avaliadas e comparando a titulação do vírus utilizado (CTGV IOC = 1 x 10<sup>7</sup> pfu) todas as substâncias foram capazes de reduzir em dois log de infectividade a titulação do CTGV IOC. A quantidade foi reduzida de 10 milhões para 0,1 milhões de partículas virais por mL. Todos os compostos apresentaram atividade antiviral significativa quando avaliados pela metodologia TCID<sub>50</sub>.

#### 4.2.2.3 - Avaliação da inibição da produção viral ( $EC_{50}$ )

A avaliação dos derivados oxoquinolínicos foi feita através da observação do efeito inibitório pelo método de ensaio de placa  $EC_{50}$ . Esta metodologia representa a concentração da substância capaz de inibir 50% da produção de partículas virais. A metodologia foi realizada utilizando-se a substância F9 nas concentrações de 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M.

O gráfico 1 apresenta a resposta dose dependente da substância avaliada. Foi observada a inibição da atividade do vírus Cantagalo (CTGV - IOC) de acordo com a variação da concentração da substância F9. Este derivado oxoquinolínico tem, como principal característica estrutural, a presença do radical éster, diferenciando-se dos demais compostos testados anteriormente em metodologias comparativas.

GRÁFICO 1 – Resposta dose dependente da substância F9 para CTGV-IOC



Nossos resultados de atividade antiviral mostraram resposta dose dependente de 18%, 40% e 52% nas concentrações de 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , respectivamente (quadro 5).

QUADRO 5 – Valores referentes ao método  $\text{EC}_{50}$  da substância F9

Concentração da substância F9	Índice de inibição
25 $\mu\text{M}$	18%
50 $\mu\text{M}$	40%
100 $\mu\text{M}$	52%

Assim, com os resultados obtidos nesta tabela, pode ser feito o cálculo do  $\text{EC}_{50}$  para a substância F9, sendo o valor encontrado igual a 91  $\mu\text{M}$ .

O valor de  $\text{EC}_{50}$  indica qual a concentração da substância é capaz de inibir 50% da atividade viral.

A partir dos valores de  $\text{CC}_{50}$  e  $\text{EC}_{50}$  do derivado oxoquinolínico F9, pode ser calculado o valor de SI (índice de seletividade), que representa o grau de segurança para a utilização da substância candidata a fármaco. É sempre conveniente que esse índice seja bastante elevado, com um alto valor de  $\text{CC}_{50}$  e um baixo valor de  $\text{EC}_{50}$ , pois, desta forma, a concentração de droga capaz de levar à morte 50% das células é muito superior àquela necessária para diminuir em 50% a produção de partículas virais.

Os valores calculados para  $\text{CC}_{50}$ ,  $\text{EC}_{50}$  e SI, referentes ao derivado oxoquinolínico F9 são apresentados no quadro 6.

QUADRO 6 – Comparativo entre os resultados dos índices obtidos com a substância F9

Substância F9	Valores obtidos $\mu\text{M}$
CC <sub>50</sub>	715,25
EC <sub>50</sub>	91
CC <sub>50</sub> / EC <sub>50</sub> = SI	7,85

A figura 23 apresenta o comparativo entre as estruturas químicas do medicamento disponível comercialmente (Cidofovir) e o composto F9 (menor citotoxicidade dentre os derivados oxoquinolínicos avaliados).

Complementando a ilustração seguinte à figura 23, é apresentado um comparativo entre os valores de EC<sub>50</sub> e SI da substância F9 e do fármaco CDV (quadro 7).

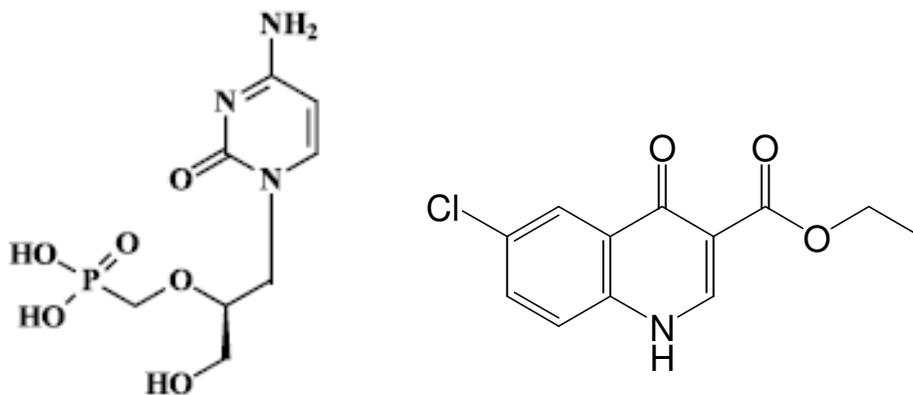


FIGURA 23 – Estruturas químicas das substâncias Cidofovir e F9.

QUADRO 7 – Comparativo de valores EC<sub>50</sub> e SI entre a substância F9 e o Cidofovir

<b>Método e Substância</b>	<b>Concentrações</b>
<b>EC<sub>50</sub> - F9</b>	<b>91 ± 2 μM</b>
<b>EC<sub>50</sub> - Cidofovir</b>	<b>19 ± 6 μM (Vaccinia WT)</b> <b>150 ± 36 μM (Vaccinia-R)</b> (SMEE <i>et al.</i> , 2002)
<b>SI - F9</b>	<b>7,85 μM</b>
<b>SI - Cidofovir</b>	<b>16,7 μM (Vaccinia WT)</b> <b>2,12 μM (Vaccinia-R)</b> (SMEE <i>et al.</i> , 2002; WILLIAMS-AZIZ <i>et al.</i> , 2005)

#### 4.2.2.4 - Comparativo de resultados com os derivados na presença do HIV-1

Os derivados oxoquinolínicos também foram avaliados em culturas de PBMCs. A avaliação da viabilidade de PBMCs através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolio (XTT) e atividade inibitória anti-HIV-1 em PBMC, foram realizadas com os três derivados (F9, F10 e F12) (quadro 8).

QUADRO 8 – Quadro comparativo dos derivados oxoquinolínicos para o HIV-1  
em PBMCs

<b>Substância</b>	<b>CC<sub>50</sub></b>	<b>Inibição com 50µM</b>
<b>F9</b>	<b>1658 µM</b>	<b>58%</b>
<b>F10</b>	<b>1233 µM</b>	<b>29,1%</b>
<b>F12</b>	<b>1395 µM</b>	<b>47,5%</b>

Como observado no quadro 8, a melhor substância avaliada foi o derivado oxoquinolínico F9, sendo a menos citotóxica e com o maior percentual de inibição da atividade viral do HIV-1.

## 5 – DISCUSSÃO

No ano de 1999, Damaso e colaboradores (DAMASO *et al.*, 2000) observaram diversas suspeitas de infecção pelo CTGV em alguns municípios da região do Noroeste Fluminense tais como Cantagalo, Santo Antônio de Pádua, Miracema, dentre outros. Inicialmente, os casos assemelhavam-se a quadros de infecção por CPV. Através de metodologias diagnósticas, como sequenciamento e análise filogenética, foram confirmadas infecções pelo CTGV em seres humanos e bovinos no distrito de São Sebastião da Paraíba, localizado no município de Cantagalo e em Santo Antônio de Pádua (figura 3).

No período de 1999 a 2000, as amostras coletadas de líquido vesicular e tecido animal (crosta) confirmaram, através da técnica de microscopia eletrônica, além dos métodos de sequenciamento genômico e análise filogenética, a existência do CTGV no estado do Rio de Janeiro (DAMASO *et al.*, 2000).

No presente trabalho, implantamos a técnica de PCR para o diagnóstico de novos casos de infecção por vírus semelhante ao vaccinia em amostras de crostas e líquidos vesiculares de bovinos com suspeita de contaminação viral, comparando posteriormente com os resultados disponíveis no LMMV e obtidos por outras técnicas como isolamento viral, microscopia eletrônica e sorologia.

Todos os animais pertenciam a propriedades rurais particulares e a amostragem foi feita com a concordância de seus respectivos proprietários. A coleta e o diagnóstico foram trabalhos também considerados simples, eficientes e relativamente rápidos. A maior dificuldade foi conscientizar e transmitir informações necessárias desta orthopoxvirose à população rural e

obter aprovação da realização do trabalho, além de permitir a notificação da propriedade às autoridades públicas responsáveis.

As metodologias utilizadas no presente trabalho alcançaram todos os objetivos estabelecidos. Mesmo com diferença na disponibilidade de amostras para todas as metodologias, as quais variavam de acordo com o espécime clínico, os resultados demonstraram a expansão e contínua circulação de *Orthopoxvirus* em propriedades rurais do Rio de Janeiro quando comparados ao período de 1999-2000 (figuras 3 e 22).

As regiões que, desde 2006, apresentaram, ao menos, um caso positivo de infecção em bovinos, confirmado através dos métodos apresentados foram os municípios de Cantagalo, Cordeiro, Aperibé, Santo Antonio de Pádua, Cambuci, Miracema, Valença, Barra do Piraí, Campos dos Goytacazes, Rio das Flores, Piraí, Rio Claro, Resende e região do Vale do Rio Paraíba, representando a disseminação de *Orthopoxvirus* pelos municípios do estado do Rio de Janeiro (figura 22).

Em grande parte das propriedades pode ser feito o registro fotográfico dos animais avaliados. Todos apresentaram sintomatologia clínica típica de infecção por *Orthopoxvirus*. Vesículas, pústulas com conteúdo purulento em úbere de animal adulto, crostas, lesões na região do focinho, boca e língua foram observados nos animais avaliados (figuras 15, 16, 17, 18 e 19). As lesões apresentavam características típicas de infecção por *Orthopoxvirus*, comparando com imagens da literatura (figuras 8, 9 e 10). As três regiões que apresentaram a maior concentração dos casos positivos em bovinos no estado foram Valença (35,5%), Barra do Piraí (19,3%) e Resende (16,1%) (quadro 1).

A microscopia eletrônica foi uma ferramenta útil na confirmação de resultados positivos nos métodos de isolamento viral. O vírus isolado foi caracterizado, morfológicamente, através da observação de características específicas dos *Orthopoxvirus*, como formato retangular ou ovóide (figura 20) (SCHATZMAYR *et al.*, 2000).

Com relação à coleta de amostras e aplicação do método, o teste de neutralização foi a metodologia que forneceu a maior quantidade de avaliações e, conseqüentemente, o maior número de resultados (quadro 2). A determinação de anticorpos foi feita a partir de amostras sorológicas, material particularmente simples de ser coletado e trabalhado.

O ensaio de reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene da hemaglutinina (HA) foi uma ferramenta especialmente eficiente e rápida para o diagnóstico da infecção viral (figura 21). Apesar de não ter alcançado grande número de avaliações, quando comparada ao método de neutralização de redução de placa (quadro 2), a técnica é uma das mais sensíveis disponíveis para o diagnóstico. Assinala-se, também, o importante relato de adaptações da técnica de PCR desenvolvidas por Clarissa Damaso e colaboradores, no ano de 2007, permitindo a amplificação do gene da hemaglutinina, de maneira específica e restrita para o CTGV, através da utilização de primers alterados em 18 nucleotídeos.

O uso de vacinas contendo vírus vivo atenuado, em populações não controladas, no período de erradicação da varíola humana, envolve o risco de recombinações entre poxvirus do tipo selvagem e cepas que podem ter sido recentemente introduzidas. Para prever o impacto destas campanhas, a vigilância de poxviroses de ocorrência natural é essencial e tem sido conduzida

em locais como no oeste e centro da Europa, observando a vacinação com o vírus vaccinia (VV) e vírus da raiva (BOULANGER *et al.*, 1996; SANDVIK *et al.*, 1998). No Brasil, a vigilância e acompanhamento de casos necessitam ser realizados com maior frequência.

Como a zoonose estudada está em expansão, com risco de causar grandes prejuízos ao serem atingidas bacias leiteiras de expressão significativa, além dos prejuízos que já estão causando em pequenos produtores, o assunto deve ser avaliado criteriosamente. Assinale-se que, recente revisão internacional sobre poxvirus e sua capacidade de adaptar-se a hospedeiros, na natureza, cita o que está acontecendo no Brasil em termos da difusão do vírus vaccinia (REGNERY, 2007). Diante desta possibilidade, medidas profiláticas eficientes deveriam ser aplicadas, como o uso de vacinas ou medicamentos específicos. Como não há disponibilidade de vacinas, o desenvolvimento e pesquisa de novas substâncias antivirais são atividades fundamentais no tratamento desta zoonose.

As quinolonas são substâncias comumente utilizadas como agentes antivirais, apresentando resultados satisfatórios (STEVENS *et al.*, 2007). Relacionado a este item, o grupo de pesquisa da Universidade Federal Fluminense vem desenvolvendo, desde 1995, estudos de atividade antiviral utilizando os derivados oxoquinolínicos sintetizados pelo grupo do Instituto de Química, coordenado pela professora Maria Cecília de Souza (MATTA *et al.*, 1999).

No ano de 2007, Stevens e colaboradores avaliaram novos derivados quinolínicos (6-Desfluoroquinolonas) na inibição da replicação do HIV-1 em células específicas (linhagens OM-10,1 e U1). Os compostos avaliados inibiram

a transcrição viral em 50% com concentrações de 0,05 µg/mL, em média, e valores de  $CC_{50}$  de 5 µg/mL, aproximadamente. O índice de seletividade encontrado foi de 125 e todos os resultados *in vitro* divulgados foram considerados satisfatórios na inibição da replicação do HIV tipo 1. Estes dados demonstram que as quinolonas podem ser substâncias com atividades altamente específicas, de acordo com o tipo de células e o agente viral a ser inibido.

As substâncias testadas no presente trabalho apresentaram valores de citotoxicidade variados. Os compostos F9 (radical éster na posição C3) e F12 (radical fenil amina na posição C3) demonstraram baixa toxicidade em meio de cultura de células VERO apresentando, respectivamente, concentrações de 715,25 µM e 690,25 µM. Já o composto F10 apresentou a maior citotoxicidade, quando comparado aos outros derivados, com um valor de 179,30 µM (quadro 3). O melhor valor de  $CC_{50}$  foi observado para a substância F9. Dados da literatura indicam que derivados quinolônicos (aminoquinolínicos) foram testados em células Jukart, apresentando  $CC_{50}$  de 56,24 µM (PAROLIN *et al.*, 2003), considerados satisfatórios pelos autores para a linhagem celular utilizada.

Com relação ao Cidofovir, droga comercialmente disponível no tratamento de orthopoxviroses, Williams-Aziz e colaboradores apresentaram, em 2005, um valor de  $CC_{50} = 318$  µM em células HFF. Este valor demonstra que as drogas avaliadas no presente trabalho (F9, F10 e F12) possuem menor citotoxicidade do que a droga comercialmente disponível (Vistide®), mesmo tratando-se de diferentes tipos celulares (quadro 3).

A ação inibitória dos derivados oxoquinolínicos, quando em contato com o CTGV-IOC, foi considerada significativa. Os três compostos testados apresentaram atividade inibitória do efeito citopático na avaliação TCID<sub>50</sub> (quadro 4), sendo capazes de reduzir, em dois log de infectividade, a titulação do CTGV IOC. Isto representa uma redução de 10 milhões para 0,1 milhões de partículas virais por mL. A inibição obtida através do método TCID<sub>50</sub> foi de aproximadamente 66,7% para as três substâncias (F9, F10 e F12). Todos os compostos apresentaram atividade antiviral significativa quando avaliados pela metodologia TCID<sub>50</sub>. Mesmo sendo muito próximos os valores encontrados, iguais em termos percentuais, a citotoxicidade da substância F10 impediu a sua avaliação no teste de inibição da produção viral (EC<sub>50</sub>). Entre os derivados F9 e F12, foi feita a escolha da primeira substância por ter apresentado o melhor índice de citotoxicidade (715,25 µM), permitindo maior margem de segurança em relação às suas concentrações durante as avaliações em células VERO e menor probabilidade de erros relacionados à toxicidade nos resultados finais.

Avaliamos também, através do método de ensaio de placa, o cálculo da concentração da droga capaz de inibir a replicação viral em 50% (EC<sub>50</sub>). Esta metodologia foi realizada apenas para a substância F9, derivado oxoquinolínico contendo o radical éster. Utilizando a concentração de 25 µM não houve índice de inibição significativo na avaliação por EC<sub>50</sub>, enquanto que as concentrações 50 µM e 100 µM apresentaram efeitos inibitórios com porcentagens elevadas (quadro 5). Nossos resultados indicaram que a substância F9 apresentou boa atividade antiviral, respondendo de forma dose dependente, ou seja, variando de acordo com a relação dose resposta (gráfico 1).

No ano de 2004, Richter e colaboradores testaram alguns derivados quinolônicos para atividade contra o HIV em células (HL3T1) e observaram índice de inibição de 77% quando utilizada a concentração de 10  $\mu\text{M}$ . O derivado inibiu a trans-ativação Tat-dependente, uma das seis proteínas regulatórias essenciais para a replicação do HIV (RICHTER *et al.*, 2004). Este resultado comprova que os derivados quinolônicos podem ser substâncias altamente específicas na inibição do ciclo replicativo de determinados vírus.

No ano de 2002, Smee e colaboradores apresentaram avaliações do método  $\text{EC}_{50}$  utilizando o vírus VV-WT e VV-R ao Cidofovir em células VERO, encontrando os valores  $19 \pm 6 \mu\text{M}$  e  $150 \pm 36 \mu\text{M}$ , respectivamente. Quando comparado ao valor encontrado no presente trabalho ( $\text{EC}_{50} = 91 \mu\text{M}$ ), a substância F9 demonstrou resultado significativo, considerando que existem cepas do vírus Vaccinia resistentes ao Cidofovir (quadros 6 e 7). Outro valor que deve ser levado em consideração é o índice de seletividade. A partir de dados da literatura, o medicamento de referência para tratamento de surtos de poxvírus apresenta  $\text{SI} = 16,7 \mu\text{M}$  para o VV-WT e  $\text{SI} = 2,12 \mu\text{M}$  para o vírus vaccinia resistente ao Cidofovir (SMEE *et al.*, 2002; WILLIAMS-AZIZ *et al.*, 2005). A substância F9 apresentou índice de seletividade igual a  $7,85 \mu\text{M}$  (quadro 6), valor considerado satisfatório se considerarmos que o Cidofovir já possui cepas virais resistentes (quadro 7).

Além disso, o mecanismo exato de ação deste medicamento, comercialmente disponível contra o vírus vaccinia ou qualquer outra orthopoxvírose, não foi determinado (DE CLERCQ, 2002), evidenciando maior importância da necessidade de obtenção de novas substâncias que desenvolvam atividades contra os *Orthopoxvirus*.

Com relação aos testes adicionais comparativos, realizados com os mesmos derivados oxoquinolínicos (F9, F10 e F12) em PBMCs para o HIV tipo 1, os resultados foram satisfatórios. Todas as substâncias avaliadas apresentaram valores semelhantes aos observados em células VERO, se comparados à avaliação da viabilidade de PBMCs através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolio (XTT). A substância F9 foi a menos citotóxica (1658  $\mu\text{M}$ ) e a substância F10 apresentou a maior citotoxicidade (1233  $\mu\text{M}$ ). O derivado F12 obteve  $\text{CC}_{50} = 1395 \mu\text{M}$  (quadro 8). A mesma ordem de eficiência entre os derivados foi observada nos resultados obtidos a partir da avaliação da atividade inibitória anti-HIV-1 em PBMC para o HIV-1. Os derivados oxoquinolínicos apresentaram percentual de inibição: F9 = 58%, F10 = 29,1% e F12 = 47,5% (quadro 8). Estes valores confirmam a eficiência das quinolonas como possíveis agentes antivirais.

As avaliações *in vitro* envolvendo compostos farmacológicos devem continuar, inserindo outros derivados químicos e famílias, uma vez que não existem tratamentos específicos e vacinas eficientes para o CTGV-IOC e suas variantes. Metodologias *in vivo* também são consideradas de suma importância e necessitam de maior atenção.

Uma necessidade maior é a obtenção de informações sugerindo a via de atuação antiviral em vírus semelhantes ao vaccinia. A partir da definição da via de atuação dos derivados oxoquinolínicos será possível compreender melhor esta patologia em ascensão. Além destes, outros compostos também podem e devem ser avaliados com relação às atividades antivirais.

A carência de notificações no país agrava e só faz aumentar o problema no que diz respeito ao futuro do setor leiteiro. Existe a necessidade de redução

dos impactos decorrentes destas infecções, através de melhor manejo dos animais e maior controle de roedores. Atualmente, existe a possibilidade de criação de uma vacina para o controle desta zoonose no Brasil. Isto se torna viável a partir do momento que existem amostras do vírus vaccinia, de baixa virulência, que produzem boas respostas de anticorpos, além da possibilidade de utilização de vacinas inativadas potentes que poderiam ser preparadas (SCHATZMAYR *et al.*, 2005). O assunto carece de avaliações mais concretas e objetivas. A gravidade da situação tende a aumentar, prejudicando os setores da economia e saúde.

Existe, ainda, a possibilidade de destruição das últimas cepas virais da varíola humana, hoje sob poder dos Estados Unidos e Rússia. Esta eliminação está programada para o ano de 2011, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS). A razão da manutenção destas amostras virais até este período se justifica pelas características de replicação e sobrevivência do vírus, pouco elucidadas, mesmo com o advento da ciência moderna. O vírus é mantido sob poder do exército nestes países, em laboratórios de Biossegurança nível 4 (NB4) e é alvo constante de estudos e experimentos. Mesmo com tantos anos de estudos, este vírus ainda possui características pouco elucidadas. A provável eliminação definitiva deste patógeno não diminui a importância da família Poxviridae. As características dos gêneros e espécies que compõem tal grupo aliadas à variedade dos mesmos reforçam a necessidade de estudos contínuos e notificações permanentes dos surtos que ocorrem mundialmente.

Os principais estudos em realização com a coordenação e supervisão da OMS, nestes laboratórios de alta segurança, são os desenvolvimentos de

drogas antivirais por inoculação do vírus da varíola em primatas e de métodos de diagnóstico rápido, também usando primatas susceptíveis ao vírus, além do desenvolvimento de vacinas mais eficientes.

Diante de todas as informações obtidas até o momento, incluindo o trabalho apresentado, relatos fornecidos pela literatura científica moderna e pela história desta virose na população e nos animais, que indicam um patógeno altamente adaptável ao organismo humano, fazem-se necessários contínuos estudos.

Notificações e acompanhamentos de casos em animais e nos seres humanos, pesquisa de novos compostos antivirais farmacológicos de amplo espectro, conscientização da população, principalmente rural, da comunidade científica e da saúde, elaboração de campanhas visando o controle e a erradicação da doença, dentre diversas outras medidas, são importantes e devem ser aderidas pelo sistema de serviço de saúde pública do Brasil. O reconhecimento desta zoonose e a adoção de medidas cabíveis podem ser considerados como as principais atitudes imediatas no país para o melhor entendimento e controle da doença.

## 6 - CONCLUSÃO

- Todas as metodologias incluídas no presente trabalho, aplicadas ao grupo poxvirus, em amostras circulantes no estado do Rio de Janeiro, apresentaram bons resultados, confirmando a presença de vírus semelhante ao vaccinia em bovinos e sua disseminação por diferentes propriedades e regiões.
- O método de PCR apresentou, particularmente, resultados satisfatórios, com a amplificação do gene da hemaglutinina em 22 das 31 amostras analisadas.
- Os derivados oxoquinolínicos demonstraram ação inibidora sobre amostra padrão de poxvírus (CTGV-IOC) semelhante ao vírus vaccinia, igualmente isolada no estado.
- Através do método MTT o derivado oxoquinolínico F9 apresentou a menor citotoxicidade em células VERO e PBMCs.
- A avaliação das atividades antivirais (CTGV-IOC e HIV-1) revelou a substância F9 como o melhor antiviral testado.

## **PERSPECTIVAS**

- Sequenciamento genético e análise filogenética dos produtos amplificados por PCR;
- Avaliação de novos derivados oxoquinolínicos e novas substâncias;
- Estudar o mecanismo de ação das substâncias durante o ciclo de replicação do CTGV-IOC e HIV-1 (efeito virucida, efeito adsorção, penetração e replicação);
- Avaliação da morfogênese viral na presença destas substâncias;
- Coleta de amostras de outras regiões do Estado do Rio de Janeiro;
- Avaliação da infecção viral em cultura de células primárias de retina não tratadas e tratadas com as substâncias para observação de tropismo viral em células do sistema nervoso.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**BAXBY, D.** (1977) The origins of vaccinia virus. *J Infect Dis.* v. 136, p. 453-455.

**BAXBY, D.; SHACKLETON, W.B.; WHEELER, J.; TURNER, A.** (1979) Comparison of cowpox-like viruses isolated from European zoos. *Arch Virol.* v. 61, p. 337-340.

**BOULANGER, D.; CROUCH, A.; BROCHIER, B.; BENNETT, M.; CLÉMENT, J., GASKELL, R. M.; BAXBY, D.; PASTORET, P. P.** (1996) Serological survey for orthopoxvirus infection of wild mammals in areas where a recombinant rabies virus is used to vaccinate foxes. *Veterinary Record*, v. 138, p. 247-249.

**BRAY, M.; MARTINEZ, M.; SMEE, D.F.; KEFAUVER, D.; THOMPSON, E.; HUGGINS, J.W.** (2000) Cidofovir protects mice against lethal aerosol or intranasal cowpox virus challenge. *J Infect Dis.* v. 181, p. 10-19.

**BRAY, M.; MARTINEZ, M.; WEST, M.; ROY, C.** (2002) Treatment of aerosolized cowpox virus infection in mice with aerosolized cidofovir. *Antiviral Res.* v. 54, p. 129-142.

**BRENNER, S.; HORNE, R.W.** (1959) A negative staining method for high-resolution electron microscopy of viruses. *Biochim Biophys Acta.* v. 34, p. 103-104.

**CASEY, C.; VELLOZZI, C.; MOOTREY, G.T.; CHAPMAN, L.E.; MCCAULEY, M.; ROPER, M.H.; DAMON, I.; SWERDLOW, D.L.; Vaccinia Case Definition Development Working Group; Advisory Committee on Immunization Practices-Armed Forces Epidemiological Board Smallpox Vaccine Safety Working Group.** (2006) Surveillance guidelines for smallpox vaccine (vaccinia) adverse reactions. *MMWR Recomm Rep.* v.3, p. 1-16.

**CHANTREY, J.; MEYER, H.; BAXBY, D.; BEGON, M.; BROWN, K.J.; HAZEL, S.M.; JONES, T.; MONTGOMERY, W.I.; BENNETT, M.** (1999) Cowpox: Reservoir hosts and geographic range. *Epidemiol Infect.* v. 122, p. 455-460.

**CORY, A.H.; OWEN, T.C.; BARLTROP, J.A.; CORY, J.G.** (1991) Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Communications.* v. 3, n. 7, p. 207–12.

**COSTA, R.V.C.; SIMONETTI, B.R.; ABREU, D.C.; SIMONETTI, J.P.; GONÇALVES, M.C.R.; SILVA, M.E.V.; BRUST, L.A.C.; BARTH, O.M.; SCHATZMAYR, H.G.** (2007) Animal infections by vaccinia-like viruses in the State of Rio de Janeiro: 2 - Paraíba river valley. *Virus Reviews & Research.* v. 12, n. 1-2, p. 37-42.

**CUNDY, K.C.; BIDGOOD, A.M.; LYNCH, G.; SHAW, J.P.; GRIFFIN, L.; LEE, W.A.** (1996a) Pharmacokinetics, bioavailability, metabolism and tissue distribution of cidofovir (HPMPC) and cyclic HPMPC in rats. *Drug Metab Dispos.* v. 24, p. 745-752.

**CUNDY, K.C.; LI, Z.H.; HITCHCOCK, M.J.M.; LEE, W.A.** (1996b) Pharmacokinetics of cidofovir in monkeys. Evidence for a prolonged elimination phase representing phosphorylated drug. *Drug Metab Dispos.* v. 24, p. 738-744.

**DAMASO, C.R.A.; ESPOSITO, J.J.; CONDIT, R.C.; MOUSSATCHE, N.** (2000) An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology.* v. 277, n. 2, p. 439-449.

**DAMASO, C.R.A.; REIS, S.A.; JESUS, D.M.; LIMA, P.S.F.; MOUSSATCHE, N.** (2007) A PCR-based assay for detection of emerging vaccinia-like viruses isolated in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* v. 57, n. 1, p. 39-46.

**DE CLERCQ, E.** (2002) Cidofovir in the treatment of poxvirus infections. *Antiviral Research,* v. 55, p. 1–13.

**DE CLERCQ, E.** (2001) Vaccinia virus inhibitors as a paradigm for the chemotherapy of poxvirus infections. *Clin Microbiol Rev.* v. 14, p. 382-397.

**DE CLERCQ, E.; HOLÝ, A.; ROSENBERG, I.** (1989) Efficacy of phosphonylmethoxyalkyl derivatives of adenine in experimental herpes simplex virus and vaccinia virus infections in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* v. 33, p. 185-191.

**DE CLERCQ, E.; HOLÝ, A.; ROSENBERG, I.; SAKUMA, T.; BALZARINI, J.; MAUDGAL, P.C.** (1986) A novel selective broad-spectrum anti-DNA virus agent. *Nature*. v. 323, p. 464-467.

**DE CLERCQ, E.; SAKUMA, T.; BABA, M.; PAUWELS, R.; BALZARINI, J.; ROSENBERG, I.; HOLÝ, A.** (1987) Antiviral activity of phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purine and pyrimidines. *Antiviral Res.* v. 8, p. 261-272.

**DUMBELL, K.; RICHARDSON, M.** (1993) Virological investigation of specimens from buffaloes affected by buffalopox in Maharashtra State, India between 1985 and 1987. *Arch Virol.* v. 128, p. 257-267.

**FENNER, F.; HENDERSON, D.A.; ARITA, I.; JEZEK, Z.; LADNYI, I.D.** (1988) Potential sources for a return of smallpox. *In: Smallpox and its eradication. Geneva: World Health Organization.* Chapter 20, p. 1321-1344.

**FENNER, F.; WITTEK, R.; DUMBELL, K.R.** (1989) The global spread, control and eradication of smallpox. *In: The Orthopoxviruses. San Diego: Academic Press,* p. 317-352.

**FITZGIBBON, J.E.; SAGRIPANTI, J.L.** (2006) Simultaneous identification of orthopoxviruses and alphaviruses by oligonucleotide macroarray with special emphasis on detection of variola and Venezuelan equine encephalitis viruses. *J Virol Methods.* v. 131, n. 2, p. 160-167.

**FONSECA, F.G.; LANNA, M.C.; CAMPOS, M.A. KITAJIMA, E.W.; PERES, J.N.; GOLGHER, R.R.; FERREIRA, P.C.; KROON, E.G.** (1998) Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. *Arch Virol.* v. 143, p. 1171-1186.

**FONSECA, F.G.; SILVA, R.L.A.; MARQUES, J.T.; FERREIRA, P.C.P.; KROON, E.G.** (1999) The Genome of Cowpox Virus Contains a Gene Related to Those Encoding the Epidermal Growth Factor, Transforming Growth Factor Alpha and Vaccinia Growth Factor. *Virus Genes.* v. 18, n. 2, p. 151-160.

**FONSECA, F.G.; TRINDADE, G.S.; SILVA, R.L.; BONJARDIM, C.A.; FERREIRA, P.C.; KROON, E.G.** (2002) Characterization of a vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. *J Gen Virol.* v. 83, p. 223-228.

**GUBSER, C.; HUÉ, S.; KELLAM, P.; SMITH, G.L.** (2004) Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol.* v. 85, p. 105-117.

**HEYMANN, D.L.** (2004) Smallpox containment updated: considerations for the 21st century. *Int J Infect Dis.* v.8, n.S2, p. 15-20.

**HEYMANN, D.L.; SZCZENIEWSKI, M.; ESTEVES, K.** (1998) Re-emergence of monkeypox in Africa: a review of the past six years. *British Medical Bulletin.* v. 54, p. 693-702.

**HUGGINS, J.W.; BAKER, R.O.; BEADLE, J.R.; HOSTETLER, K.Y.** (2002) Orally active ether lipid prodrugs of cidofovir for the treatment of smallpox. *Antiviral Res.* v. 53, n. A66.

**JEZEK, Z.; MARENNIKOVA, S.S.; MUTUMBO, M.; NAKANO, J.H.; PALUKU, K.M.; SZCZENIOWSKI, M.** (1986) Human monkeypox: a study of 2,510 contacts of 214 patients. *Journal of Infectious Diseases.* v. 154, p. 551-555.

**KATARIA, R.S.; SINGH, I.P.** (1970) Serological relationship of buffalopox virus to vaccinia and cowpox viruses. *Acta Virol.* v. 128, p. 307-311.

**KERN, E.R.** (2003) In vitro activity of potential anti-poxvirus agents. *Antiviral Research.* v. 57, p. 35-40.

**KERN, E.R.; HARTLINE, C.; HARDEN, E.; KEITH, K.; RODRIGUEZ, N.; BEADLE, J.R.; HOSTETLER, K.Y.** (2002) Enhanced inhibition of orthopoxvirus replication in vitro by alkoxyalkyl esters of cidofovir and cyclic cidofovir. *Antimicrob Agents Chemother.* v. 46, p. 991-995.

**KOLHAPURE, R.M.; DEOLANKAR, R.P.; TUPE, C.D.; RAUT, C.G.; BASU, A.; DAMA, B.M.; PAWAR, S.D.; JOSHI, M.W.; PADBIDRI, V.S.; GOVERDHAN, M.K.; BANERJEE, K.** (1997) Investigation of buffalopox outbreaks in Maharashtra State during 1992-1996. *Indian J Med Res.* v. 106, p. 441-446.

**LEFKOWITZ, E.J.; WANG, C.; UPTON, C.** (2006) Poxviruses: past, present and future. *Virus Research*. v. 117, p. 105-118.

**LEWIS, A.; BOK, K.; PEREZ, O.; DEFILLIPPO, J.; PAOLAZZI, C.; GOMEZ, J.A.** (2005) Characterization of a vaccinia virus strain used to produce smallpox vaccine in Argentina between 1937 and 1970. *Archives of Virology*. v. 150, n. 7, p. 1485-1491.

**LI, G.; CHEN, N.; ROPER, R.L.; FENG, Z.; HUNTER, A.; DANILA, M.; LEFKOWITZ, E.J.; BULLER, R.M.L.; UPTON, C.** (2005) Complete coding sequences of the rabbitpox virus genome. *J Gen Virol*. v. 86, p. 2969-2977.

**LOPES, O.S.; LACERDA, J.P.G.; FONSECA, I.E.M.** (1965) Cotia virus: a new agent isolated from sentinel mice in São Paulo, Brazil. *Amer J Trop Med Hyg*. v. 14, p. 156-157.

**LUCERO, B.d'A.; GOMES, C.R.B.; FRUGULHETTI, I.C.P.P.; FARO, L.V.; ALVARENGA, L.; SOUZA, M.C.B.V.; SOUZA, T.M.L.; FERREIRA, V.F.** (2006) Synthesis and anti-HSV-1 activity of quinolonic acyclovir analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 16, p. 1010-1013.

**LUM, G.S.; SORIANO, F.; TREJOS, A.; LLERENA, J.** (1967) Vaccinia epidemic and epizootic in El Salvador. *Am J Trop Med Hyg*. v. 16, p. 332-338.

**MALTSEVA, N.N.; AKATOVA-SHELUKHINNA, E.M.; YUMASHEVA, M.A.;**

**MARENNIKOVA, S.S.** (1966) The aetiology of certain smallpox-like infections in cattle and methods of differentiating vaccinia, cowpox and swinepox viruses.

*J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* v. 10, p. 202-209.

**MATHEW, T.** (1967) Virus study of pock disease among buffaloes. *Indian J*

*Pathol Bacteriol.* v. 10, p. 101-102.

**MATTA, A.D.; SANTOS, C.V.B.; PEREIRA, H.S.; FRUGULHETTI, I.C.P.P.;**

**OLIVEIRA, M.R.P.; SOUZA, M.C.B.V.; MOUSSATCHÉ, N.; FERREIRA, V.F.**

(1999) Synthesis of Novel Nucleosides of 4-Oxoquinoline-3-carboxylic Acid Analogues. *Heteroatom Chemistry.* v. 10, n. 3, p. 197-201.

**MESQUITA, J.A.; SCHATZMAYR, H.G.;** (1969) Estudos laboratoriais de

infecções humanas e de bovinos com vírus do grupo Pox. *Rev Soc Bras Med*

*Trop.* v. 3, p. 171-175.

**MEYER, H.; SCHAY, C.; MAHNEL, H.; PFEFFER, M.** (1999) Characterization

of orthopoxviruses isolated from man and animals in Germany. *Arch Virol.* v.

144, p. 491-501.

**MOSMANN, T.** (1983) Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and

Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Meth.,*

v. 65, p. 55-63.

**MOSS, B.** (2001) *Poxviridae: the viruses and their replication*. In:\_\_\_\_\_. *Fields Virology*. 4<sup>th</sup>edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p. 2849-2883.

**MOYER, RW.** (2005) *Smallpox in human history*. In:\_\_\_\_\_. Orthopoxviruses pathogenic for humans. *New York: Springer Science*, p. 1-10.

**MULLIS, K.B.** (1990) Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin*. v. 48, n. 8, p. 579-582.

**NAGASSE-SUGAHARA, T.K.; KISIELIUS, J.J.; UEDA-ITO, M.; CURTI, S.P.; FIGUEIREDO, C.A.; CRUZ, A.S.; SILVA, M.M.; RAMOS, C.H.; SILVA, M.C.; SAKURAI, T.; SALLES-GOMES, L.F.** (2004) Human vaccinia-like virus outbreaks in São Paulo and Goiás States, Brazil: virus detection, isolation and identification. *Rev Inst Med Trop*. v. 46, n. 6, p. 315-322.

**NAKANO, J.H. e ESPOSITO, J.J.** (1989) Poxviruses. In "Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections" (N.J. SCHMIDT AND R.W. EMMONS, Eds.). *Am. Public Health Assoc.*, Washington, DC. p. 224-265.

**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 immune deficiency (SCID) mice. *J Med Virol*. v. 41, p. 242-246.

**PAROLIN, C.; GATTO, B.; DEL VECCHIO, C.; PECERE, T.; TRAMONTANO, E.; CECCHETTI, V.; FRAVOLINI, A.; MASIERO, S.; PALUMBO, M.; PALÙ, G.** (2003) New Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 6-Aminoquinolones: Mechanism of Action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 47, n. 3, p. 889-896.

**REED, J. e MUENCH, M.** (1938) A simple method of estimating 50% endpoints. *American Journal Virology*. v. 27, p. 492-497.

**REGNERY, R.L.** (2007) Poxviruses and the passive quest for novel hosts. [Curr Top Microbiol Immunol](#). v.315, p. 345-361.

**RICHTER, S.; PAROLIN, C.; GATTO, B.; DEL VECCHIO, C.; BROCCA-COFANO, E.; FRAVOLINI, A.; PALÙ, G.; PALUMBO, M.** (2004) Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat-*trans*-Activation-Responsive Region Interaction by an Antiviral Quinolone Derivative. *American Society for Microbiology*. v. 48, n. 5, p. 1895-1899.

**ROPP, S.L.; JIN, Q.I.; KNIGHT, J.C.; MASSUNG, R.F.; ESPOSITO, J.J.** (1995) PCR strategy for identification and differentiation of smallpox and other orthopoxviruses. *J. Clin. Microbiol.* v. 33, n. 8, p. 2069-2076.

**RUFFER, MA.** (1921) *Studies in the Palaeopathology of Egypt*. Moodie RL ed., University of Chicago Press, Chicago.

**SAFRIN, S.; CHERRINGTON, J.; JAFFE, H.S.** (1997) Clinical uses of cidofovir. *Rev Med Virol.* v. 7, p. 145-156.

**SANDVIK, T.; TRYLAND, M.; HANSEN, H.; MEHL, R.; MOENS, U.; OLSVIK, Ø.; TRAAVIK, T.** (1998) Naturally occurring orthopoxviruses: potential for recombination with vaccine vectors. *Journal of Clinical Microbiology.* v. 36, p. 2542-2547.

**SCHATZMAYR, H.G.; COSTA, E.A.** (2005) Poxvirus. *In:* JR Coura (ed.) *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*, Editora Guanabara, Rio de Janeiro, Chapter. v. 169, p. 1936-1944.

**SCHATZMAYR, H.G.; LEMOS, E.R.; MAZUR, C.; SCHUBACH, A.; MAJEROWICZ, S.; ROZENTAL, T.; SCHUBACH, M.C.; BUSTAMANTE, M.C.; BARTH, O.M.** (2000) Detection of poxviruses associated with human cases in the state of Rio de Janeiro: a preliminary report. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. 95, p. 625–627.

**SCHATZMAYR, H.G.; ROMIJIN, P.C.; BARRETO, D.F.; SILVA, E.E.; FARIAS-FILHO, J.C.; TAVARES, A.F.A.; BARTH, O.M.** (2005) An outbreak of vesicopustular disease in humans and dairy cattle in the state of Rio de Janeiro. *Virus Rev Res.* v. 10, p. 61-63.

**SCUDIERO, D.A.; SHOEMAKER, R.H.; PAULL, K.D.; MONKS, A.; TIERNEY, S.; NOFZIGER, T.H.; CURRENS, M.J.; SENIFF, D.; BOYD, M.R.** (1988) Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug

sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1, v. 48, n. 17, p. 4827-33.

**SHCHELKUNOV, S.N.; MARENNIKOVA, S.S.; MOYER, R.W.** (2005) *Classification of poxviruses and brief characterization of the genus Orthopoxvirus*. In:\_\_\_\_\_. Orthopoxviruses pathogenic for humans. New York: Springer Science, p. 11-18.

**SIMONETTI, B.R.; ABREU, D.C.; SIMONETTI, J.P.; GONÇALVES, M.C.R.; SILVA, M.E.V.; BARTH, O.M.; SCHATZMAYR, H.G.** (2007) Animal infections by vaccinia-like viruses in the State of Rio de Janeiro: 1- northwestern region. *Virus Reviews & Research.* v. 12, n. 1-2, p. 32-36.

**SMEE, D.F.; BAILEY, K.W., WONG, M.H.; SIDWELL, R.W.** (2000) Intranasal treatment of cowpox virus respiratory infections in mice with cidofovir. *Antiviral Res.* v. 47, p. 171-177.

**SMEE, D.F.; BAILEY, K.W.; SIDWELL, R.W.** (2002) Treatment of lethal cowpox virus respiratory infections in mice with 2-amino-7-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl] purine and its orally active diacetate ester prodrug. *Antiviral Res.* v. 54, p. 113-120.

**SMEE, D.F.; BAILEY, K.W.;** (2001) Treatment of lethal vaccinia virus respiratory infections in mice with cidofovir. *Antivir Chem Chemother.* v. 12, p. 71-76.

**SMEE, D.F.; SIDWELL, R.W.; KEFAUVER, D.; BRAY, M.; HUGGINS, W.** (2002) Characterization of Wild-Type and Cidofovir-Resistant Strains of Camelpox, Cowpox, Monkeypox, and Vaccinia Viruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 46, n. 5, p. 1329-1335.

**STEVENS, M.; POLLICITA, M.; PANNECOUQUE, C.; VERBEKEN, E.; TABARRINI, O.; CECCHETTI, V.; AQUARO, S.; PERNO, C.F.; FRAVOLINI, A.; DE CLERCQ, E.; SCHOLS, D.; BALZARINI, J.** (2007) Novel In Vivo Model for the Study of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transcription Inhibitors: Evaluation of New 6-Desfluoroquinolone Derivatives. *American Society for Microbiology*. v. 51, n. 4, p. 1407-1413.

**TOPCIU, V.I.; LUCA, I.; MOLDOVAN, E.; STOIANOVICI, V.; PLAVOSIN, L.; MILIN, D.; WELTER, E.** (1976) Transmission of vaccinia virus from vaccinated milkers to cattle. *Rev Roum Med Virol*. v. 27, p. 279-282.

**TORRES, T.S.; MACEDO, W.P.; PEDROSA, L.F.; SOUZA, M.C.B.V.; FERREIRA, V.F.; CUNHA, A.C.; FOGEL, T.; SANTOS, F.C.; MARQUES, I.P.; PAIXÃO, I.C.P.** (2008) Synthesis and Anti-HSV-1 *In Vitro* Activity of New Phosphoramidates with 4-oxoquinoline and Phtalimidic Nuclei. *Letters in Organic Chemistry*. v. 5, p. 644-650.

**TRINDADE, G.S.; FONSECA, F.G.; MARQUES, J.T.; DINIZ, S.; LEITE, J.A.; BODT, S.; PEER, Y.V.; BONJARDIM, C.A.; FERREIRA, P.C.P.; KROON, E.G.** (2004) Belo Horizonte virus: a vaccinia-like virus lacking the A-type inclusion

body gene isolated from infected mice. *Journal of General Virology*. v. 85, p. 2015-2021.

**TRINDADE, G.S.; FONSECA, F.G.; MARQUES, J.T.; NOGUEIRA, M.L.; MENDES, L.C.; BORGES, A.S.; PEIRO, J.R.; PITUCO, E.M.; BONJARDIM, C.A.; FERREIRA, P.C.; KROON, E.G.** (2003) Araçatuba virus: a vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle. *Emerg Infect Dis*. v. 9, n. 2, p. 155-160.

**VIGNE, S.; DURAFFOUR, S.; ANDREI, G.; SNOECK, R. ; GARIN, D. ; CRANCE, JM.** (2009) Inhibition of vaccinia virus replication by two siRNAs targeting B1R and G7L genes and their synergistic combination with cidofovir. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Mar 23 [Epub ahead of print].

**WILLIAMS-AZIZ, S.L.; HARTLINE, C.B.; HARDEN, E.A.; DAILY, S.L.; PRICHARD, M.N.; KUSHNER, N.L.; BEADLE, J.R.; WAN, W.B.; HOSTETLER, K.Y.; KERN, E.R.** (2005) Comparative Activities of Lipid Esters of Cidofovir and Cyclic Cidofovir against Replication of Herpesviruses In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 49, n. 9, p. 3724-3733.

## PRODUÇÃO VINCULADA À LINHA DE PESQUISA

- **SIMONETTI, B. R., ABREU, D.C., SIMONETTI, J.P., GONÇALVES, M.C.R., SILVA, M.E.V., BARTH, O.M., SCHATZMAYR, H.G.** (2007) Animal infections by vaccinia-like viruses in the state of Rio de Janeiro: 1- Northwestern region. *Virus Reviews and Research.* , v.12, p.32 - 36.  
*Palavras-chave: Agentes Emergentes e Reemergentes, PCR, Poxvírus*
- **COSTA, E.V., SIMONETTI, B. R., ABREU, D.C., SIMONETTI, J.P., GONÇALVES, M.C.R., SILVA, M.E.V., BRUST LAC, BARTH, O.M., SCHATZMAYR, H.G.** (2007) Animal infections by vaccinia-like viruses in the state of Rio de Janeiro: 2 - Paraiba river valley. *Virus Reviews and Research.* , v.12, p.37 - 42.  
*Palavras-chave: Agentes Emergentes e Reemergentes, Poxvírus, PCR*
- Schatzmayr, H.G., Costa, R.V.C., SIMONETTI, B. R., Simonetti, J.P., Gonçalves, M.C.R., Farias-Filho, J.C., Barth, O.M. Human and animal infections caused by **Orthopoxvirus in Middle Paraiba River region in state of Rio de Janeiro, 2007.** (Apresentação de Trabalho)  
*Palavras-chave: Agentes Emergentes e Reemergentes, Víroses, Poxvírus*  
*Local: Armação dos Búzios; Cidade: Rio de Janeiro; Evento: XVIII Encontro Nacional de Virologia; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal Fluminense*
- Schatzmayr, H.G., Abreu, D.C., SIMONETTI, B. R., Simonetti, J.P., Simonetti, S.R.R., Rocha, M.G., Silva, M.E.V., Barth, O.M. **Orthopoxvirus infections in the period 1999-2007, in countries of the Northern Region of the state of Rio de Janeiro, 2007.** (Apresentação de Trabalho)  
*Palavras-chave: Agentes Emergentes e Reemergentes, Poxvírus, Víroses, PCR*  
*Local: Armação dos Búzios; Cidade: Rio de Janeiro; Evento: XVIII Encontro Nacional de Virologia; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal Fluminense*
- Conferencista no(a) **Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital dos Servidores do Estado, 2008.** *Orthopoxvirus: vírus Cantagalo - Uma zoonose em expansão.*
- Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIX Encontro Nacional de Virologia, 2008.** Vaccinia-like viruses animal infections in the state of Rio de Janeiro and the effects of new oxoquinolone derivatives in viral replication.
- Ouvinte no **2º Congresso da CPLP sobre DST - AIDS, 2008.**
- Ouvinte no **I mini-simpósio de Neurociências da UFF, 2008.**

- Apresentação de Poster / Painel no **XVIII Encontro Nacional de Virologia**, 2007. Human and animal infections caused by Orthopoxvirus in Middle Paraíba River region in state of Rio de Janeiro.
- Apresentação de Poster / Painel no **XVIII Encontro Nacional de Virologia**, 2007. Orthopoxvirus infections in the period 1999-2007, in countries of the Northern Region of the state of Rio de Janeiro.

# 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](#)