

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-*Vaccinia virus* E  
AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO DE CÉLULAS VERO.**

**INAREI JOSÉ PAULINI JÚNIOR**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO - UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
DEZEMBRO – 2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-*Vaccinia virus* E  
AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO DE CÉLULAS Vero.**

**INAREI JOSÉ PAULINI JÚNIOR**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO - UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
DEZEMBRO – 2009**

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-*Vaccinia virus* E  
AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO DE CÉLULAS Vero.**

**INAREI JOSÉ PAULINI JÚNIOR**

**Dissertação apresentada ao Centro de  
Biociências e Biotecnologia da  
Universidade Estadual do Norte  
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte  
das exigências para obtenção do título  
de Mestre em Biociências e  
Biotecnologia.**

**Orientador: Milton M. Kanashiro  
Co Orientador: Carlos Eurico Pires Ferreira Travassos  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
DEZEMBRO – 2009**

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-*Vaccinia virus* E  
AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO VIRAL POR CÉLULAS Vero .**

**INAREI JOSÉ PAULINI JÚNIOR**

**Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.**

Aprovada em / /  
Comissão Examinadora

---

Dr. Andrea C. Veto Arnholdt (Doutora em Biociências e Biotecnologia)  
LBCT/UENF

---

Dr. Olney Vieira da Motta (Doutor em Biociências e Biotecnologia)  
LSA/UENF

---

Dr. Maurício Afonso Vericimo (Doutor em Biociências e Biotecnologia) IB/UFF

---

Dr. Milton Masahiko Kanashiro .(Doutor em Biociências e Biotecnologia).  
LBR/UENF (Orientador)

**“Algo só é impossível até que alguém  
duvide e prove o contrário.”**

**Albert Einstein**

**Dedico este trabalho com amor aos Meus pais, Inarei J. Paulini e Diunea M. Lorencini Paulini e a minha irmã Marlilia pelo imenso apoio e carinho que me deram ao longo de toda minha vida.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por esta oportunidade de trabalho, pela qual me permitiu exercitar e aprimorar a paciência, a tolerância e a autoconfiança. Obrigado, Senhor, por tudo o que vós tens dado até hoje e por todos em minha vida.

À minha família por me ensinar o verdadeiro sentido da dignidade, honestidade e responsabilidade de um ser humano, mostrando-me sempre o caminho correto a ser seguido: a luta diária pelos objetivos, ética, perseverança e confiança.

Ao professor Milton (LBR) pela orientação, que ajudou-me tanto no andamento dos experimentos, tendo muita paciência e pronto a me ajudar quando precisei. Obrigado pelos ensinamentos, sem os quais esse trabalho não se concretizaria. Todo o meu respeito, confiança e admiração!

Ao meu co-orientador Carlos Eurico (LSA), pelo apoio e estímulo, não medindo esforços para me ajudar. Obrigado pela paciência, pela maneira agradável e confiante de incentivar o andamento desse trabalho.

À Claudia M. Almeida (LSA) obrigado por tantos ensinamentos, pelo apoio, pelas palavras de confiança e opiniões dadas, sendo muito importante para execução e andamento desse trabalho.

Aos amigos do LBR, que tantas vezes recorri... Rita, Juliana (Juju), Claudinha, Tiago, Franz, Marcelle, Marcela, Liliani, Alba, Fernando, Seu Jorge, Rosângela, Patrícia e principalmente a Núbia que me ajudou muito com a cultura de células.

Agradecimento especial ao Dirlei (ex-aluno LSA) e André Tavares (LSA) pelo incentivo no trabalho com poxvírus, pelos conselhos, sugestões e atenção que me dedicaram.

Aos professores José Nelson, Alba e Vinicius do setor de Virologia CCS-UFRJ que permitiram a utilização do Microscópio Eletrônico.

A Professora Nadir, Beatriz Ferreira, Giovana e todos do PAM-LBCT-UENF pelo auxílio na obtenção das imagens de Microscopia Eletrônica.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e ao Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB), por disponibilizar este curso.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho.

## ÍNDICE

Lista de Figuras.....	IX
Lista de Quadros.....	XI
Lista de Abreviaturas.....	XII
Resumo.....	XIII
Abstract .....	XIV
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Poxviroses - Histórico.....	4
2.2. Família Poxviridae.....	6
2.2.1 Classificação .....	7
2.3. Estrutura e composição dos <i>Poxvírus</i> .....	10
2.4. Replicação dos <i>Poxvírus</i> .....	13
2.5. Mecanismos de evasão dos <i>Poxvirus</i> .....	17
2.6. Aspectos Imunológicos das Infecções causadas por <i>Poxvirus</i> .....	18
2.7. Doença causada pelo <i>Vaccinia virus</i> .....	20
2.8. Origem dos Poxvirus .....	21
2.9 O vírus da Varíola como arma biológica.....	22
2.10 Poxvirose - Importância Econômica.....	23
2.11 <i>Cantagalo virus, Araçatuba virus e Passatempo virus</i> .....	25
2.12 Anticorpos Monoclonais.....	25
2.12.1 Aplicação dos Anticorpos Monoclonais.....	29
2.12.2 Imunodiagnóstico.....	30
3. OBJETIVOS.....	31
4. JUSTIFICATIVA.....	31
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	34
5.1. Vírus.....	35
5.1.1 <i>Orthopoxvírus</i> .....	35

5.2 Animais.....	35
5.3 Multiplicação viral em células Vero .....	35
5.4 Multiplicação viral em membrana corioalantóide de ovos embrionados.....	36
5.5 Inativação de <i>Vaccinia virus WR</i> .....	36
5.6 Microquantificação de Proteínas em microplacas pelo Método do Ácido Bicinconínico (BCA). .....	37
5.7 Concentração de <i>Vaccinia Vírus WR</i> .....	37
5.8 Titulação Viral - <i>Vaccinia virus WR</i> .....	37
5.9 SDS-PAGE do concentrado de <i>Vaccinia Vírus WR</i> .....	38
5.10 Imunização de Camundongos Balb/c .....	38
5.11 Produção de Anticorpos Monoclonais.....	39
5.12 Seleção de Hibridomas Positivos .....	40
5.13 Clonagem dos Hibridomas .....	40
5.14 Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	41
6.RESULTADOS.....	43
6.1 Multiplicação Viral .....	44
6.2 Gel SDS-PAGE .....	44
6.3 Titulação Viral .....	50
6.4 Produção de Anticorpos Monoclonais .....	51
6.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	53
7. DISCUSSÃO .....	62
8. CONCLUSÕES.....	72
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Micrografia eletrônica do <i>Orthopoxvirus</i> e <i>Parapoxvirus</i> .....	12
Figura 2 - Diagrama da estrutura do vírion dos gêneros <i>Orthopoxvirus</i> e <i>Parapoxvirus</i> ..	12
Figura 3 - Ciclo de replicação do <i>Vaccinia virus</i> .....	14
Figura 4 - Micrografia da entrada de VACV WR por fusão da membrana celular.....	16
Figura 5 - (A) Células Vero não infectadas por <i>Vaccinia Vírus WR</i> . (B) Células Vero em monocamada foram infectadas com purificado viral de <i>Vaccinia Virus WR</i> . Visualização ao Microscópio Óptico Invertido Axiovert aumento 100X.....	45
Figura 6 – Procedimento para retirada de Membrana Corioalantóide infectada com VACV WR. Membrana Corioalantóide de ovo embrionado infectada com VACV WR. Lesão característica de infecção “pocks” .....	47
Figura 7 - Gel SDS-PAGE 10% corado pelo nitrato de prata. P – padrão peso molecular, 1. Purificado <i>Vaccinia virus</i> cepa <i>WR</i> , 2.Purificado <i>Vaccinia virus</i> BH,3 e 4 <i>Vaccinia virus</i> cepa <i>WR</i> clarificado.....	48
Figura 8 - Gel SDS-PAGE a 10% corado pelo nitrato de prata. PM – padrão peso molecular; 1 e 2 Sobrenadante de células Vero infectadas, 3 a 6 Concentrado <i>Vaccinia virus</i> cepa <i>WR</i> .....	48
Figura 9 - (a) Células Vero não-infectadas após 48h (b) Células Vero infectadas por VACV WR após 48h.....	49
Figura 10 - Titulação de VACV WR por diluição em série com formação de placas de lise coradas com Cristal Violeta.....	50
Figura 11 – Teste de ELISA com objetivo de analisar a presença de anticorpos anti- <i>Vaccinia virus WR</i> no soro dos camundongos imunizados.....	51
Figura 12 - (A) Célula Vero Controle – 48h – Citoplasma levemente granular . Núcleo . Cisternas do Golgi pouco desenvolvidas espaçamento entre as cristas. (B) Célula Vero	

Controle – 48h – Mitocôndrias com grande espaçamento entre as cristas .....	54
Figura 13 – Células Vero 6 horas de infecção .....	55
Figura 14 – (A) Células Vero 24 horas de infecção .(B) Estrutura sugestiva de partícula viral imatura e nucleoproteína densa .....	56
Figura 15 – (A) Células Vero 30 horas de infecção (B) Células Vero 30 horas de infecção complexo de Golgi nesta fase da infecção já recuperou o aspecto observado nas células controle.....	57
Figura 16 – (A)Células Vero 36 horas de infecção (B) Partículas virais maduras já podem ser observadas no citoplasma.....	58
Figura 17 - (A) 42 horas de infecção – Observa-se um aumento na quantidade de partículas virais maduras no citoplasma . (B) 42 horas de infecção – As células começam a apresentar citoplasma com grandes espaços vazios sugerindo início de degeneração celular e observa-se partículas virais maduras sendo liberadas no meio extracelular .....	60
Figura 18 – 48 horas de infecção – o citoplasma das células torna-se eletróluscente, sugerindo estágio avançado de degeneração celular.....	61

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Estrutura Taxonômica da família <i>Poxviridae</i> . .....	8
QUADRO 2 - Gênero <i>Orthopoxvirus</i> : Vírus, abreviações, hospedeiros e distribuição geográfica.....	9
QUADRO 3 - Gênero <i>Parapoxvirus</i> : Vírus, abreviações, hospedeiros e distribuição geográfica.....	10
QUADRO 4 - Família <i>Poxviridae</i> : Morfologia e tamanho do genoma.....	11
Quadro 5 - Hibridomas descongelados e seguidamente clonados e testados por ELISA.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ATI** – Corpúsculo de Inclusão do tipo acidofílico

**CTL** – Célula T citolítica

**DNA** – Ácido desoxirribonucléico

**ECP** – Efeito citopático

**ELISA** - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

**HAT** – Hipoxantina, Aminopterina e Timidina

**HI** – Inibição da hemaglutinação

**IF** – Imunofluorescência

**MHC** – Complexo Principal de Histocompatibilidade

**NK** – Natural killer

**PBS** – Tampão salina fosfato

**PBST** – Tampão salina fosfato Tween 20

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase

**PEG** – Polietilenoglicol

**P.F.U** – Unidades formadoras de placa

**OPD** – ortofenildiamina

**RNA** – Ácido ribonucléico

**SN** – Soroneutralização

**SDS – PAGE** – Sodium dodecyl sulfate polyacrilamylde gel electroforesis

**TK** – Timidina quinase

**VACV** – *Vaccinia vírus*

**VARV** – *Variola vírus*

**Vero** – Células fibroblastóides de rim de macaco verde africano

**WR** – Western reserve

## Resumo

O *Vaccinia virus* (VACV) bovino pertence à família Poxviridae que consiste num grupo de vírus DNA dupla fita, de morfologia semelhante e que se replica inteiramente no citoplasma de células hospedeiras. A doença ocasionada pela infecção de um indivíduo com VACV é denominada poxvirose. É uma doença exantemática emergente e tem ocorrido frequentemente nos últimos 10 anos no Brasil.

Multiplicação de VACV WR (*Western Reserv*) em monocamada de células Vero produziu Efeito Citopático (fusão de membranas, sincícios e vacúolos) em aproximadamente 90% dessas células. A fusão de células de mieloma A2 com células esplênicas de camundongos Balb/c foi satisfatória, sendo que de quase 400 poços testados por ELISA, apenas 59 foram considerados positivos. Desses, 12 foram sequencialmente clonados e os outros foram congelados. Seguidamente, os hibridomas foram descongelados e clonados por diluição limitante para obtenção de um clone único e específico para o reconhecimento de VACV. No entanto, nenhum dos clones obtidos foi capaz de produzir anticorpos que reconhecessem especificamente VACV WR neste contexto experimental. Células Vero em monocamada foram fixadas em intervalos de tempo de 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 horas pós – infecção com VACV WR, em seguida, as células foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Análises de micrografias eletrônicas de células Vero incubadas com o vírus em diferentes intervalos de tempo, nos permitiu evidenciar detalhadamente o efeito citopático, a dinâmica dos distúrbios metabólicos celulares e o ciclo replicativo viral até a formação da partícula viral extracelular.

Palavras-Chave : poxvirose, *orthopoxvirus*, anticorpos monoclonais.

## Abstract

Vaccinia virus (VACV) cattle belongs to the Poxviridae family which is a group of double-stranded DNA virus, with morphological similarity and their replication occur entirely in the cytoplasm of host cells. The disease caused by infection of an individual with VACV is called poxvirosis. It is a rash emerging illness that has been occurring, frequently, in the last 10 years in Brazil.

Multiplication of VACV WR monolayer of Vero cells produced cytopathic effect of approximately 90% of these cells. The fusion between myeloma cells A2 and spleen cells from Balb/c immunized mice, where from evaluated 400 wells by ELISA, of them 59 were considered positive. From these 59 positive wells, 12 were sequentially cloned and the others were kept frozen. Subsequently, the hybridomas were thawed and cloned by limiting dilution to obtain a single clone able to recognize specifically VACV. However, none of the clones obtained was able to produce antibodies that specifically recognize VACV WR in this experimental context. Vero cells in monolayer were incubated with Vaccinia virus WR at intervals of 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 and 48 hours post - infection, and then cells were fixed and processed for transmission electron microscopy. Analysis of Vero cells infected at different time intervals by electronic micrograph, allowed us to observe in detail the citopathic effect, the dynamic of metabolical and cellular viral replicative cycle until the formation of extracellular viral particle.

keywords: poxviruses, *orthopoxvirus*, monoclonal antibodies.

# **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

As poxviroses são doenças causadas por vírus da família *Poxviridae*, que acometem o homem e os animais. Os vírus DNA classificados na família *Poxviridae* são os maiores e mais complexos vírus conhecidos, os quais se replicam no citoplasma de células de hospedeiros vertebrados e invertebrados. Seu genoma de DNA dupla fita consiste de aproximadamente 270 mil pares de nucleotídeos. A partir das primeiras décadas do século XX houve os primeiros registros de poxviroses no Brasil, a partir de então, estudos foram sendo realizados para identificação e caracterização do agente viral. Nos últimos anos, inúmeros casos de doença pústulo-vesicular ocorreram em diversas fazendas nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais acometendo o gado bovino leiteiro e pessoas, principalmente ordenhadores e seus familiares. Esses surtos que ocorreram nos últimos anos na região sudeste vêm causando grandes prejuízos econômicos, principalmente no que diz respeito à produção de leite, onde em algumas propriedades 100% dos bovinos foram acometidos. As técnicas de diagnóstico utilizadas são variadas, como por exemplo, microscopia eletrônica, PCR, ELISA, dentre outras. O presente trabalho tem como objetivo a produção de Anticorpos Monoclonais anti-*Vaccinia virus* com a finalidade de padronização de um Kit imunodiagnóstico por ELISA *sandwich* com a finalidade de se detectar possíveis animais silvestres reservatórios, gado bovino e seres humanos acometidos.

**REVISÃO**  
**DE**  
**LITERATURA**

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Poxvíroses - Histórico

As poxvíroses são doenças causadas por vírus da família Poxviridae, que acometem o homem e os animais. Tipicamente, ocorre nas poxvíroses a presença de lesões difusas na pele e mucosas que progridem de máculas para pápulas, vesículas e pústulas antes de formar crostas e cicatrizar (ACHA e SZYFRES, 1986).

A varíola, poxvírose mais conhecida, foi descrita pela primeira vez na China, em 1122 a.C. Também foram encontrados relatos de varíola em antigos textos indianos em manuscritos e existem evidências de que o faraó egípcio Ramsés V, morto por volta de 1156 a.C., foi portador da infecção. O vírus da varíola foi pela primeira vez assim designado no ano 570 d.C por Bishop Marius de Avenches, na Suíça. A palavra “ varíola” deriva do latim, *varius* ou *varus* que significa bexigas (Sowers, 2002). Esta doença afetou em muito o desenvolvimento de civilizações ocidentais e foi uma das grandes pragas ultrapassando, a peste negra, a cólera e a febre-amarela, no seu impacto. Foi também a causadora da queda de alguns impérios. O vírus da varíola parece ter evoluído a partir de um poxvírus animal há cerca de 10.000 anos nas florestas tropicais da África Central (SOWERS, 2002). Com o crescimento da agricultura no nordeste africano - Egito e Mesopotâmia - por volta do ano 9000 a.C. houve uma aglomeração das populações humanas, o que permitiu a transmissão da doença de pessoa para pessoa, sendo mais tarde levada por mercadores para a Índia, Ásia e Europa.

Edward Jenner (1749-1823), médico e naturalista inglês ficou imortalizado pela descoberta da vacinação contra a varíola. Jenner desenvolveu a sua prática médica no interior da Inglaterra onde teve a oportunidade de lidar com pessoas afetadas por uma doença benigna, transmitida pelas vacas, mas que apresentava algumas semelhanças com a varíola, a “pústula do vaqueiro”. Acreditava-se naquela região, que quem tivesse contraído a tal doença das vacas passava a ficar imune à

varíola (HENDERSON et. al, 1999). Jenner começou a investigar sistematicamente a doença “pústula do vaqueiro”. Em 1796, ele extraiu material da pústula de uma das mãos de uma trabalhadora de uma fazenda e infectou um rapaz de nome James Phipps. Após a doença ter seguido o seu curso, Jenner inoculou-o com material infeccioso de varíola e esperou pelo desenrolar dos acontecimentos. James Phipps não desenvolveu quaisquer sintomas de varíola. A experiência foi bem sucedida (Sowers, 2002). A vacinação utilizando fluído das pústulas da "varíola bovina" espalhou-se rapidamente. Chegou à maioria dos países europeus por volta do ano 1800 e a partir de então, cerca de 100 000 pessoas foram vacinadas na Grã-Bretanha.

No Brasil, a varíola foi introduzida pelos colonizadores e escravos no século 16 e em 1563 foi registrada a primeira epidemia na Ilha de Itaparica, na Bahia, de onde se espalhou para o resto do país. Em 1804, foram iniciadas as campanhas de combate à virose, com a aplicação da vacina jeneriana. A Campanha Nacional Contra a Varíola, criada em 1962, pelo Ministério da Saúde, não obteve resultados expressivos e a média anual de casos mantinha-se elevada, em torno de 3 mil, sendo que 80% dos doentes encontravam-se na faixa etária abaixo de 15 anos. O Programa de Erradicação Global da Varíola, iniciada pela Organização Mundial de Saúde em 1966, constituiu um importante passo para o controle da doença. O programa constituía em realizar vacinações em massa por todo o mundo, permitindo que o número de casos no mundo em cada ano caísse de 50 milhões em 1950, para cerca de 15 milhões em 1967. Na Europa, em 1973, a doença estava erradicada, e apenas subsistiu sob a forma endêmica em 5 países em todo o mundo (Etiópia, Sudão, Paquistão, Bangladesh e Índia). No Brasil, de agosto de 1966 a outubro de 1971, cerca de 88% da população foi imunizada na Campanha de Erradicação da Varíola, sendo que o último registro da doença é de abril de 1971.

O programa foi, portanto, um sucesso e em 1977 registrou-se o último caso natural, na Somália (Bremner & Henderson, 2002) seguido de outro ocorrido em Londres, em 1978, devido a um acidente de laboratório. Em 1980, após inúmeras verificações, a OMS finalmente declarou a doença extinta (Sowers, 2002). Em 1980, a OMS recomendou a todos os institutos que mantinham os estoques de vírus da

varíola, que os destruíssem ou os transferissem para centros colaboradores da OMS, equipados com a segurança adequada. Dos 76 laboratórios identificados como possuidores do vírus em 1980, 74 cumpriram as recomendações da OMS. Atualmente apenas dois laboratórios são conhecidos por reterem o vírus da varíola: os Centros para o Controle e Prevenção das Doenças (CDC) em Atlanta (EUA), e o Centro de Investigação de Virologia e Biotecnologia em Koltsovo (Rússia). Existem algumas especulações de que existam estoques do vírus da varíola adicionais, sem que a OMS tenha conhecimento. A recombinação do vírus com outros patógenos, ou a sua modificação biotecnológica para fins terroristas são hipóteses levantadas por várias entidades, entretanto, a veracidade destes cenários é ainda desconhecida (Drazen, 2002).

## **2.2. Família Poxviridae**

Os vírus DNA classificados na família *Poxviridae* são os maiores e mais complexos vírus conhecidos, os principais gêneros dessa família são os *Orthopoxvirus* e *Parapoxvirus*. A doença pústulo-vesicular típica de *Poxvirus* é conhecida como “varíola” e se caracteriza clinicamente pelo aparecimento de lesões difusas na pele e mucosas. A maioria das lesões contém células com múltiplas inclusões intracitoplasmática denominadas “pocks” que representam o local de replicação viral nas células infectadas (TRIPARTHY *et al.*, 1981, ACHA e SZYFRES, 1986). O distúrbio funcional e estrutural, *in vitro*, visto em células infectadas é denominado efeito citopático (ECP).

A história dos *Poxvírus* está relacionada com o vírus da varíola, o agente etiológico da varíola humana, que acompanhou o homem por muitos séculos causando mortes, lesões graves e irreversíveis (GUIDO e ESPER, 2002). Atualmente, o VARV tem despertado atenção mundial pelo temor de seu uso como arma biológica (SCHATZMAYR, 2001, SILVA, 2001).

Um outro exemplo de *Poxvirus* muito estudado é o *Vaccinia virus*, que vem sendo objeto de estudo intenso como vetor para introdução de genes imunizantes ativos, como vacinas de vírus vivo para uma variedade de doenças em humanos e animais domésticos (BROOKS *et al.*, 2000).

### **2.2.1 Classificação**

A família Poxviridae é subdividida em duas subfamílias, com base no espectro dos hospedeiros vertebrados ou insetos: Chordopoxvirinae (poxvíroses de vertebrados) e Entomopoxvirinae (poxvíroses de insetos) (Quadro 1).

A subfamília Chordopoxvirinae é subdividida em oito (08) gêneros (*Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Molluscipoxvirus* e *Yatapoxvirus*), e os membros de cada gênero exibem uma morfologia e uma gama de hospedeiros semelhantes, bem como alguma relação antigênica. As principais espécies dos gêneros *Orthopoxvirus* e *Parapoxvirus*, bem como seus principais hospedeiros e distribuição geográfica estão apresentadas nos Quadros 2 e 3, respectivamente. Existem outros *Poxvirus* que ainda não estão bem classificados, incluindo os novos vírus, em constante descoberta, como os isolados de lagartos, rãs, cervos, cangurus, entre outros. (MURPHY *et al.*, 1999).

**QUADRO 1 .** Estrutura Taxonômica da família Poxviridae.

<b>Família Poxviridae</b>
<b>Subfamília Chordopoxvirinae</b>
Gênero <i>Orthopoxvirus</i>
Gênero <i>Parapoxvirus</i>
Gênero <i>Avipoxvirus</i>
Gênero <i>Capripoxvirus</i>
Gênero <i>Leporipoxvirus</i>
Gênero <i>Suipoxvirus</i>
Gênero <i>Molluscipoxvirus</i>
Gênero <i>Yatapoxvirus</i>
<b>Subfamília Entomopoxvirinae</b>
Gênero <i>Entomopoxvirus A</i>
Gênero <i>Entomopoxvirus B</i>
Gênero <i>Entomopoxvirus C</i>

(Adapatado de ESPOSITO et al., 2005)

QUADRO 2 . Gênero *Orthopoxvirus*.

Vírus	Abreviação	Principais Hospedeiros	Distribuição Geográfica
<i>Camelpox virus</i>	CMLV	Camelo	Ásia e África
<i>Cowpox virus</i>	CPXV	Bovino, humano, felinos e roedores	Europa e Ásia
<i>Ectromelia virus</i>	ECTV	Camundongos	Europa
<i>Monkeypox virus</i>	MPXV	Macacos, Roedores e Humanos	África
<i>Raccoonpox virus</i>	RCNV	Guaxinins	América do Norte
<i>Taterapox virus</i>	GBLV	Gerbils	África
<i>Vaccinia virus</i>	VACV	Humanos, Bovinos, Búfalos, suíno e Coelhos	Mundial
<i>Buffalopox virus</i>	BPXV	Búfalos, Bovino e Humanos	Índia
<i>Rabbitpox virus</i>	RPXV	Coelhos	EUA e Holanda
<i>Variola virus</i>	VARV	Humanos	Erradicado
<i>Volepox vírus</i>	VPXV	Camundongo da Califórnia	Califórnia
<i>Uasin Gishu vírus</i>	UGV	Cavalos	África

(Adaptado de ESPOSITO *et al.*, 2005)

QUADRO 3. Gênero *Parapoxvirus*.

Vírus	Abreviação	Principais Hospedeiros	Distribuição Geográfica
<i>Orf vírus</i>	ORFV	Ovinos, Caprinos, Humanos	Mundial
<i>Pseudocowpox vírus</i> ou <i>Paravaccinia vírus</i>	PCPV	Bovinos e Humanos	Mundial
<i>Bovine papular stomatitis vírus</i>	BPSV	Bovinos e Humanos	Mundial
<i>Parapoxvirus of red deer in New Zealand</i>	PVNZ	Cervos vermelhos	Nova Zelândia
<i>Auzduk disease vírus</i>	-	Camelo	África e Ásia
<i>Sealpox vírus</i>	-	Focas e Humanos	Mundial

(Adaptado de ESPOSITO et al., 2005).

### 2.3. Estrutura e composição

Os vírions dos *Poxvírus* são os maiores vírus conhecidos segundo as análises de microscopia eletrônica. As aparências das partículas virais variam de acordo com o método de preparação, mas a maioria dos *Poxvírus*, quando observados por microscopia eletrônica, se apresentam como partículas em forma retangular medindo, aproximadamente, 250 X 200 X 200 nm. Em contraste, os vírus do gênero *Parapoxvirus*, *Entomopoxvirus A* e *Entomopoxvirus B* são ovóides e medem aproximadamente 260 X 160 nm, Quadro 4 e Figura 1 (MOSS, 2001).

QUADRO 4. Família Poxviridae.

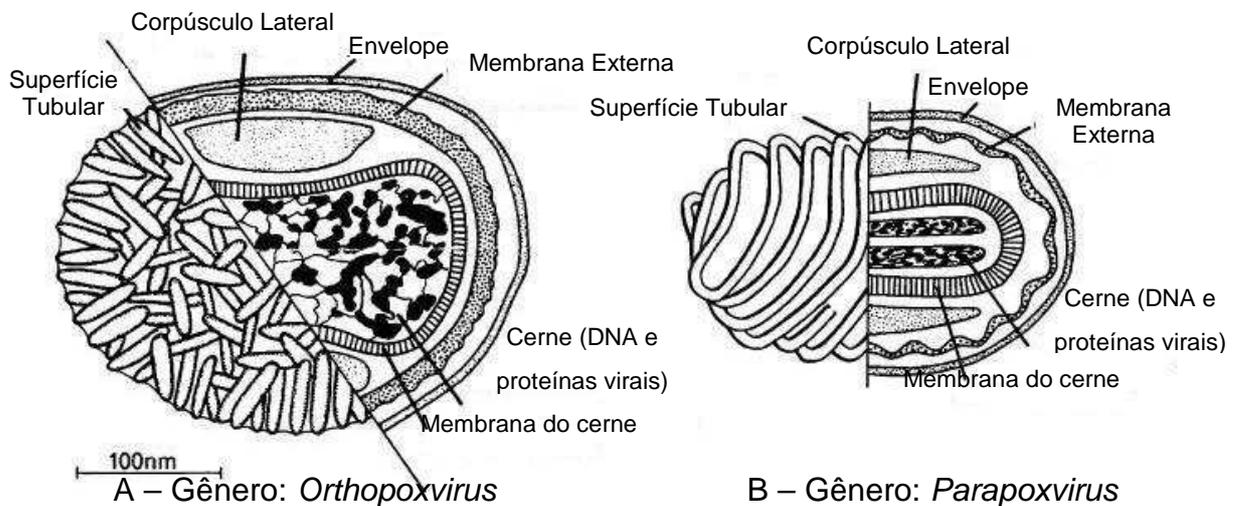
Subfamília	Gênero	Morfologia	Tamanho aproximando Genoma
Chordopoxvirinae	<i>Orthopoxvirus</i>	Retangular	200 Kbp
	<i>Parapoxvirus</i>	Ovóide	140 Kbp
	<i>Avipoxvirus</i>	Retangular	260 Kbp
	<i>Capripoxvirus</i>	Retangular	150 Kbp
	<i>Leporipoxvirus</i>	Retangular	160 Kbp
	<i>Suipoxvirus</i>	Retangular	170 Kbp
	<i>Molluscipoxvirus</i>	Retangular	180 Kbp
	<i>Yatapoxvirus</i>	Retangular	145 Kbp
Entomopoxvirinae	<i>Entomopoxvirus A</i>	Ovóide	260 -370 Kbp
	<i>Entomopoxvirus B</i>	Ovóide	236 Kbp
	<i>Entomopoxvirus C</i>	Retangular	250 -380 Kbp

(Adaptado de MOSS, 2001)



**Figura 1:** Micrografia eletrônica do (A) *Orthopoxvirus* – formato retangular com tamanho em torno de 250x200 nm (B) *Parapoxvirus* – formato ovóide com tamanho de aproximadamente 260x160 nm (SCHATZMAYR *et al.*, 2000)

A estrutura dos *Poxvirus* é complexa e não apresenta simetria icosaédrica ou helicoidal exibida por outros vírus, sendo envelopado por uma dupla membrana lipoprotéica. A maioria dos poxvírus é formada por uma camada externa de estruturas protéicas tubulares, arranjadas irregularmente, conferindo uma aparência característica. Em contraste, os membros do gênero *Parapoxvirus* são cobertos por longos e finos túbulos protéicos que, por causa da superposição desses túbulos, parecem ser arranjados na forma cruzada, assemelhando-se a uma esfera de fios. A parte interior inclui um cerne bicôncavo e dois corpúsculos laterais de natureza desconhecida e contém o DNA viral e diversas proteínas virais (Figura 2). (MURPHY *et al.*, 1999).



**Figura 2:** Diagrama da estrutura do vírion dos gêneros *Orthopoxvirus* e *Parapoxvirus*. (A) *Orthopoxvirus* – Estrutura formada por camada externa de proteínas tubulares, arranjadas irregularmente. O cerne é envolvido por bicamada lipoprotéica (B) *Parapoxvirus* - estrutura externa composta de finos e longos túbulos protéticos, arranjados de forma cruzada. O cerne é envolvido por bicamada lipoprotéica (adaptado de FENNER, 1996).

A composição química dos *Poxvirus* assemelha-se a de uma bactéria. Os principais componentes dos vírions do *Vaccinia virus*, por exemplo, são proteínas, lipídeos e DNA, correspondendo 90%, 5%, 3,2%, respectivamente da composição dos vírions. Algumas das proteínas são glicosiladas ou fosforiladas, sendo os lipídios compostos por colesterol e fosfolipídios (MOSS, 1996).

O cerne contém um grande genoma viral de DNA de filamento linear duplo com tamanho variando de 130–380kbp, rico em bases de adenina e timina, com capacidade de codificar aproximadamente duzentas proteínas, incluindo enzimas envolvidas no processo de síntese do ácido nucléico e componentes estruturais dos vírus. A seqüência completa do genoma é conhecida em vários *Poxvirus*, como o VARV e o VACV (BROOKS *et al.*, 2000).

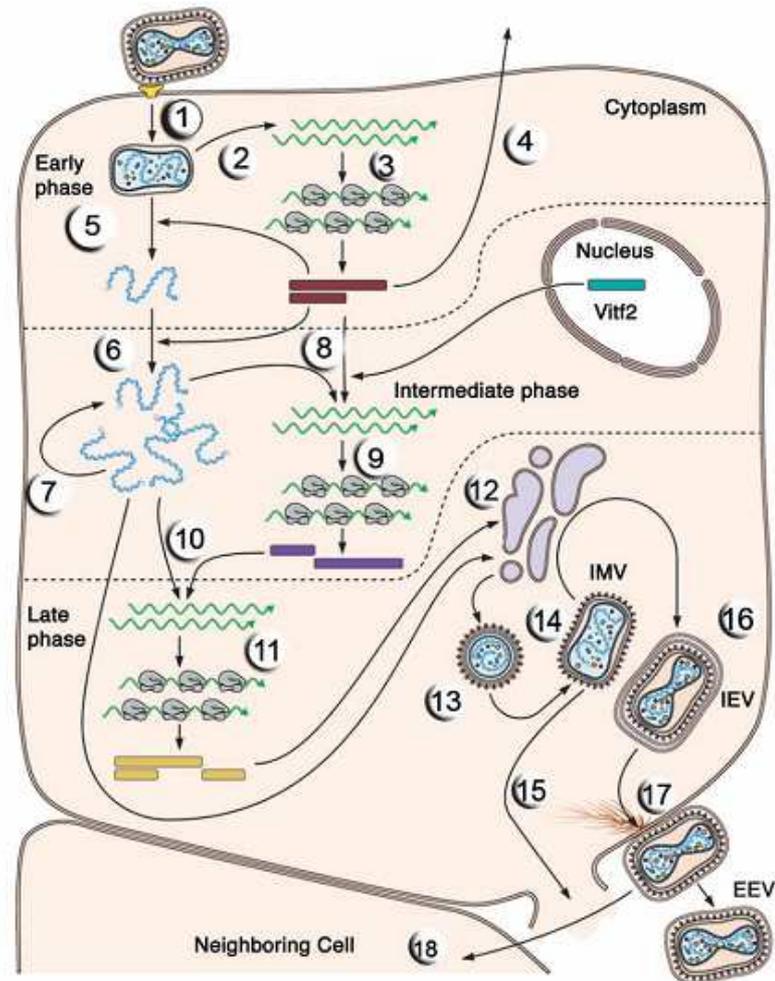
Análises proteômicas de *Vaccinia virus* são amplamente utilizadas para identificar componentes de proteínas que formam variados complexos e que estão

implicados em numerosos processos biológicos. As principais proteínas de *Vaccinia virus* apresentam pesos moleculares de 20, 35, 57 e 66kDa (ICHIHASHI,1994). Em trabalhos anteriores, dependendo da metodologia,o rendimento de uma purificação de *Vaccinia vírus* pode resultar em uma concentração de 1,5mg/mL de proteína (JENSEN,1996). A espectrometria de massa, juntamente com a bioinformática, vêm sendo largamente utilizadas para complementar os métodos bioquímicos tradicionais visando elucidar estruturas virais e suas funções e determinar o número e natureza das proteínas que as compõem.

#### **2.4. Replicação**

Os *Poxvirus* são peculiares entre os vírus DNA, visto que todo ciclo de replicação ocorre no citoplasma das células infectadas. As células infectadas apresentam muitas inclusões intracitoplasmáticas denominadas “pocks”, que representam o local de replicação viral (TRIPARTHY *et al.*, 1981).

O ciclo de replicação dos poxvírus está esquematizado na Figura 3 e descrito abaixo nas alíneas a, b e c, sendo representado pelo *Vaccinia virus*, que é o protótipo dos *Poxvirus* em termos de estrutura e replicação.



**Figura 3:** Ciclo de replicação do *Vaccinia vírus*.

(adaptado de Harrison, 2004)

a) Etapas 1, 2, 3 e 4 - Fixação, penetração e desnudamento do vírus:

A partícula viral estabelece contato com a superfície celular e, a seguir, funde-se com a membrana celular, liberando o cerne no citoplasma. No interior dos *Poxvirus* encontramos a RNA-polimerase viral que transcreve metade do genoma viral em mRNA precoce. Esses mRNAs após serem transcritos no interior do cerne do vírus são liberados no citoplasma da célula. A proteína de “desnudamento” produzida após a infecção viral libera o DNA viral dos cernes, finalizando a primeira parte do ciclo de replicação.

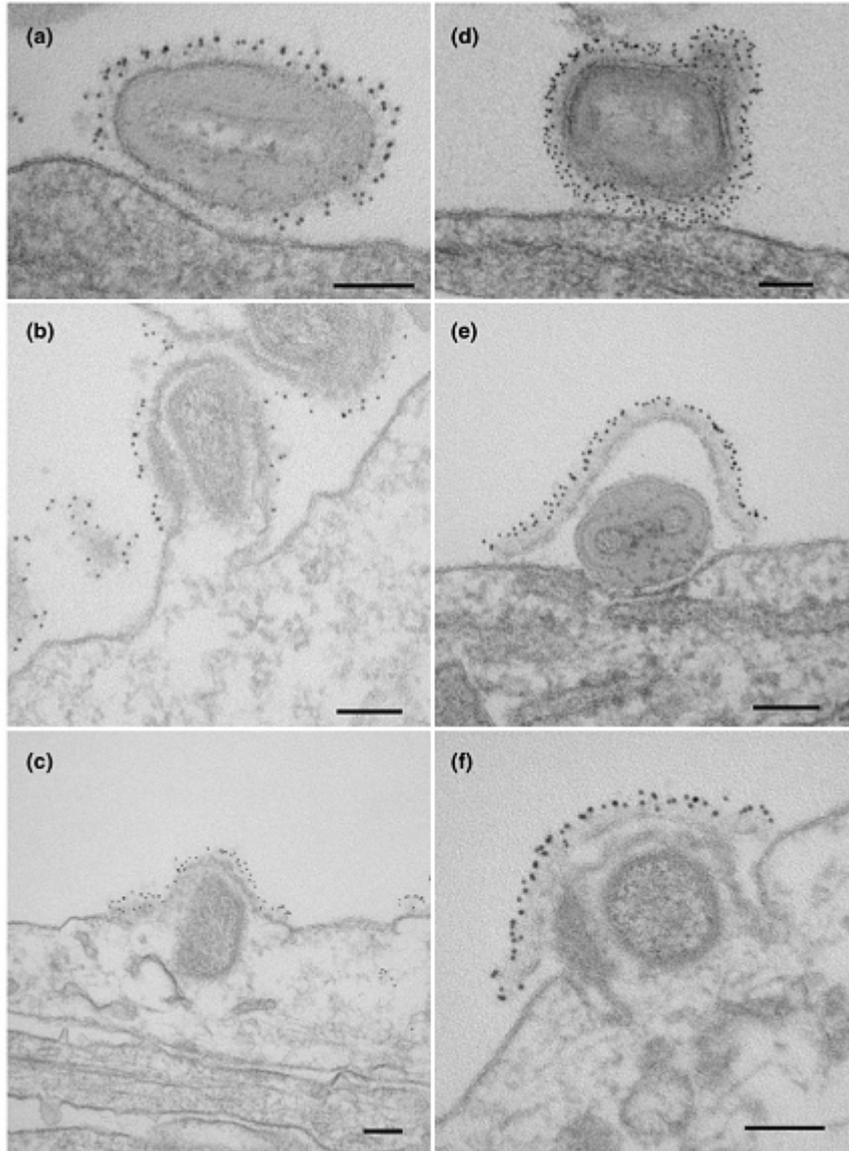
b) Etapas 5, 6 e 7 – Replicação do DNA viral e síntese de proteínas virais:

Entre as proteínas iniciais produzidas após a infecção pelo vírus, destacam-se a DNA-polimerase e a Timidina-quinase que são enzimas envolvidas na replicação viral. A replicação inicia-se logo após o processo de desnudamento, ocorrendo em regiões distintas do citoplasma, que aparecem como “fábricas” ou corpúsculos de inclusão em micrografias eletrônicas. Ocorre a transcrição de mRNAs intermediários cuja expressão precede temporariamente a dos mRNAs viral tardio. O mRNA viral tardio é traduzido em grandes quantidades de proteínas estruturais e em pequenas quantidades de outras proteínas e enzimas virais (BROOKS *et al.*, 2000).

(c) Etapas 8, 9, 10, 11 e 12 - Maturação e liberação:

As proteínas estruturais organizam-se para acondicionar o DNA, formando as partículas virais, chamadas de vírions maduros intracelulares infectivos (IMV), que são transportados pelos microtúbulos até o Complexo de Golgi, onde podem adquirir as membranas do Complexo, formando os vírus envelopados intracelulares (IEV); chegando à periferia da célula, fundem-se com a membrana citoplasmática da célula, resultando na liberação dos vírus envelopados extracelulares (EEV) (MOSS, 1996).

A Figura 4 apresenta imagens de microscopia eletrônica mostrando a entrada de VACV na superfície de uma célula hospedeira:



**Figura 4** : Micrografia da entrada de VACV WR por fusão da membrana celular (ROBERTS *et al.*, 2008). (a) Partículas IMV se ligam a célula hospedeira; (b) A membrana do vírion se funde com a membrana da célula; (c) Entrada da estrutura do Core viral; (d) Partículas EEV (com membrana intacta) se ligam a célula hospedeira ; (e) A membrana da partícula se rompe no ponto de contato habilitando a partícula - agora chamada IMV – a entrar na célula. (f) A interação entre a membrana celular com o vírion possibilita a penetração do Core viral.

## 2.5. Mecanismos de Evasão

Os *Poxvirus* são especialmente adaptados para interferir na resposta imune do hospedeiro. Primeiro, por possuírem um genoma com capacidade de codificar 150 – 200 proteínas, facilitando a codificação de proteínas que interferem na resposta imune do hospedeiro. Segundo, por não dependerem dos mecanismos de transcrição da célula, pois codificam as enzimas e fatores necessários para a sua transcrição viral. Essas propriedades contribuem para a habilidade dos *Poxvirus* de interferir na expressão dos genes do hospedeiro sem afetar a expressão dos genes virais (MOSS, *et al* 2004).

Recentemente, descobriu-se que vários genes dos *Poxvirus* assemelham-se a genes de mamíferos para proteínas passíveis de inibir os mecanismos de defesa do hospedeiro. Os exemplos incluem o receptor do fator de necrose tumoral, o receptor do interferon gama e o receptor de interleucina-1 que funcionam neutralizando as redes de complemento e citocinas importantes para resposta imune do hospedeiro (BOWIE *et al.*, 2000). Proteínas virais podem impedir a formação de interleucinas, fato que ocorre na interrupção da produção de IL-1 $\beta$  e IL-18 por uma proteína viral chamada Serpina. As serpinas são um grupo de enzimas que regulam as funções de várias enzimas proteolíticas envolvidas em processos fisiológicos tais como ativação do sistema complemento, inflamação e apoptose. A VV Serpina SPI-2 (formada pelo gene B13 de VACV WR) bloqueia a caspase-1 responsável por clivar pro- IL-1 $\beta$  e pro- IL-18 formadoras de IL-1 $\beta$  e IL-18.

Os *Poxvirus* têm a capacidade de produzir proteínas anti-apoptóticas. A apoptose é um importante mecanismo de resposta inata que impede a replicação viral. São exemplos de proteínas anti- apoptóticas a CP77, proteína formada pelo gene E3L e as serpinas SPI-1 e SPI-2. Acredita-se que essas proteínas atuam inibindo a ação de enzimas da cascata de apoptose, mas os mecanismos envolvidos ainda não estão esclarecidos (HAGA *et.al.*,2005).

*Poxvirus* possuem a capacidade de interferir na regulação da ativação do NF- $\kappa$ B (Fator Nuclear  $\kappa$ B) do hospedeiro, pois o NF- $\kappa$ B abrange uma série de fatores

de transcrição que regulam a expressão de numerosos genes que são elementos essenciais para resposta imune inata e adquirida do hospedeiro (OIE e PICKUP (2001).

## **2.6 Aspectos Imunológicos das Infecções causadas por Poxvírus**

Em infecções experimentais em macacos, o VARV induz doenças sistêmicas com febre e erupções na pele geralmente, assemelhando-se àquelas em humanos, embora as cepas virulentas, freqüentemente, produzam uma infecção atenuada com transmissão reduzida (FENNER *et al.*, 1988).

Durante a fase de erupções na pele, no quadro clínico da varíola humana, pessoas com a doença ativa podem transmitir o vírus através de aerossóis. A inalação de gotículas de aerossóis provenientes de um enantema orofaríngeo pode carrear o vírus à mucosa respiratória e orofaríngea de um indivíduo susceptível. Quaisquer células, inicialmente, infectadas carregam vírus aos macrófagos do trato respiratório, os quais por volta de três dias atingem a corrente sanguínea e linfática, alcançando os linfonodos regionais, entre quatro e 10 dias. A infecção não é contagiosa durante 1 a 2 semanas de inoculação, antes do desenvolvimento do enantema orofaríngeo e da erupção de exantema na pele (ESPOSITO e FENNER, 2001).

O vírus percorre diversos locais para sua replicação, como os órgãos linfóides (baço, medula óssea e linfonodos). Um conjunto de sintomas prodrômicos, tais como febre de, aproximadamente, 40°C e mialgia por todo o corpo são observados. Com a queda da temperatura, desenvolve-se um enantema orofaríngeo que atinge a faringe, úvula, laringe e língua e, menos freqüentemente, traquéia e os brônquios, de onde o vírus é secretado por, aproximadamente, uma semana. Os vírus associados a células, na provável forma de monócitos infectados migram de vasos da derme para a epiderme, onde transmitem a infecção para as células da camada basal. Como parte da resposta inflamatória, polimorfonucleares migram para o lúmen de vesículas desenvolvidas, conferindo-lhe um conteúdo pustular e tornam-se umbilicadas, podendo se unir. As pústulas então progridem para crostas ou cicatrizes dentro de duas semanas (ESPOSITO e FENNER, 2001).

Após a infecção pela maioria dos agentes virais, macrófagos e linfócitos infectados induzem a produção de interferons (IFNs) do tipo I, os quais estimulam as células matadoras naturais (*Natural Killer* - NK) a lisar às células infectadas independentemente da especificidade imunológica convencional. As células NK reconhecem preferencialmente as células infectadas nas quais os vírus inibem a expressão (MHC) de classe I. A ativação da cascata do complemento também serve como uma primeira linha de defesa do hospedeiro. Macrófagos e células dendríticas processam antígenos em peptídeos formando complexos (peptídeo – MHC) para apresentar antígenos aos linfócitos derivados do timo. Os linfócitos T citotóxicos CD8 (CTLs) respondem prontamente com a expansão clonal específica, com finalidade de eliminar, rapidamente, as células infectadas. Os linfócitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> tipo 1 disputam uma função na indução duradoura da atividade do CTL, e os linfócitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> interagem com células B para produzir imunoglobulinas capazes de prevenir a infecção subsequente. Os CTLs reconhecem os antígenos apresentados associados ao MHC I, enquanto as células auxiliares CD4<sup>+</sup> reconhecem os antígenos apresentados no contexto do MHC Classe II. Os CTLs reconhecem predominantemente as proteínas originadas no citosol das células nucleadas e as células T auxiliares reconhecem os antígenos exógenos processados e apresentados por macrófagos, células dendríticas e linfócitos B (ESPOSITO e FENNER, 2001). Os efeitos antivirais dos CTLs são principalmente devido à lise das células infectadas, porém outros mecanismos incluem a ativação de nucleases, que degradam os genomas virais e a secreção de citocinas com atividade antiviral. A produção de citocinas e concomitantes interações com receptores são responsáveis pelos processos de sinalização que regulam a resposta imune (ESPOSITO e FENNER, 2001).

O VACV, geralmente, produz lesões localizadas no lugar de sua introdução, como por exemplo, por inoculação de uma vacina ou por pequenas abrasões na pele. As complicações sistêmicas são raras após a infecção (ESPOSITO e FENNER, 2001).

Todos os *Poxvirus* de vertebrados compartilham um antígeno nucleoprotéico no interior do cerne. Ocorre a reatividade sorológica cruzada entre os vírus de determinado gênero, porém a reatividade é muito limitada entre gêneros diferentes. Conseqüentemente, a imunização com VACV (*Orthopoxvirus*) não fornece nenhuma

proteção contra as doenças causadas por *Parapoxvirus* ou por *Poxvirus* não classificados (BROOKS *et al.*, 2000).

## **2.7. Doença causada pelo *Vaccinia virus***

O *Vaccinia vírus* faz parte do gênero *Orthopoxvirus*, que se originou provavelmente em isolado do vírus da varíola bovina. Sendo utilizado inicialmente para produzir vacinas contra a varíola humana. A infecção causada pelo VACV resulta em profundas mudanças no funcionamento celular, metabolismo e morfologia culminando no que se denomina Efeito Citopático (ECP). As organelas e estruturas das células hospedeiras sofrem rearranjo devido a alterações no citoesqueleto e microtúbulos, bem como aumento da permeabilidade da membrana.

Nos anos 60 e 70, período de intensa vacinação com VACV, eram comuns os relatos de surtos do VACV em animais domésticos, como bovinos, porcos e búfalos que eram contaminados pelas pessoas recém vacinadas que, por sua vez, transmitiam o vírus às pessoas em contato com as lesões. Com a interrupção da vacinação, os surtos desapareceram, confirmando a suposição consenso na literatura de que o VACV não teria um reservatório animal, não permanecendo dessa forma na natureza. A exceção ocorreu na Índia, com aparecimento de surtos de *Buffalopox vírus* (BPXV), causador de uma zoonose de grande importância econômica, detectada até os dias de hoje.

Os primeiros relatos aconteceram nas décadas de vacinação antivaríola no Egito e Índia, onde criações de búfalos eram afetadas. As lesões nas tetas e úberes dos búfalos eram transmitidas para vacas e para mãos e braços de ordenhadores, de forma semelhante às lesões por CPXV e VACV. Nos anos 80 comprovou-se que o BPXV é uma cepa do VACV, derivada provavelmente de cepas vacinais utilizadas na profilaxia da varíola naqueles países e que, de alguma forma, o vírus se estabeleceu na natureza encontrando algum reservatório animal (DUMBELL e RICHARDSON, 1993).

O BPXV era considerado apenas uma exceção à regra. Contudo, a caracterização do vírus Cantagalo (DAMASO *et al.*, 2000) e do vírus Araçatuba (TRINDADE *et al.* 2003) no Brasil, como causadores de infecções em bovinos e

ordenhadores, reforçaram a idéia de que o VACV pode realmente se estabelecer na natureza.

## **2.8 Origem dos Poxvirus**

A origem dos *Poxvirus* não é bem compreendida e diferentes hipóteses têm sido propostas para explicar sua história evolutiva. Essas hipóteses não se restringem à família *Poxviridae*, mas também, a outras famílias de vírus DNA com replicação citoplasmática (LEFKOWITZ, 2006). Uma hipótese que vem sendo proposta para explicar a evolução de *Poxvirus* é uma suposta origem monofilética de um ancestral comum, implicando em uma estreita relação da composição e funcionalidade gênicas entre as famílias de vírus DNA. Outra hipótese propõe que uma origem polifilética possa ter acontecido. Segundo essa idéia, cada família de vírus evoluiu independentemente e a similaridade de seqüência e funcionalidade gênicas surgiram do resultado de uma convergência evolutiva ou transferência gênica horizontal. Para o entendimento completo da origem dos vírus e, particularmente, daqueles de replicação citoplasmática é necessário maior investigação dos mecanismos envolvidos na variação, seleção e evolução e, especificamente, inferir relação entre as variações de estrutura e seqüência.

Uma forma potencial de precisar a origem evolucionária de Poxvirus é comparar a similaridade de seqüência de todos os genes através da análise dos pares de base do DNA viral comparando-se a um banco de seqüências gênicas do Reino taxonômico original. Além disso, a similaridade de seqüência dos aminoácidos de todas as proteínas dos Poxvírus do banco de seqüências gênicas foi determinado e está sendo usado para se fazer uma análise comparativa da similaridade gênica de Poxvírus com outros vírus, bem como, genes eucarióticos e procarióticos de células de todos os Reinos dos seres vivos.

## **2.9 O vírus da Varíola como arma biológica**

A vacinação contra a varíola foi interrompida no início da década de 80, em vista disso, uma suposta re-introdução da varíola determinaria um número elevado de casos, uma vez que mais de 40% da população mundial nunca foi vacinada e o restante deve ter imunidade declinante. A Assembléia da Organização Mundial da Saúde determinou a destruição dos estoques existentes de vírus. Todos os países teriam concordado e destruído seus estoques, com exceção dos Estados Unidos e União Soviética. A data de destruição desses estoques vem sendo adiada, a última data prevista foi em 2002. Não se sabe se alíquotas de vírus teriam sido desviadas para laboratórios de outros países com programas de produção de armas biológicas, como o Iraque (SILVA, 2001).

A letalidade da varíola é de cerca de 30%. É uma doença altamente contagiosa, sendo que, se o vírus for veiculado no aeroporto de uma grande cidade, não só haveria um elevado número de casos, mas também, esses seriam dispersos por praticamente todo o mundo, lembrando que o período de incubação da varíola varia de 7 a 17 dias, geralmente de 12 a 14 (SILVA, 2001). A natureza imprevisível do terrorismo não permite que país nenhum se recuse a considerar a possibilidade de ser ele o alvo, intencional ou não, de um ataque com arma biológica. O controle da disseminação da varíola é feita pela vacinação e se um ataque terrorista ocorresse no Brasil teríamos um cenário de emergência, pois nosso país não possui estoque estratégico de vacinas. Uma medida preventiva importante seria obtenção de um estoque estratégico de vacinas contra a varíola e o aprimoramento dos sistemas de vigilância epidemiológica, para fazer frente a um novo tipo de ameaça de introdução de uma doença (SILVA, 2001). Os órgãos de saúde pública de todos os países agora têm a incumbência de neutralizar ou minimizar os atos de bioterrorismo e gerenciar programas preventivos e emergenciais de combate a um possível ataque por armas biológicas.

## 2.10 Poxviroses – Importância Econômica

Nas décadas de 50 e 60, novos vírus da família Poxviridae foram isolados em diversas regiões do mundo, principalmente nas florestas da África e América do Sul. Esses vírus foram encontrados em macacos, insetos, roedores e outros animais silvestres. Muitos desses agentes infecciosos foram estudados e classificados embora muitos deles permaneçam sem identificação. A partir das primeiras décadas do século XX houve os primeiros registros de poxviroses no Brasil. Iniciou-se então, um estudo mais detalhado de identificação visando o diagnóstico da doença e a classificação do agente viral. As investigações se seguiram em várias regiões, objetivando-se melhor compreensão da infecção para impedir a propagação da doença. Esses vírus foram isolados e caracterizados segundo a presença de proteínas, classificados de acordo com análise genômica e, posteriormente, denominados segundo a cidade onde foram encontrados: *Cotia vírus* (1963), Mato Grosso do Sul (FAGLIARI *et al.*, 1999), *Cantagalo vírus* (DAMASO *et al.*, 2000), *Araçatuba vírus* (TRINDADE *et al.*, 2003) e *Passatempo vírus* (LEITE, 2003).

As principais técnicas utilizadas para caracterização molecular e classificação viral foram à hibridização cruzada do DNA de *Vaccinia virus* (VACV) e amplificação de genes virais essenciais como o da Timidina Quinase (TK), Corpúsculo de Inclusão do Tipo Acidofílico (ATI) e Proteína Hemaglutinina (HA). A partir de 2002, foram observados surtos de doença pústulo-vesicular no gado leiteiro e pessoas de propriedades leiteiras no Sul do Estado do Espírito Santo (DONATELLE, 2005), com características clínicas semelhantes aos casos descritos nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais. O número crescente de surtos de poxviroses que vêm ocorrendo com maior agressividade do vírus, preocupa, no que diz respeito ao prejuízo comercial das fazendas de gado leiteiro, levando tanto à baixa na produção de leite, quanto ao freqüente desenvolvimento de mastite. Considerando que, a transmissão viral ocorre principalmente durante a ordenha manual dos animais, a doença afeta quase exclusivamente as pequenas propriedades. Por ocasião de um surto, os pequenos produtores rurais, que retiram seu sustento da comercialização do leite, sofrem com o comprometimento da

maioria de seu rebanho e de seus ordenhadores que podem ficar sem trabalhar por algumas semanas, diminuindo, assim, a geração de renda.

No início da ocorrência desses surtos, no Estado do Rio de Janeiro (DAMASO *et al.*, 2000) a suspeita do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA era que o agente responsável fosse o *Orthopoxvirus* da varíola bovina. Os sintomas dessa virose são clinicamente semelhantes aos provocados por outros *Orthopoxvirus*. Além desses, os *Parapoxvirus*, notadamente o vírus da pseudovaríola bovina ou nódulo do ordenhador, também apresenta sintomas semelhantes aos da varíola bovina.

É importante salientar que, em nenhum caso analisado no Brasil, houve a detecção do *Orthopoxvirus* da varíola bovina, entretanto, em alguns casos, foram encontrados *Parapoxvirus* (DAMASO, 2000; SCHATZMAYR *et al.*, 2000). Este fato, digno de nota, já era esperado, uma vez que o vírus da varíola bovina apresenta distribuição geográfica restrita a certos países da Europa/Ásia, e acredita-se que não ocorra nas Américas (TRYPARTHY *et al.*, 1981). Já os membros do gênero do *Parapoxvirus* que afetam o gado bovino, como o vírus da pseudovaríola bovina, são relativamente comuns e apresentam-se distribuídos em todos os continentes. Atualmente, mesmo com o diagnóstico confirmado de infecções por cepas do vírus da *Vaccinia* e, excludente de outros *Orthopoxvirus* e *Parapoxvirus*, é comum referir-se à doença, no meio rural, como “varíola bovina”.

Esses surtos que ocorreram nos últimos anos na região sudeste vêm causando grandes prejuízos econômicos, principalmente no que diz respeito à produção de leite, onde em algumas propriedades 100% dos bovinos foram acometidos. Além disso, a doença vem tendo grande importância na saúde pública, como uma zoonose emergente, com ocorrência de casos humanos que necessitaram de hospitalização, justificando uma pesquisa de investigação mais detalhada do problema em pauta.

### **2.11 *Cantagalo virus, Araçatuba virus e Passatempo virus.***

Nos últimos sete anos, inúmeros casos de doença pústulo-vesicular ocorreram em diversas fazendas de gado leiteiro nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais, acometendo bovinos e pessoas, principalmente ordenhadores e seus familiares, nos quais as características clínicas e o diagnóstico laboratorial identificaram cepas de *Vaccinia-like virus* da família *Poxviridae* como causador dos surtos. Na ocasião DAMASO *et al.* (2000) isolaram e caracterizaram molecularmente o *Cantagalo virus* (CTGV) das lesões de bovinos na cidade de Cantagalo no Estado do Rio de Janeiro; TRINDADE *et al.* (2003); o *Araçatuba virus*, na cidade de Araçatuba no Estado de São Paulo; LEITE (2003); o *Passatempo virus*, em Passatempo no Estado de Minas Gerais .

A partir do *Cantagalo virus* foi desenvolvida a cepa vacinal (VACV-IOC), produzida no Instituto Oswaldo Cruz-RJ, e utilizada na campanha da Organização Mundial de Saúde (OMS) para a erradicação da varíola no Brasil nos anos 60 e 70 (DAMASO *et al.*, 2000). O *Araçatuba virus* e o *Passatempo virus* como novas cepas do VACV, ou desdobramento do vírus Cantagalo (TRINDADE *et al.*, 2003, LEITE, 2003), reforça a idéia de que o VACV pode realmente se estabelecer na natureza, como observado com o BPXV.

As lesões cutâneas em humanos causadas pelos *Cantagalo virus*, *Araçatuba virus*, *Passatempo virus* e os outros *Vaccinia-like virus* são semelhantes às causadas pelo CPXV (TRINDADE *et al.*, 2003; LEITE, 2003; NAGASSE-SUGAHARA *et al.*, 2004).

### **2.12. Anticorpos Monoclonais**

A habilidade de produzir quantidades praticamente ilimitadas de moléculas idênticas de anticorpos específicos para um determinado antígeno revolucionou a imunologia e teve um impacto muito grande tanto na pesquisa em diversas áreas quanto na prática clínica. O primeiro método usado para produzir anticorpos

homogêneos ou monoclonais de especificidades conhecidas foi descrito por Georges Köhler e César Milstein em 1975 e continua sendo usado até hoje. Essa técnica é baseada no fato de que cada linfócito B produz anticorpos de especificidade única. Como linfócitos B normais não podem crescer indefinidamente, é preciso imortalizar células B que produzem um anticorpo específico. Isso é conseguido por meio da fusão celular, ou hibridização de células somáticas, entre um plasmócito normal e uma célula de mieloma, seguida da seleção das células fundidas que secretam anticorpos da especificidade desejada derivada da célula B normal. Essas linhas de células produtoras de anticorpos imortalizadas pela fusão são chamadas de hibridomas, e os anticorpos que elas produzem são chamados de anticorpos monoclonais (ABBAS, 2003).

A técnica para produzir hibridomas requer culturas de células de mieloma que crescem em um meio de cultura normal mas não em um meio de “seleção”, pois elas não possuem genes funcionais necessários para a síntese de DNA nesse meio. A fusão de células normais com essas células tumorais de mieloma fornece os genes necessários e, assim, somente os híbridos de células somáticas crescerão em um meio de seleção. Além disso, a propriedade de crescimento incontrolável do mieloma torna tais híbridos imortais. As células de mieloma que podem ser usadas para fusão são criadas induzindo-se defeitos nas vias de síntese de nucleotídeos. As células animais normais sintetizam nucleotídeos de purina e timidilato, ambos precursores do DNA, por uma via *de novo* que requer tetraidrofolato. Drogas antifólicas, como a aminopterina, bloqueiam a ativação do tetraidrofolato inibindo, conseqüentemente, a síntese de purinas e prevenindo, assim, a síntese de DNA *de novo*. Células tratadas pela aminopterina podem usar uma via de recuperação na qual a purina é sintetizada a partir de hipoxantina exógena, por meio da enzima hipoxantina – guanina fosforibosiltransferase (HPRT), e o timidilato é sintetizado, a partir da timidina, pela enzima timidina quinase (TK). Assim, as células crescem normalmente na presença de aminopterina se o meio de cultura também for suplementado com hipoxantina e timidina (chamado meio HAT). Pode-se tornar as células de mieloma defeituosas em HPRT ou TK mediante a mutagênese seguida de seleção em um meio que contenha substratos para essas enzimas que levem à produção de substâncias letais. Somente células deficientes em HPRT ou TK

sobrevivem nessas condições. Essas células de mieloma que não possuem HPRT ou TK não podem usar a via de recuperação e, conseqüentemente, morrerão no meio HAT. Se células B normais forem unidas às células que não possuem HPRT ou TK, as células B fornecerão as enzimas necessárias para que os híbridos sintetizem DNA e cresçam no meio HAT. Para produzir o anticorpo monoclonal específico para um determinado antígeno, um camundongo ou um rato são imunizados com aquele antígeno e as células B são isoladas do baço ou de linfonodos do animal. Elas são, então, fundidas com uma linha celular imortalizada apropriada. As células de mieloma são os melhores parceiros para as células B, pois células semelhantes tendem a se fundir e originar híbridos estáveis mais eficientemente que células diferentes. Na prática as células de mieloma utilizadas não possuem imunoglobulinas e a fusão celular é conseguida usando-se polietilenoglicol. Os híbridos são selecionados para crescer no meio HAT. Nessas condições, células de mieloma negativas para HPRT ou TK que não se fundiram morrem, pois não podem usar a via de recuperação e as células que não se fundiram não podem sobreviver por mais do que 1 a 2 semanas e, assim, somente híbridos crescerão. As células fundidas são cultivadas em uma concentração em que se espera que cada poço contenha somente uma célula de hibridoma. O sobrenadante de cada poço onde foram detectados células em crescimento é, depois, testado para se verificar a presença de anticorpos reativos com o antígeno usado para imunização. O método de investigação depende do antígeno usado. Para antígenos solúveis, a técnica usada é o radioimunoensaio (RAI) ou a enzima imunoensaio (ELISA). Para antígenos de superfície celular, vários ensaios que usam a ligação do anticorpo a células viáveis podem ser usados. Uma vez que compartimentos positivos (isto é compartimentos que contém hibridomas que produzem o anticorpo desejado) sejam identificados, as células são clonadas em ágar semi-sólido ou limitando-se a diluição, e os clones que produzem o anticorpo são isolados por meio de outra etapa de testes. Esses hibridomas clonados produzem anticorpos monoclonais de especificidade desejada. Hibridomas podem ser cultivados em grande quantidade como tumores ascíticos em camundongos singênicos para produzir grandes quantidades de anticorpos monoclonais. No momento, os hibridomas são produzidos mais freqüentemente mediante a fusão de mieloma de camundongo sensível ao

meio HAT com células B de camundongos, ratos ou hamsters imunizados. O mesmo princípio é usado para gerar hibridomas de células T de camundongos a partir da fusão de células T com uma linha de células derivadas do tumor de células T sensíveis ao meio HAT. Tentativas estão sendo feitas para gerar anticorpos monoclonais humanizados, primariamente para serem administrados a pacientes, desenvolvendo-se linhas de mieloma humano como parceiros da fusão. (Em geral, a estabilidade dos híbridos é baixa se células de espécies evolutivamente afastadas forem usadas, sendo talvez por essa razão que as células B humanas não formam hibridomas altamente eficientes com células de mieloma de camundongo) (HUSTON *et a.*, 2001).

Técnicas de engenharia genética são usadas para expandir a utilidade dos anticorpos monoclonais. Os DNAs complementares (cDNAs) que codificam as cadeias de polipeptídeos de um anticorpo monoclonal podem ser isolados de um hibridoma e esses genes podem ser manipulados *in vivo*. A organização estrutural dos anticorpos responsáveis pela ligação ao antígeno permite que segmentos de DNA que codificam os sítios de ligação de antígenos de um anticorpo monoclonal murino seja “costurado” a um cDNA que codifica uma proteína de mieloma humano, criando um gene híbrido. Ao se expressar, a proteína híbrida resultante, que retém a especificidade antigênica, é chamada de anticorpo humanizado. Anticorpos humanizados têm menos chances de parecerem “estranhos” ao organismo humano e de induzir uma resposta anti - anticorpo que limitaria a utilidade de anticorpos monoclonais murinos ao serem administrados a pacientes.

A engenharia genética também está sendo usada para criar moléculas semelhantes a anticorpos monoclonais com especificidade definidas sem a necessidade de se produzir hibridomas. Uma linha de pesquisa usa coleções aleatórias de cDNA que codifica somente a região de ligação de antígenos dos anticorpos. Os cDNAs são gerados a partir de RNA e isolados do baço de camundongos imunizados pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os cDNAs são, assim, postos em bacteriófagos para formar bibliotecas de exibição de fagos. Apesar de as regiões de ligações de antígenos dos anticorpos serem formadas por duas cadeias polipeptídicas diferentes, podem ser criados sítios sintéticos de ligação de antígenos que expressam proteínas de fusão nas quais as

seqüências de duas cadeias são unidas covalentemente uma atrás da outra. Tais moléculas podem se expressar na superfície de bacteriófagos e vários fagos podem ser testados para determinar a sua habilidade de ligar um determinado antígeno. O vírus que se liga ao antígeno presumivelmente contém o cDNA que codifica os sítios de ligação de antígenos sintéticos desejados. O cDNA é isolado do vírus e unido a um DNA que codifica as regiões que não ligam antígenos de uma molécula genérica de anticorpo. O resultado final pode, então, ser transferido para um tipo celular adequado, expresso na forma solúvel, purificado e usado. A vantagem de se usar a tecnologia de fagos está no fato de que a quantidade de locais de ligação que podem ser examinados em busca da especificidade desejada é três ou quatro vezes maior do que os limites práticos dos hibridomas (HARRIS *et al.*, 1999).

### **2.12.1 Aplicações dos Anticorpos Monoclonais**

Anticorpos monoclonais podem ser utilizados para a identificação de marcadores fenotípicos característicos de determinados tipos celulares. A base para a classificação atual dos linfócitos e de outros leucócitos é a ligação de anticorpos monoclonais específicos para um determinado tipo celular. Eles foram usados para definir grupos de diferenciação (marcadores CD) para vários tipos celulares.

Anticorpos monoclonais estão também sendo empregados para diagnóstico de tumores e terapia. Anticorpos monoclonais específicos para um tumor são usados para detectar os tumores por meio de técnicas de imagem e para imunoterapia dos tumores *in vivo*.

Outra abordagem largamente utilizada é análise funcional de moléculas de superfície e secretadas. Na pesquisa imunológica, os anticorpos monoclonais que se ligam a moléculas na superfície celular e estimulam ou inibem determinadas funções celulares são ferramentas muito úteis para definir as funções das moléculas de superfície, incluindo os receptores para antígenos. Os anticorpos que ligam e neutralizam citocinas são usados rotineiramente para detectar a presença e a função dessas proteínas hormonais *in vitro* e *in vivo* (ABBAS, 2003).

### **2.12.2 Imunodiagnóstico**

O diagnóstico de muitas doenças infecciosas e sistêmicas depende da detecção de determinados antígenos ou anticorpos na circulação ou nos tecidos mediante o uso de anticorpos monoclonais nos ensaios imunes. A utilização de ensaios imunoenzimáticos para proteínas de *Vaccinia vírus* pode ser aplicada para testar soros de diversos animais possivelmente infectados. Um *blocking* – ELISA sandwich usando um anticorpo monoclonal (Mab) contra a proteína D8L de *Vaccinia vírus* foi desenvolvido para detectar *orthopoxvirus* (OPV) no soro de felinos (CZERNY., et al 1996). O *blocking* - ELISA mostrou-se eficiente como diagnóstico sorológico rápido e pode ser usado na medicina veterinária e também em testes sorológicos humanos.

**OBJETIVOS E**  
**JUSTIFICATIVA**

### **3. OBJETIVO**

O trabalho teve como objetivo principal à produção de anticorpos monoclonais anti-*Orthopoxvirus* e avaliação por microscopia eletrônica de transmissão de infecção de células Vero pelo vírus.

### **4. JUSTIFICATIVA**

Nos últimos anos, surtos de poxviroses bovina e humana vêm sendo relatados nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo causando sérios prejuízos econômicos na agropecuária daqueles estados. Muitos estudos envolvendo biologia molecular estão sendo realizados para a caracterização genômica do vírus. Além disso, está sendo feito uma comparação do vírus circulante com cepas virais de outras regiões e de outros países. No entanto, ainda são poucos os estudos direcionados para o diagnóstico da doença. As principais técnicas utilizadas para diagnóstico continuam sendo a microscopia eletrônica, isolamento em ovos e em células e reação da cadeia da polimerase (PCR). A produção de anticorpos monoclonais contra *Orthopoxvirus* – sendo aplicados no teste de ELISA - pode possibilitar estudos detalhados da epidemiologia da doença e disseminação do vírus, objetivando-se o controle desta enfermidade na região. O controle da doença se baseia na identificação dos animais infectados e a separação dos mesmos para evitar a disseminação para outros animais, confirmando assim, a necessidade de um método de diagnóstico de execução rápida e que permita analisar um grande número de soros simultaneamente. O teste de ELISA trará maior agilidade, sensibilidade, especificidade e objetividade no diagnóstico de poxviroses bovina e humana.

Dados sobre os mecanismos de montagem da partícula viral acompanhada por distúrbios na célula hospedeira ainda não foram bem descritos na literatura. Dados evidenciados por microscopia eletrônica de células infectadas por vírus poderão trazer novas informações acerca da biologia da infecção do *Vaccinia vírus* em células hospedeiras, podendo abrir novas perspectivas terapêuticas para as poxviroses.





## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Vírus

#### 5.1.1 *Orthopoxvírus*

Para produção e posterior concentração de antígeno de *Orthopoxvirus* foram utilizadas amostras de *Vaccinia vírus* (cepa *WR*) gentilmente cedidas pelo Laboratório de Vírus do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte/MG e armazenadas a – 70°C no setor de Virologia Veterinária do Laboratório de Sanidade Animal (LSA) do CCTA/UENF.

### 5.2 Animais

Camundongos da linhagem Balb/c do sexo feminino, com idade mínima de 35 dias e peso entre 18 e 22g, provenientes do Biotério do CBB/UENF foram utilizados para imunizações, utilizando *Vaccinia virus WR*. Ressalta-se que esses animais foram tratados segundo normas de Biossegurança e Bioética, e que o projeto consta de uma parte de um projeto maior que está em fase de aprovação pelo Comitê de Ética.

### 5.3 Multiplicação viral em células Vero

Células Vero, em monocamada, cultivadas em garrafas de cultivo celular de 175cm<sup>2</sup> foram infectadas com um volume de 5mL de suspensão viral (concentração inicial 5x10<sup>7</sup> pfu/mL) diluída em meio DMEM – F12 (GibcoBrl), acrescido de gentamicina (50mg/L, Gibco). Após o período de 1 hora de adsorção em estufa a 37°C, foi acrescentado 20 mL de meio DMEM-F12 suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico gentamicina (50mg/L). As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C até o aparecimento de efeito citopático (ECP), que ocorreu em aproximadamente 48 horas.

O Meio de Cultura foi coletado, centrifugado a 900 x g e estocado a -70°C para posterior análise por SDS-PAGE. Em seguida, as células que permaneceram aderidas na garrafa foram lavadas com PBS pH 7.2, congeladas e descongeladas (3 ciclos) e desprendidas com auxílio de uma espátula raspadora. As células desprendidas foram diluídas em solução salina fosfatada (PBS), pH 7.2, e centrifugadas a 6000 x g a 4°C por 40 minutos. Por fim o sobrenadante obtido após esse processo foi armazenado a -70°C e o sedimento (extrato celular) descartado.

#### **5.4 Multiplicação viral em membrana corioalantóide de ovos embrionados**

Ovos embrionados com aproximadamente 10 dias (provenientes da PESAGRO – RJ) foram utilizados para multiplicação viral. Realizou-se o deslocamento da câmara de ar dos ovos com auxílio do ovoscópio. Os ovos encontravam-se previamente limpos e desinfetados com tintura de iodo 2%. Aproximadamente, 100µL de *Vaccinia virus WR* com  $2,2 \times 10^{10}$  p.f.u foi inoculada em membrana corioalantóide. Os ovos foram acondicionados em estufa umedecida a 37 °C durante 72 horas e transferidos para câmara fria a 4 °C por 12 horas. As membranas corioalantóides foram retiradas assepticamente dos ovos, coletando-se a região com presença de lesões do tipo “pocks”, e armazenadas a -70 °C.

#### **5.5 Inativação de *Vaccinia virus* cepa WR**

O concentrado de *Vaccinia virus* cepa WR, foi ressuspenso em Tris 10mM pH 8.0 e imerso em banho – maria a 60 °C por uma hora.

Após este procedimento de inativação realizou-se um teste de inocuidade, inoculando-se numa garrafa de células Vero 10µL da amostra viral “inativada”. Após três dias em observação, não havendo nenhum efeito citopático, foi confirmado a inativação do concentrado viral.

### **5.6 Microquantificação de Proteínas em microplacas pelo Método do Ácido Bicinconínico (BCA).**

Neste ensaio, foi realizada uma curva de calibração de proteína padrão (Standard) utilizando BSA (Albumina de Soro Bovino) a 1mg/L em placa de 96 poços, como descrito por Joklik et al (1962). A curva de calibração foi feita em duplicata iniciando com “zero” de BSA indo até o volume de 10µL, adicionando depois 200µL de reagentes Sulfato de Cobre II junto ao Ácido Bicinconínico Sigma (na proporção 1:50). Foi aplicado 10µL da amostra pura e diluída 1:50, em duplicata. A placa foi incubada por 30 minutos a 37°C e, posteriormente, foi lida em leitor de ELISA a 570nm.

### **5.7 Concentração de *Vaccinia virus WR***

Para a concentração do vírus foi feito um colchão de sacarose a 36%. A concentração p/v (peso por volume) foi feita analisando-se a densidade da sacarose a 36% que é igual a  $d = 1,1513$ . Uma vez definido a concentração da sacarose 36%, um volume de lisado de Vero foi adicionado sobre 10mL de sacarose em Tris HCL pH 8.0 10 mM em cada tubo. A amostra foi centrifugada  $80000 \times g$  a 6 °C por 40 minutos em ultracentrífuga. O sedimento, junto a 1mL de sacarose, foi aliqotado em tubos *ependorf* e armazenado no freezer a -70 °C para posterior realização de SDS PAGE, *Western blot* e imunização de coelho.

### **5.8 Titulação Viral- *Vaccinia virus WR***

Monocamada de células Vero em placas de 6 poços foram tripsinizadas e quantificadas em câmara de Neubauer. A suspensão viral de *Vaccinia virus WR* foi diluída em série de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  em PBS. O meio de cultura dos poços da placa foi rejeitado e inoculou-se cada poço com 0,1mL de suspensão viral, deixando ao menos um poço como controle. A placa foi incubada em estufa de CO<sub>2</sub> por 30

minutos (período de adsorção viral). Posteriormente, adicionou-se 0,5mL de DMEM F-12 com 1% de soro fetal bovino e incubou-se por 48 horas em estufa à 37 °C. Após este período, as células foram coradas com cristal Violeta e visualizadas ao Microscópio Ótico.

### **5.9 SDS-PAGE do concentrado de *Vaccinia Vírus WR***

A partir da amostra de concentrado de *Vaccinia virus WR* foi feito um gel SDS-PAGE (%) com 1mm de espessura para se obter o perfil das proteínas que compõem a partícula viral. Foram também analisadas, as amostras de *Vaccinia virus* BH (isolado de roedores no Laboratório de Vírus da UFMG de Belo Horizonte) e amostras de dois sobrenadantes de células infectadas com VACV WR. Em um Gel a 10% foi aplicado, aproximadamente, 10µg de proteína viral por canaleta. Em outro gel SDS-PAGE foram analisados o sobrenadante de células Vero infectadas com *Vaccinia virus WR* e o concentrado que foi obtido por ultracentrifugação. Foi aplicado um total de, aproximadamente, 30µg de proteína por canaleta. Para ambos os géis a corrida seguiu a 100V, 400mA por 1 hora e 30 minutos. Após a corrida eletroforética, os mini-géis foram corados com Azul de Coomassie por 12 horas e descorados, lavando-os com água destilada fervente. Posteriormente, para efeito de melhor visualização das bandas, corou-se os géis com Nitrato de Prata.

### **5.10 Imunização de camundongos BALB/c**

Para produção de anticorpos monoclonais anti-*orthopoxvirus*, dois camundongos BALB/c foram imunizados seguindo o protocolo abaixo:

- Dia 0 – imunização: *Vaccinia virus WR* numa concentração de  $4,3 \times 10^{10}$  p.f.u foi ressuspensa em 400µL de PBS estéril e colocada a 15 cm de distância de uma luz ultravioleta por quatro minutos para inativação. Num tubo, essa amostra foi homogeneizada com 80 µL de hidróxido de alumínio. Aproximadamente 240µL foram inoculados por via intraperitoneal em cada camundongo.

- Dia 21 - dose de reforço: foram inoculados aproximadamente 150µL de VACV WR (suspensão em PBS) por via intraperitoneal nos dois camundongos utilizados.
- Dia 28 - coleta do sangue para obtenção de soros para titulação de anticorpos por ELISA.
- Dia 35 - dose de reforço: foram inoculados aproximadamente 200µL de VACV WR (diluídos em PBS) por via intraperitoneal nos dois camundongos utilizados.

### **5.11 Produção de Anticorpos Monoclonais**

Células provenientes do baço dos camundongos imunizados foram fundidas com células de mieloma A2 utilizando-se Polietilenoglicol (PEG) 4000 (GibcoBRL,EUA), segundo metodologia inicialmente descrita por Kohler e Milsten (1975) e adaptada por Gershwin (1981) . Duas garrafas de células tumorais A2 contendo aproximadamente  $10^6$  células foram centrifugadas por 3 minutos a 900 x g na centrífuga Sorvall RT7 e ressuspensas em Meio DMEM – F12 (Gibco BRL,EUA). Células esplênicas e tumorais foram contadas em câmara de Neubauer. A proporção de células de mieloma e esplênicas fundidas foi de 1:4, respectivamente. Em seguida, o *pool* das duas linhagens de células foi centrifugado por 3 minutos a 900 x g na centrífuga Sorvall RT7 . Na seqüência, o sedimento foi ressuspensado em 1,5mL de polietilenoglicol (PEG), após 2 minutos, foi acrescentado 20mL de meio sem soro, homogeneizado e levado ao banho-maria a 37 °C por 15 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado novamente por 5 minutos a 900x g na centrífuga Sorvall RT7. Após a fusão, as células foram ressuspensas em meio DMEM – F12 (Gibco BRL, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino(SFB), 20µg/mL de gentamicina (Gibco BRL, EUA), 50µM de β - mercaptoetanol e agente seletivo HAT (Hipoxantina, Aminopterina e Timidina) 50X (Sigma Chemical Co, EUA). A suspensão celular foi semeada em placas de 96 poços (Corning, EUA) que continham células peritoniais de camundongos BALB/c, de modo que a concentração de células em cada poço fosse de  $2 \times 10^5$  células. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub> e observadas

diariamente ao Microscópio Óptico Axiovert 135 M Alemanha para acompanhar o crescimento das colônias. Quando as colônias de hibridomas atingiram, aproximadamente, 300 células os respectivos sobrenadantes foram analisados através do teste de ELISA para a detecção de anticorpos anti- *Vaccinia virus WR*.

### **5.12 Seleção dos Hibridomas Positivos por ELISA**

A seleção de hibridomas positivos, isto é, que produziam anticorpos específicos no reconhecimento de proteína de *Vaccinia virus*, foi realizada através do teste de ELISA utilizando um controle de células Vero lisadas. A placa foi sensibilizada com antígeno de células Vero lisadas e *Vaccinia virus WR* diluídas em tampão carbonato/bicarbonato 0,05M pH 9,6 (60µL/poço) numa concentração de aproximadamente 1µg/poço. A placa foi incubada 1h a 37 °C ou *overnight* a 4 °C. A placa foi lavada 1 vez com PBST 0,05% e em seguida, foi adicionado solução bloqueio de Gelatina a 1% (150µL/poço) diluída em PBS por 1 hora a temperatura ambiente. A placa foi lavada 1 vez com PBST 0,05% e na seqüência, 50µL do sobrenadante de cultura dos hibridomas foram incubados à placa de ELISA e mantidos a 37 °C por 1 hora. Soro normal de camundongo (diluição 1:1000) foi utilizado como controle negativo e como controle positivo foi utilizado soro hiperimune (diluição 1:1000) de BALB/c infectado com VACV WR. A placa foi lavada 3 vezes com PBST 0,05% e foi incubado o anticorpo secundário Mouse Anti-Igs (Biosource) diluído 1/5000 em PBST 0,05% acrescido de gelatina 1%. Por fim, o teste foi revelado pela adição do substrato contendo peróxido de hidrogênio e ortofenildiamina – OPD – (Sigma Chemical Co, EUA) diluídos em tampão ácido. A reação foi interrompida adicionando-se 50 µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N e, posteriormente, lida em espectrofotômetro de placas com comprimento de onda de 492 nm (Multiskan, Labsystems, Finlândia).

### **5.13 Clonagem dos Hibridomas**

Os hibridomas positivos segundo o teste de ELISA foram clonados por diluição limitante. As células contidas em cada poço positivo foram contadas em

câmara de Neubauer, diluídas à concentração de 20 células/mL e semeadas no volume de 100µL/poço em placas de cultura de 96 poços. Essa placa já continha meio pré –condicionado preparado com fagócitos peritonais de camundongos com 24 horas de antecedência. Cada clone foi subclonado pelo menos duas vezes antes de ser ampliado para coleta de sobrenadante e produção de líquido ascítico, ou congelado em nitrogênio líquido.

#### **5.14 Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Células Vero infectadas com VACV ( $4,4 \cdot 10^{12}$  p.f.u por garrafa de 25cm<sup>2</sup>) em intervalos de tempos de 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 horas foram fixadas em solução contendo glutaraldeído 1%, paraformaldeído 4% (KARNOVSKI,1965) e cloreto de cálcio 0,5mM e tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, com 5% de sacarose por 1 hora à temperatura ambiente.

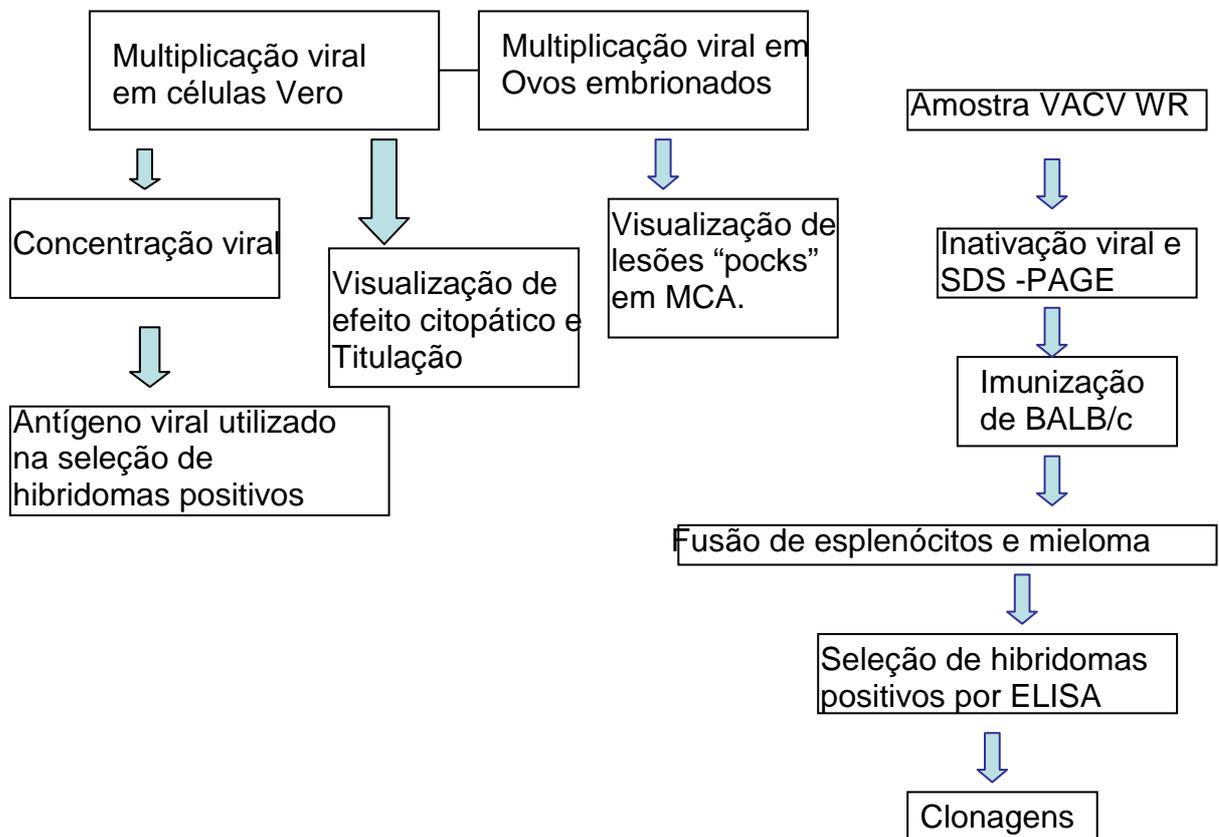
As células foram lavadas 2 vezes durante 5 minutos com tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 com 5% de sacarose ou tampão fosfato 0,1M , pH 7,2, com 7% sacarose. A etapa de pós-fixação foi feita em tetróxido de ósmio 1% junto a ferricianeto de potássio 0,8% e 0,5mM de CaCl<sub>2</sub> em tampão cacodilato 0,1M , pH 7,2 ,por 1 hora à temperatura ambiente, na ausência de luminosidade (FORBES et al; 1977).

Foi feita novamente duas lavagens durante 5 minutos com tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 , contendo 3% de sacarose. Em seguida, contrastou-se em bloco por 1 hora em acetato de uranila 2% em água, no escuro. Desidratou-se em série crescente de acetona: 70%, 90% - 5 minutos cada e acetona 100% 2 vezes, por 10 minutos. Incubou-se “*overnight*” acetona 100% 1:1 epon.

Colocou-se em Epon puro por 4 a 6 horas. O material foi incluído em Epon novo, em formas plásticas, deixando para polimerizar durante 48 horas em estufa a 60 °C. Os blocos obtidos foram limados e desbastados no piramitome LKB e cortados no ultramicrotomo Sorvall, modelo Porter-Blum MT2-B, com navalha de diamante. Cortes semifinos (1µm), corados com azul de toluidina 1% durante, aproximadamente, 2 minutos, lavados em água corrente e secos em placa aquecedora . Foram utilizados para a visualização ao Microscópio óptico permitindo

a orientação do material. Cortes ultrafinos, com 50 a 80nm de espessura, foram recolhidos em grades de cobre de 400 ou 300 “mesh” e contrastados por 15 minutos com acetato de uranila 5% em água, lavados em água, e a seguir colocados em citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963), por 2 minutos, sendo novamente lavados em água e observados ao Microscópio Eletrônico Magnani, a 80KV no laboratório de Virologia –CCS – UFRJ).

### ORGANOGRAMA DE MATERIAL E MÉTODOS



# **RESULTADOS**

## 6. RESULTADOS

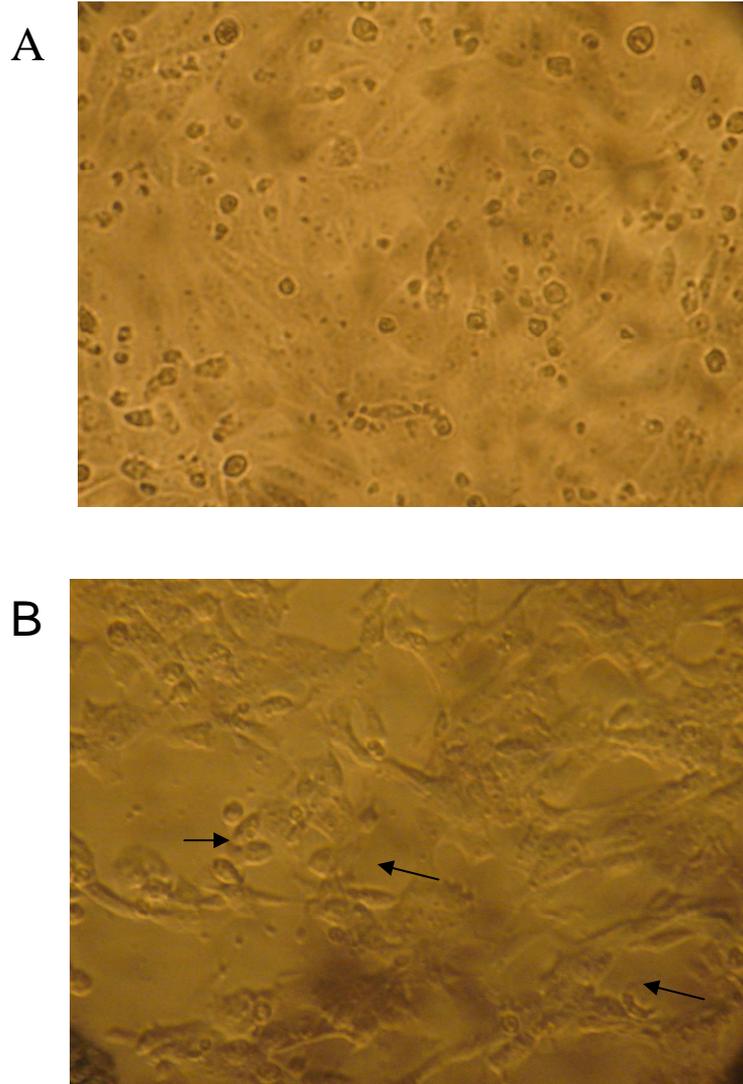
### 6.1 Multiplicação Viral

Para produção de antígeno, células Vero em monocamada (Figura 5A) foram infectadas com purificado viral *Vaccinia vírus* cepa WR. Após 48 horas de inoculação foi observado por microscopia que 90% das células das culturas inoculadas apresentavam efeito citopático (formação de vacúolos, fusão de membranas, sincícios e células em formato estrelado e irregular (Figura 5b). Após a observação do ECP foram colhidos o sobrenadante das culturas livre de células e sobrenadante de lisado celular.

A multiplicação viral também foi feita em membrana corioalantóide de ovos embrionados. Um volume de 100µL de VACV WR foi inoculado em ovos embrionados com aproximadamente 10 dias. Após 72 horas, retirou-se a membrana (Figura 6 A) e pôde-se observar o tipo de lesão característica de infecção viral por VACV “pocks” na membrana corioalantóide ( Figura 6B).

### 6.2 Gel SDS-PAGE

As preparações virais foram analisadas pela técnica de eletroforese monodimensional em gel de poliacrilamida. Após a coloração do gel, com Nitrato de Prata, pôde-se observar o perfil eletroforético das proteínas de *Vaccinia vírus* cepa WR, *Vaccinia vírus* BH e do clarificado viral obtido de células Vero infectadas (Figura 7).

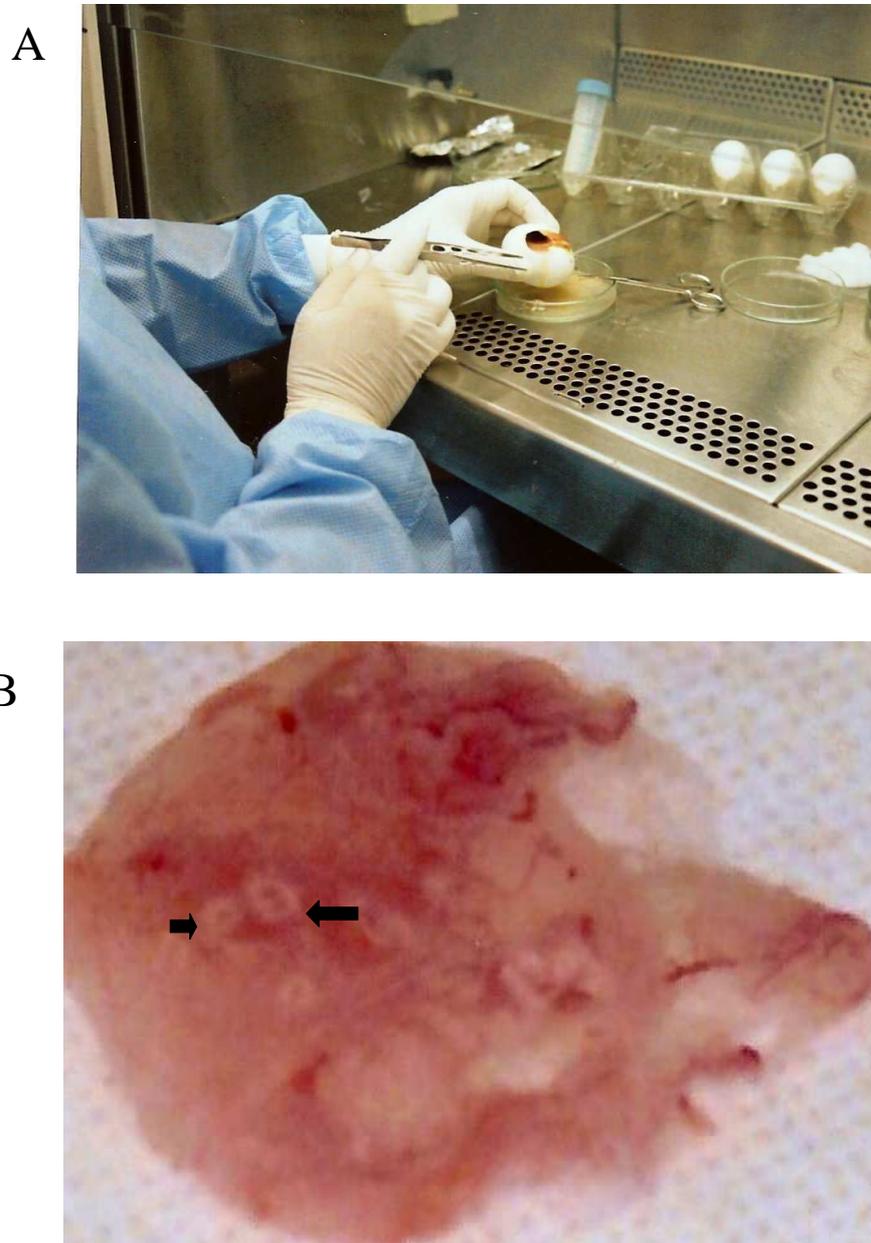


**Figura 5** - (A) Células Vero não infectadas por *Vaccinia virus WR*. (B) Células Vero em monocamada infectadas com *Vaccinia Vírus WR*. formação de vacúolos, fusão de membranas e células em formato estrelado e irregular (setas). Após 48 de infecção pode-se observar o efeito citopático . Visualização ao Microscópio Óptico Invertido Axiovert 135 M , aumento 100X.

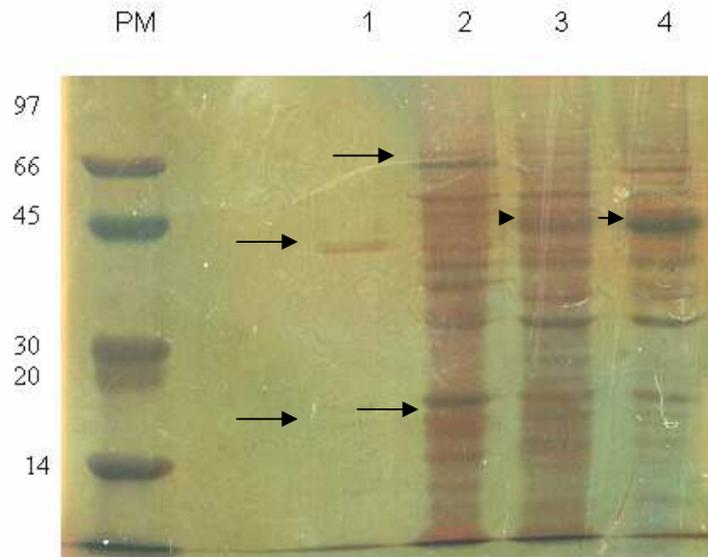
Na linha 1 percebe-se uma banda pouco aparente referente a uma proteína de *Vaccinia* cepa *WR* com peso molecular compreendido entre 40 a 45 kDa. A linha 2 caracteriza o perfil eletroforético da amostra de *Vaccinia* BH. Evidencia-se um grande repertório de proteínas, destacando-se entre elas as de peso molecular de aproximadamente 66kDa, 35kDa, bem como, três bandas bem evidentes situadas entre 20 e 14kDa. Nas linhas 3 e 4 (amostra clarificada de lisado de Vero) também foi observado uma grande quantidade de proteínas, destacando-se entre elas bandas compreendidas entre 45kDa e 30kDa. Vale destacar que o perfil eletroforético entre as linhas 2, 3 e 4 são bastante semelhantes porém apresentam algumas diferenças, destacando-se entre elas uma banda protéica de, aproximadamente, 45 kDa nas linhas 3 e 4 enquanto que na linha 2 esta banda não fica bem evidenciada (Figura 7).

No SDS-PAGE em que foram comparadas amostras do concentrado *Vaccinia virus* cepa *WR* (linha 3 a 6) e o sobrenadante de células Vero infectadas com o mesmo vírus (linhas 1 e 2), notou-se pela coloração com Nitrato de Prata que a amostra do sobrenadante (linhas 1 e 2) apresentou uma forte banda com peso molecular de aproximadamente 45 kDa. Nas linhas 3 a 6 observa-se a presença de uma banda compreendida entre 45kDa e 30kDa e outra entre 20kDa e 14 kDa (Figura 8).

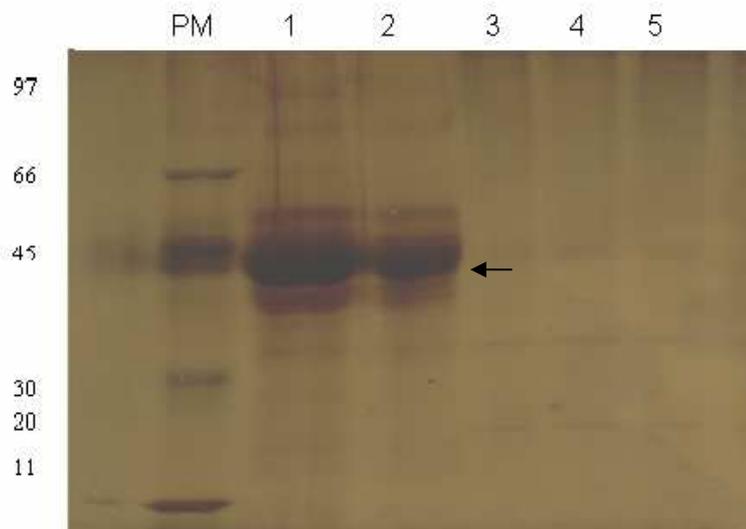
Células Vero em monocamada não infectadas e infectadas (Figura 9 A e B) (por 48 horas  $4,3 \cdot 10^{10}$  p.f.u) com VACV *WR* foram coradas com Cristal Violeta. Após 48 horas as monocamadas de células Vero infectadas apresentaram-se em aspecto estrelado (Figura 9B). Células Vero após 48 horas de infecção por VACV *WR* apresentam formação de sincícios e vacuolização da monocamada. Além disso, pode-se observar a formação de grumos de células aumentadas de tamanho, com aspecto arredondado e estrelado (Figura 9B).



**Figura 6** – (A) Procedimento para retirada de Membrana Corioalantóide infectada com VACV WR. (B) Membrana Corioalantóide de ovo embrionado infectada com VACV WR. Lesão característica de infecção “pocks” (setas).

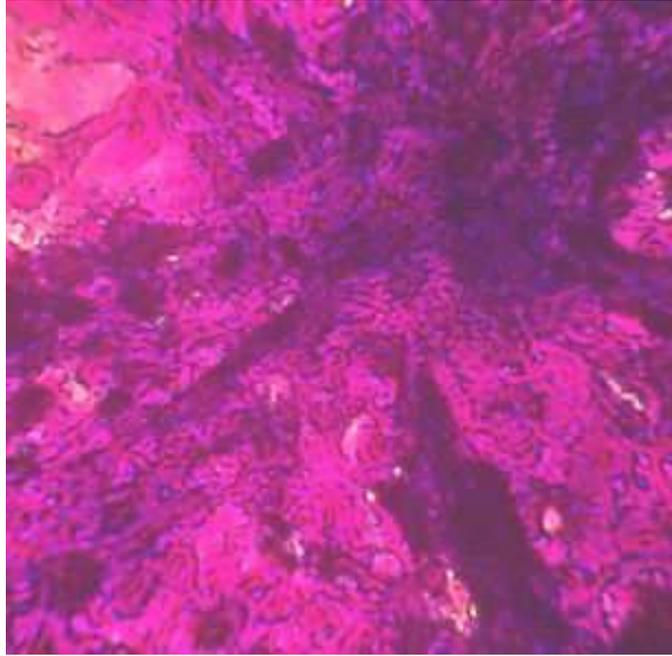


**Figura 7** - Gel SDS-PAGE 10% corado pelo nitrato de prata. PM – padrão de peso molecular, 1) Purificado *Vaccinia vírus* cepa WR; 2) Purificado *Vaccinia vírus* BH; 3) e 4) *Vaccinia vírus* cepa WR clarificado.

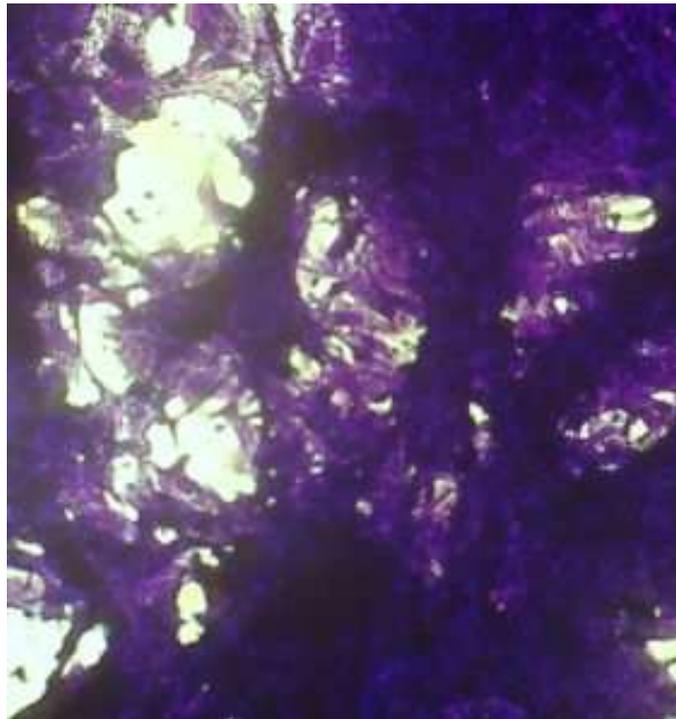


**Figura 8** - Gel SDS-PAGE a 10% corado pelo nitrato de prata. PM – padrão de peso molecular; 1) e 2) Sobrenadante de células Vero infectadas; 3 a 6 Concentrado *Vaccinia vírus* cepa WR.

A



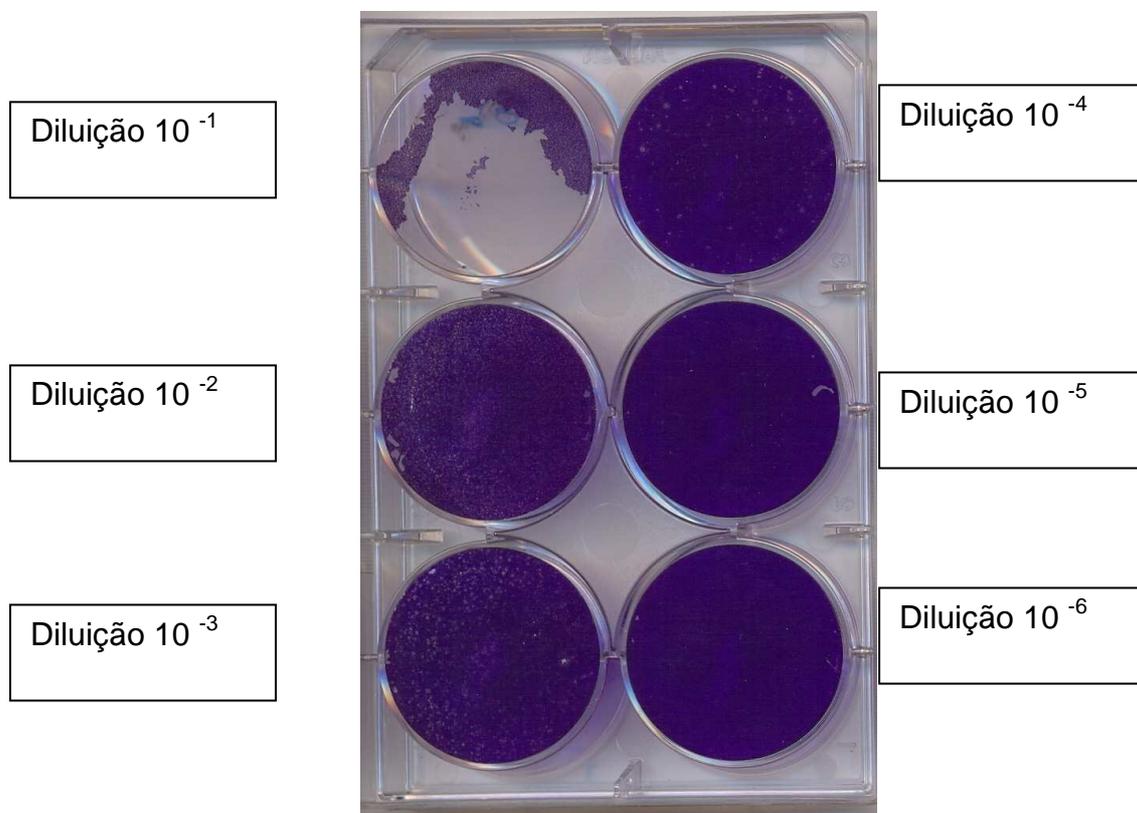
B



**Figura 9** - (A) Células Vero não-infectadas após 48h (B) Células Vero infectadas por VACV WR após 48h, formação de placas de lise, vacúolos, membranas fusionadas, células com aspecto estrelado. Coloração por cristal violeta. Visualização ao Microscópio Óptico Invertido Axiovert 135 M aumento 100X.

#### 6.4 Titulação Viral

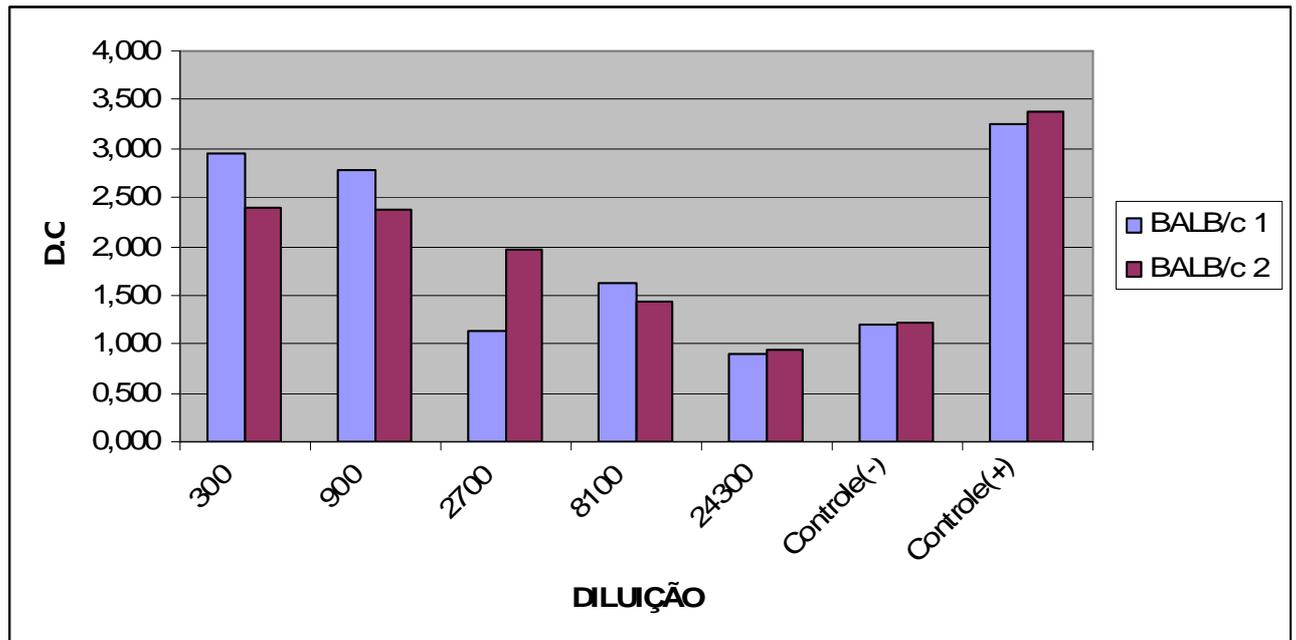
O número de partículas infecciosas numa suspensão pode ser determinado por titulação. A titulação consiste em infectar uma série de culturas celulares com alíquotas de diluições sucessivas da suspensão viral de interesse. Após a incubação durante um período de tempo que permita alguns ciclos de replicação viral, e desde que se assegure que a descendência de cada partícula infecciosa fica imobilizada no meio de cultura e só consiga infectar células vizinhas, podem observar-se placas de lise. As placas de lise são zonas com células destruídas pela infecção e podem ser evidenciadas por coloração das células viáveis com corante vital ( Figura 10 ).



**Figura 10** - Titulação de VACV WR por diluição em série com formação de placas de lise coradas com Cristal Violeta. Diluição viral  $10^{-1}$  ocorreu grande devastação da monocamada devido a lise das células. Diluição viral  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  houve formação de halos pontuais, em maior quantidade quando há maior concentração viral.

### 6.5 Produção de Anticorpos Monoclonais

Camundongos da linhagem Balb/c foram imunizados com purificado *Vaccinia virus WR* como descrito em Material e Métodos. Após 28 dias da imunização, o soro dos animais foi testado por ELISA e a titulação dos anticorpos pode ser analisada pelo gráfico.



**Figura 11** – Titulação de anticorpos anti- *Vaccinia virus WR* (soro de BALB/c coletado após 28 dias da primeira imunização).

Após a verificação da presença de anticorpos específicos anti-*Vaccinia virus* no soro dos animais imunizados, os camundongos foram eutanasiados e as células esplênicas utilizadas para fusão. A fusão teve um resultado bastante satisfatório, sendo que quase todos os poços continham pelo menos uma colônia de hibridoma. No total 392 poços testados por ELISA, 59 hibridomas foram considerados positivos. Desses 12 foram sequencialmente clonados e os outros 47 foram congelados em nitrogênio líquido. Os 12 inicialmente clonados foram testados por ELISA e mostraram-se negativos. Assim, seguidamente, os hibridomas foram descongelados na tentativa de obtenção de um clone único e específico para o reconhecimento de VACV WR (Quadro 5). Nenhum dos clones testados mostrou-se positivo até a última clonagem.

**Quadro 5** : Hibridomas descongelados e seguidamente clonados e testados por ELISA.

HIBRIDOMA	1 <sup>a</sup> CLONAGEM	2 <sup>a</sup> CLONAGEM	3 <sup>a</sup> CLONAGEM
27A4A	-		
27B11H	-		
27C6D	+	-	
27D2C	+	-	
27A1C	-		
27B5G	-		
27C6G	+	-	
27D7F	+	-	
27A6A	-		
27B5H	-		
27C3B	+	-	
27D6H	+	-	
27B6G	+	-	
27A6B	-		
27D6G	+	+	-
27C2C	+	+	-
27C8D	+	+	-
27A8G	+	+	-
27B9B	+	+	-
27B8G	-		
27D12B	-		
27C8C	+	+	-
27A2B	-		
27D3C	-		
27D4D	-		
27D6D	-		
27D8F	-		
27A1G	+	+	-
27A1D	+	+	-
27A6H	+	+	-
27A3D	-		
27A2E	-		

## **6.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão**

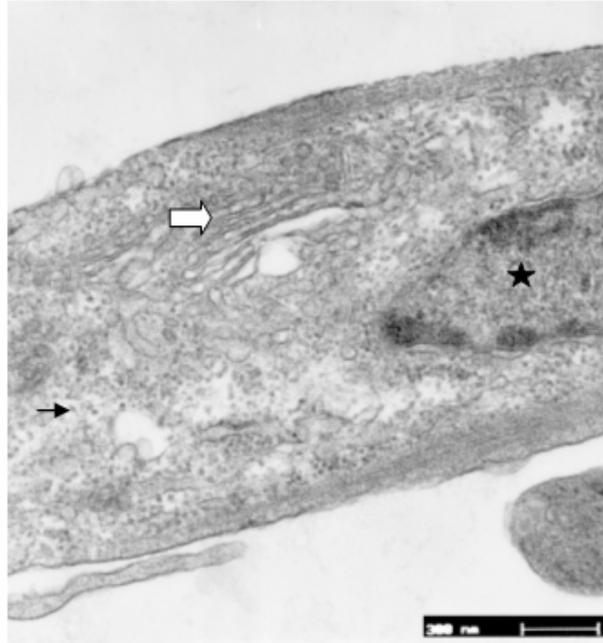
Para avaliar as alterações estruturais causadas pela infecção de células Vero pelo VACV WR, células infectadas foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão em diferentes intervalos de tempo. Essas análises foram realizadas no LBCT (Laboratório de Biologia celular e Tecidual – CBB – UENF) e Laboratório de Virologia – CCS – UFRJ). O resultado mostra a formação de partículas virais e o distúrbio causado pelas alterações celulares em consequência da infecção do VACV às células hospedeiras. Para isso foi colhido amostras de células infectadas em diferentes intervalos de tempo e fixadas. Este tempo variou de 6 horas até 48 horas pós – infecção, tempo este adequado para observar até 90% de efeito citopático.

As imagens de micrografia eletrônica de células Vero não – infectadas após 48 horas de cultivo não mostraram alterações ultraestruturais significativas. O citoplasma apresenta-se pouco denso e o Complexo de Golgi pouco desenvolvido (Figura 12A). Além disso, mitocôndrias apresentavam grande espaçamento entre as cristas (Figura 12B).

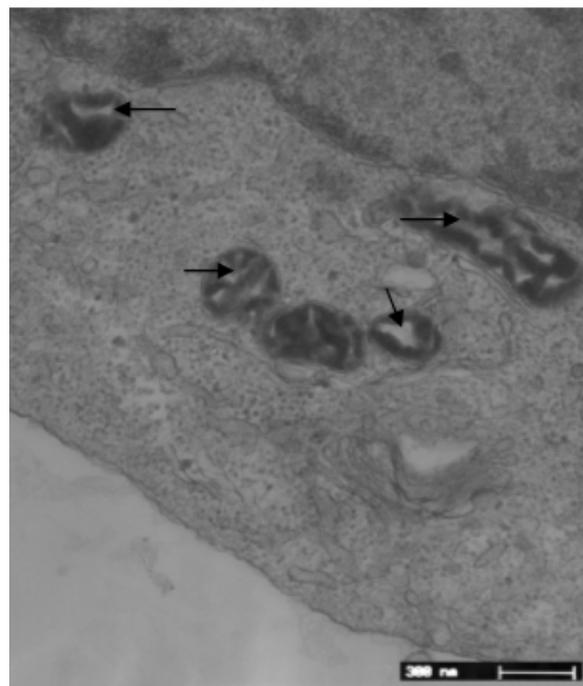
Em células Vero com 6 horas de infecção pelo VACV não foram observadas alterações estruturais significativas, entretanto, é possível observar aumento de partículas densas semelhantes a polissomas (Figura 13). Na Figura 14A podemos observar que em células Vero com 24 horas de infecção as cisternas de Golgi já se apresentavam dilatadas sugerindo maior atividade dessa organela. Nesta mesma micrografia também pode ser observado que muitas mitocôndrias apresentavam o espessamento diminuído entre as cristas, sugerindo que as mitocôndrias apresentam maior atividade nesta fase da infecção. Na figura 14B podemos observar uma estrutura sugestiva de partícula viral imatura com nucleoproteína densa. Já decorridas 30 horas pós – infecção, evidenciou-se o que pôde ser chamado de Virossoma, local onde encontra-se grande quantidade de proteínas virais para formação do vírion intracelular imaturo (IV) (Figura 15A ). Neste tempo também pode ser observado o Complexo de Golgi com raras cisternas dilatadas e as mitocôndrias com cristas mais separadas. Esses aspectos foram similares aos observados nas células controle, sugerindo que estas organelas já estavam se recuperando (15B). Em 36 horas de infecção pôde-se apontar a existência de

vacúolos citoplasmáticos e partículas virais em diferentes fases de maturação, ou seja, partículas virais imaturas e maduras (Figura 16) .

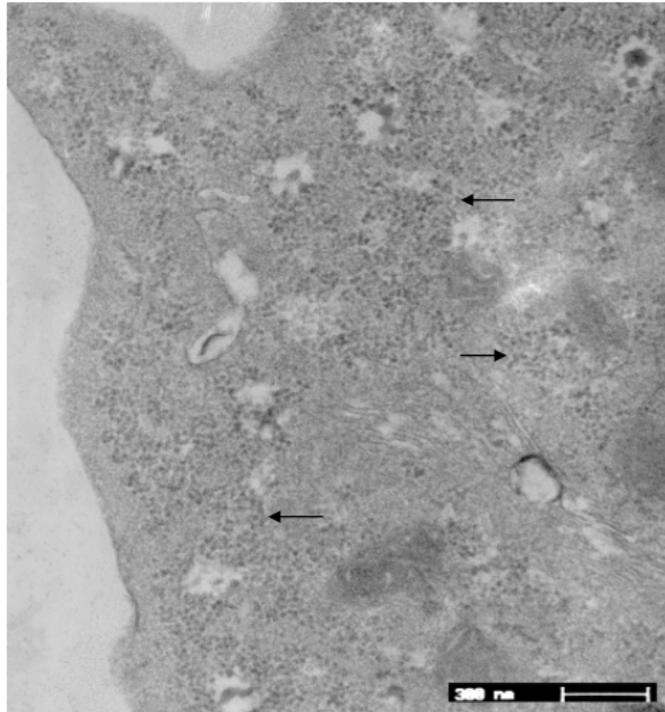
A



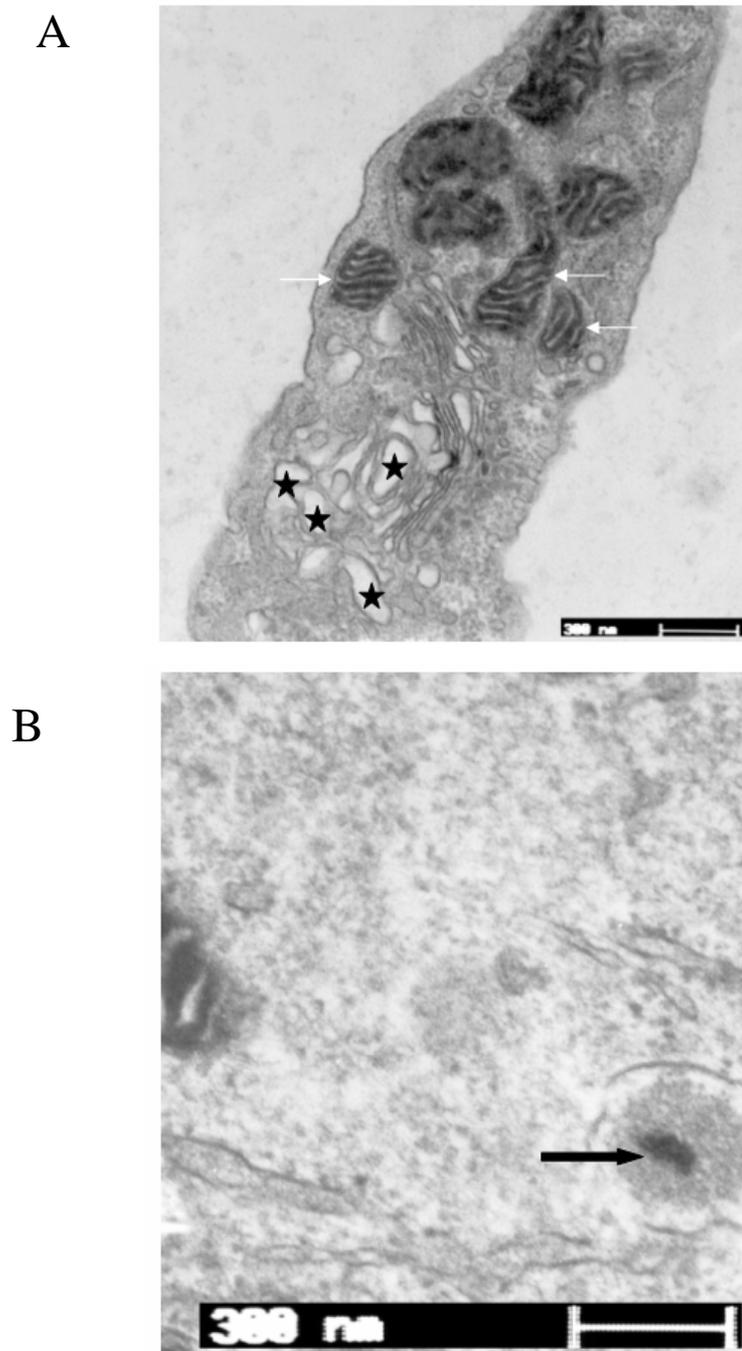
B



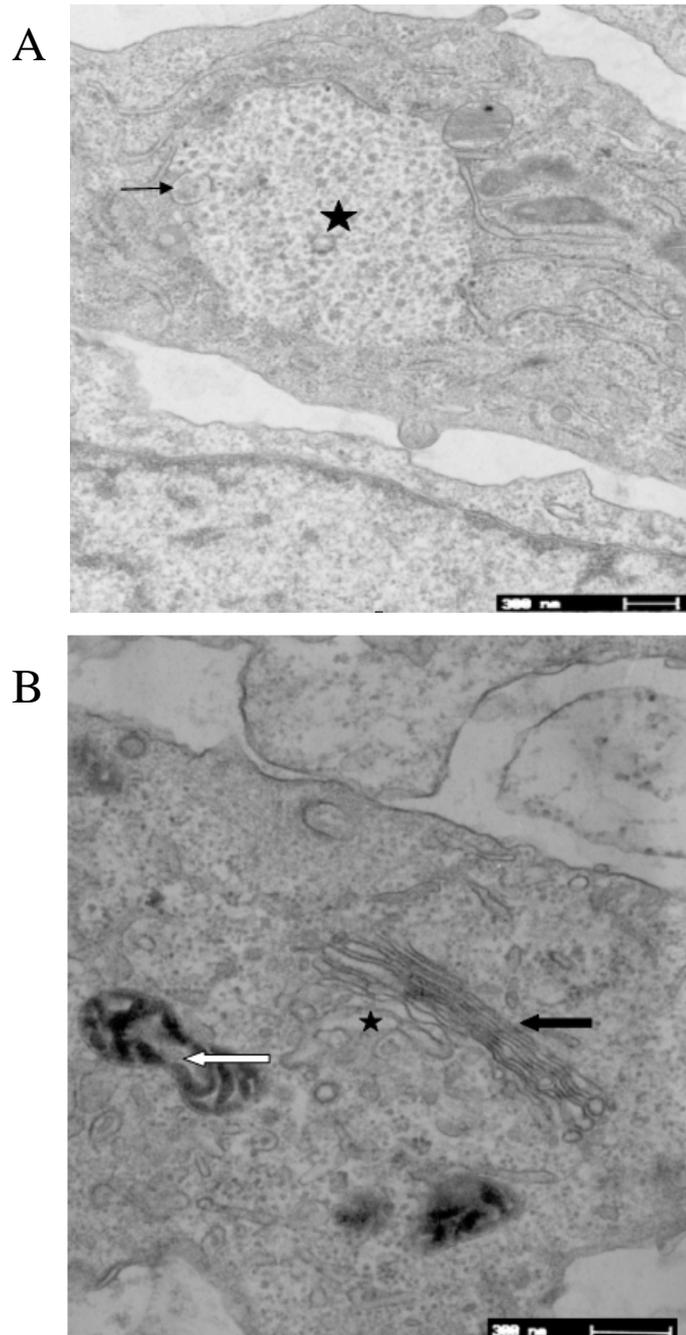
**Figura 12** - Micrografia Eletrônica de Célula Vero Controle (A) Células Vero não infectadas com 48 horas de cultivo. Citoplasma levemente granular (seta), Núcleo (estrela). Cisternas do Golgi pouco desenvolvidas (seta branca). (B) Mitocôndrias com grande espaçamento entre as cristas (setas).



**Figura 13** – Micrografia eletrônica de células Vero com 6 horas de infecção pelo VACV. Células Vero cultivadas em garrafas de 25cm<sup>2</sup> e infectadas com  $4,4 \cdot 10^{12}$  p.f.u. Seis horas após a infecção as células foram fixadas e processadas para Microscopia Eletrônica de Transmissão. Aumento de partículas densas agrupadas (setas).

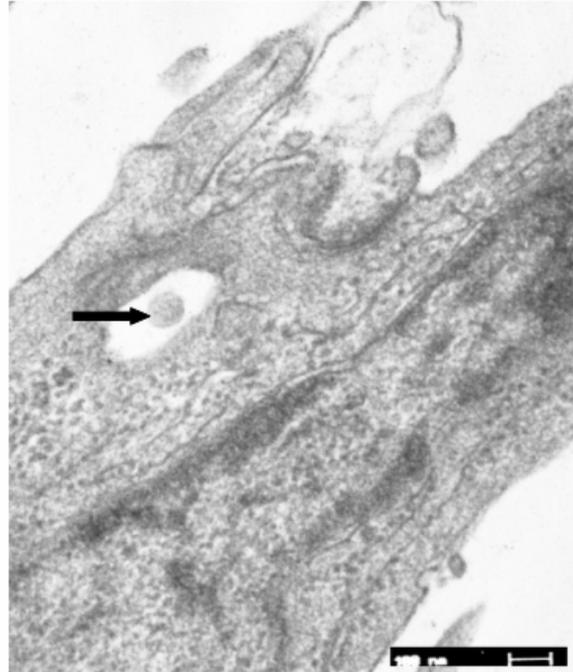


**Figura 14** – Micrografia Eletrônica de células Vero com 24 horas de infecção pelo VACV. Garrafas de 75cm<sup>2</sup> contendo monocamadas de células Vero foram infectadas com  $4,4 \cdot 10^{12}$  p.f.u de VACV. 24 horas após a infecção, as células foram colhidas, fixadas e preparadas para Microscopia eletrônica. (A) Dilatação das cisternas do Golgi (estrelas); mitocôndrias com espessamento diminuído entre as cristas (setas brancas); (B) Estrutura sugestiva de partícula viral imatura e nucleoproteína densa (seta preta).

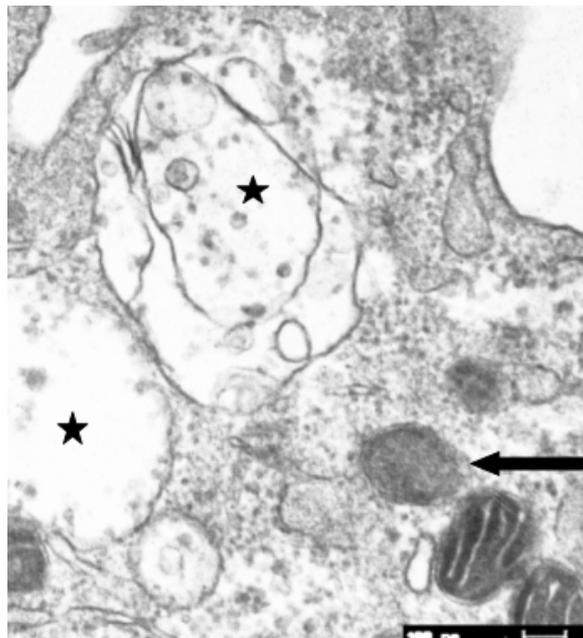


**Figura 15** – Micrografia Eletrônica de células Vero com 30 horas de infecção. Garrafas de 25cm<sup>2</sup> contendo monocamada de células Vero foram infectadas com  $4,4 \cdot 10^{12}$  p.f.u de VACV. (A) Estrutura membranosa crescente (estrela) envolvendo parte do aglomerado citoplasmático de proteínas virais (seta). (B) O complexo de Golgi nesta fase da infecção já recuperou o aspecto observado nas células controle (seta preta) com raras cisternas dilatadas (estrela), o mesmo acontecendo com as mitocôndrias que passam a apresentar cristas mais separadas (seta branca).

A

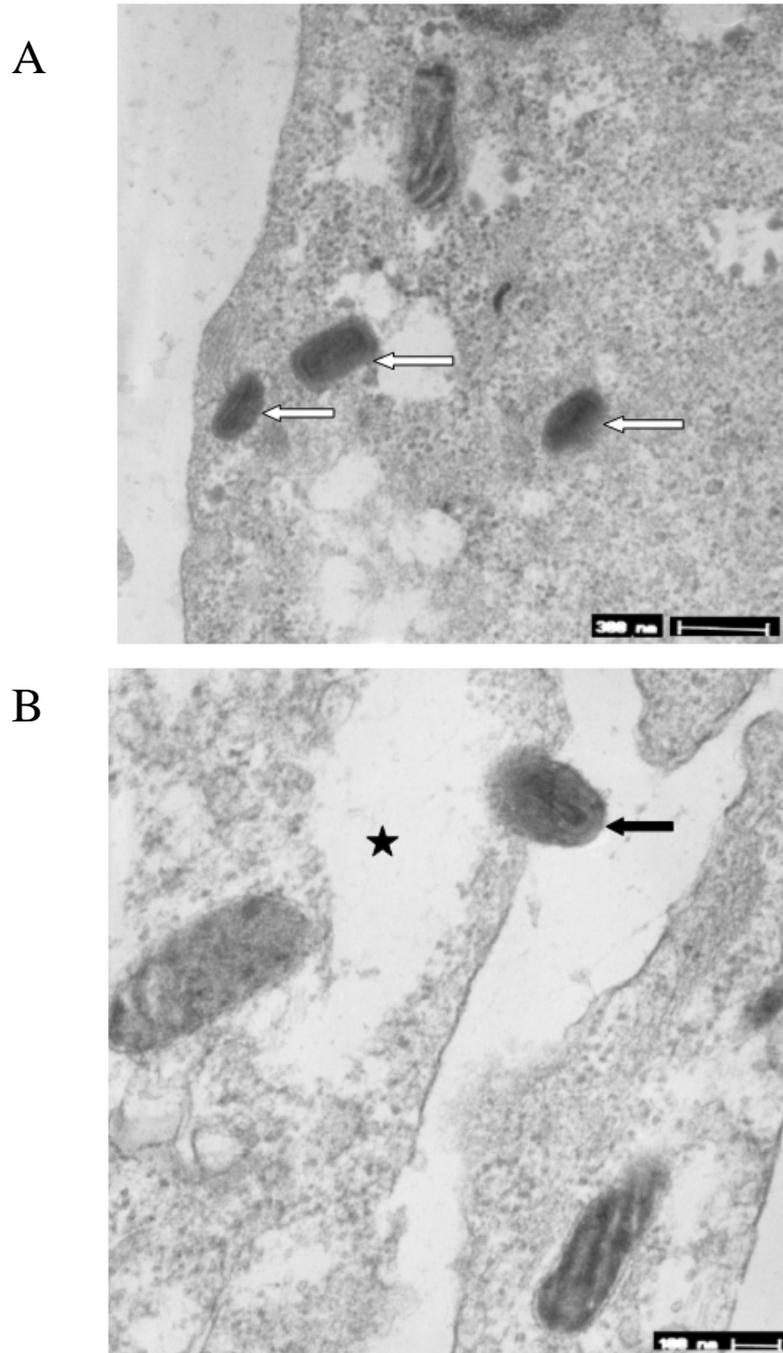


B

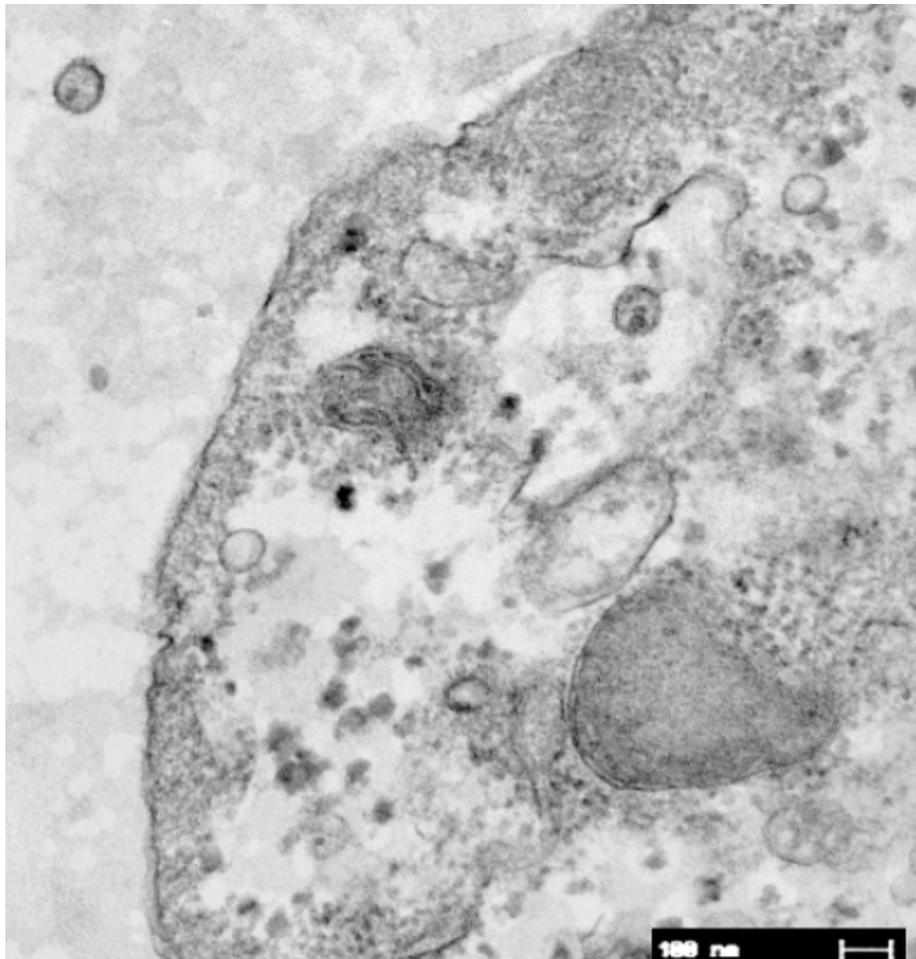


**Figura 16** – Micrografia eletrônica de células Vero com 36 horas de infecção pelo VACV. Garrafas de 25cm<sup>2</sup> contendo monocamada de células Vero foram infectadas com  $4,4 \cdot 10^{12}$  p.f.u de VACV . (A) Partículas virais imaturas (seta preta) . (B) No citoplasma aparecem grandes vacúolos citoplasmáticos que podem conter estruturas membranosas em seu interior (estrela). Partículas virais maduras já podem ser observadas no citoplasma (seta).

Decorrente 42 horas, foi possível destacar maior número de partículas virais maduras com o Core contendo o genoma (Figura 17) e grandes espaços vazios no citoplasma sugerindo grande rearranjo estrutural da célula. Na Figura 17A pôde-se observar várias partículas virais maduras. Pôde-se observar também, partículas virais sendo liberadas para o exterior da célula. Por fim, após 48 horas o citoplasma mostrou-se eletróluscente indicando grande degeneração celular provocado pelos distúrbios metabólicos provocados pela infecção (Figura 18).



**Figura 17** - Micrografia eletrônica de células Vero com 42 horas de infecção pelo VACV. Garrafas de 25cm<sup>2</sup> contendo monocamada de células Vero foram infectadas com  $4,4 \times 10^{12}$  p.f.u de VACV. (A) Aumento na quantidade de partículas virais maduras no citoplasma (setas). (B) As células começam a apresentar citoplasma com grandes espaços vazios (estrela) sugerindo início de degeneração celular e observa-se partículas virais maduras sendo liberadas no meio extracelular (seta).



**Figura 18** – Micrografia eletrônica de células Vero com 48 horas de infecção pelo VACV. Garrafas de 25cm<sup>2</sup> contendo monocamada de células Vero foram infectadas com  $4,4 \times 10^{12}$  p.f.u de VACV. O citoplasma das células torna-se eletróluscente, sugerindo estágio avançado de degeneração celular.



# **DISCUSSÃO**

## 7. DISCUSSÃO

Os poxvirus formam um grupo bastante distinto da maior parte dos vírus que possuem genoma constituído por DNA em função de seu sítio citoplasmático de replicação. Esta característica peculiar é proporcionada por um alto grau de complexidade destes vírus, que possuem um sistema de controle da transcrição praticamente autônomo em relação a célula hospedeira (MOSS, 2001; CONDIT e NILES, 2002). Poucos fatores e/ou moléculas celulares foram descritos até o momento tendo função na regulação da expressão gênica viral. A proteína VITF-2 atua como fator transcricional da fase intermediária (ROSALES et al., 1994) e os fatores VLTF-X e YY1 participam na transcrição dos genes tardios (GUNASINGHE et al., 1998; ZHU et al., 1998; BROYLES et al., 1999; WRIGHT et al., 2001). Notavelmente, para exercer seu papel no ciclo viral, YY1 tem sua distribuição intracelular totalmente rearranjada, sendo translocado do núcleo para os virossomas durante a infecção (BROYLES et al., 1999). Várias evidências mostram que outras etapas do ciclo replicativo também envolvem a participação de algumas proteínas celulares. A participação dos microfilamentos de actina e microtúbulos na progressão do ciclo está bem detalhada na literatura (CUDMORE et al., 1997; PLOUBIDOU et al., 2000; HOLLINSHEAD et al., 2001; WARD E MOSS, 2001) onde evidencia-se o direcionamento das diversas formas maduras do vírus para a saída da célula hospedeira.

A infecção de culturas celulares com *Orthopoxvirus* resulta em extenso Efeito Citopático (ECP), mudanças na permeabilidade da membrana e inibição da síntese do DNA, RNA e de proteínas. Os efeitos sobre a síntese de proteínas são drásticos (CARRASCO e ESTEBAN, 1982). É provável que vários fatores possam direcionar a mudança da síntese de proteínas do hospedeiro para a produção de proteínas virais. A contribuição relativa de cada fator pode depender do processo de replicação viral, do tipo celular, do tempo da análise e do uso de inibidores metabólicos. Algumas experiências sugerem que a inibição da síntese de proteínas do hospedeiro pode acontecer na ausência da expressão do gene viral, implicando, assim, uma proteína na partícula dos *Orthopoxvirus*. Alguns possíveis candidatos a inibidores são as lipoproteínas em forma de túbulos da membrana externa viral (MBUY., 1982), A

fosfoproteína F17R (PERSON-FERNANDEZ E BEAUD, 1986) e a proteína quinase B1R (BEAUD et al., 1994).

No presente estudo, analisou-se a biossíntese da cepa viral do gênero *Orthopoxvirus* em culturas de células Vero, as quais têm sido amplamente utilizadas, por serem susceptíveis às espécies virais do gênero em questão. Estas culturas de células em linhagens contínuas têm sido frequentemente utilizadas no estudo das estratégias de replicação viral, na pesquisa da biologia celular e na produção de grandes massas de antígenos virais.

Nessas culturas celulares, a cepa viral foi replicada em Vero e purificada por ultracentrifugação ocasionou efeito citopático característico de infecção viral, bem como a gradual formação de grande quantidade de sincícios e células gigantes multinucleadas (Figura 5), relacionado com a cinética de infecção e com a quantidade de partículas virais presentes no inóculo, em relação ao número de células em cultura. A multiplicação viral também foi feita em membrana corioalantóide de ovos embrionados e o tipo de lesão foi característico (Figura 6) (FERNANDES et al., 2004)

Este aparecimento gradativo característico do ECP é decorrente da síntese e do acúmulo de proteínas virais, tanto aquelas que irão fazer parte da estrutura viral, como as que participam de algumas etapas da biossíntese viral. Verificou-se que, durante a cinética de infecção viral, inicialmente, as células com morfologia alterada estavam presentes em determinados locais da monocamada celular. Esta alteração morfológica é explicada, principalmente, pela síntese da proteína de fusão (F), que ocasiona a formação de sincícios, através da fusão das membranas citoplasmáticas das células das culturas infectadas (VERARDI et al., 2002).

Tais alterações, restritas a algumas áreas, foram se espalhando por toda a monocamada celular, de acordo com o tempo pós-infecção. A síntese da proteína F e o acúmulo desta proteína fizeram com que, na monocamada, aparecesse um número gradativo de sincícios e estes com números diferentes de núcleos, como pode ser observado em 48 horas pós-infecção.

Além da formação de sincícios, o desenvolvimento da infecção nessas células resultou na vacuolização da monocamada, formando grumos de células aumentadas de tamanho, com aspecto arredondado, estrelado e outros com células alongadas,

com refringência à luz. Verificou-se que as alterações celulares caracterizadas pelos aspectos estrelados, comuns em tempos tardios da infecção, podem ser decorrentes do consumo ou utilização dos nutrientes do meio de cultura, durante a biossíntese viral, como já descrito, anteriormente, em infecções virais de células Vero. Isto porque verificou-se que nas células Vero não-infectadas, com longo tempo sem tripsinização, os nutrientes são totalmente consumidos, apresentando também um aspecto estrelado semelhante ao encontrado nas células Vero infectadas. No entanto, pôde ser observado que, nas culturas de células infectadas, essas formações são compostas de sincícios, enquanto que, nas culturas não-infectadas essas formações de aglomerados de células, bem caracterizados pelos métodos de coloração (RACZ, 2000). Os resultados mostram que a utilização de nutrientes pode não resultar obrigatoriamente no aspecto estrelado observado em células Vero e que essa característica pode ser atribuída ao fato de que as células Vero não produzem interferon quando infectadas, havendo, assim, a propagação da infecção em toda camada celular (FERNANDES et al., 2004; DESMYTER et al, 1968).

Os danos resultantes da infecção por VACV em culturas celulares são devastadores e perceptíveis quando analisados por Microscopia Eletrônica de Transmissão. O ECP é caracterizado pelo aumento da permeabilidade de membrana, vacuolização e inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas. Os distúrbios causados pela inibição da síntese de proteínas são drásticos para a célula. A inicialização da replicação viral e montagem da partícula ainda estão sendo desvendados. A participação ativa do Complexo de Golgi mostra que o arcabouço celular está direcionado a produção de partícula de VACV, o que sugere a Figura 14A (MOSS et al., 2004, HOLLINSHEAD et al., 1998). Em contrapartida, células controle apresentam o Complexo de Golgi pouco ativo (Figura 12A e B). Cristas mitocôndriais apresentam-se dilatadas possivelmente devido ao estresse nutricional decorrente de 48 horas sem troca de meio de cultura. Após 6 horas de infecção o citoplasma da célula hospedeira já apresenta partículas densas agrupadas (Figura 13), o que pode ser característico de início de produção de proteínas estruturais do vírus, região denominada Viroplasma (Virossoma) ou *Viral factory*, envolvido por ribossomas, possuindo corpúsculos de inclusão basofílicos. Decorridas 24 horas pós- infecção evidencia-se a presença marcante de vírus intracelular imaturo com

nucleoproteína densa no seu interior (Figura 14B), bem semelhante aos já descritos por MOSS et al., 2004, HOLLINSHEAD et al., 1998 e FERNANDES et al., 2004). O Virossoma, estrutura que abriga proteínas destinadas a montagem do vírion, pode ser visualizado na Figura 15A com a presença de polirribossomas ao redor. Já no período de 36 horas depois da infecção, a célula hospedeira apresenta grandes vacúolos com estruturas membranosas e possui estrutura sugestiva de partícula viral madura em seu citoplasma (Figura 16B). Ao chegar em 42 horas pós-infecção, células Vero apresentam-se com maior quantidade de partículas virais maduras (IMV) já formadas e se direcionando ao meio extracelular (Figura 17A e B) e, 48 horas de infecção, grande destruição do arcabouço celular normal e citoplasma eletróluscente, como visto na Figura 18.

A montagem da partícula viral inicia-se com a formação de áreas granulares, circunscritas e elétrons – densas no citoplasma como visto na Figura 14B e já relatado por MOSS, et al., 2004. A primeira estrutura morfológicamente diferenciada é um crescente arco formado por membrana com uma borda de espículas no lado côncavo e material granular adjacente ao lado convexo. Vários grupos têm mostrado por micrografias a existência de uma membrana com bicamada sem continuidade com organelas celulares. Não se sabe até então, como que essa membrana é formada *de novo*. Uma possibilidade é que essa membrana seja resultante de elevado processamento de embalagem de um compartimento intermediário localizado entre o Retículo Endoplasmático e o Complexo de Golgi. Esse dado corrobora com o fato dessas organelas estarem mais ativas com 6 horas de infecção (Figura 13). Em estágios subsequentes do desenvolvimento, as membranas crescentes são vírions imaturos com densa massa de nucleoproteína imersa em matrix granular (Figura 14B). As micrografias descritas na literatura, sugerem que a nucleoproteína entra em envelopes imaturos somente antes que eles estejam completamente fechados. O movimento do IMV para fora da área de montagem (a periferia da célula) é dependente de microtúbulos, cauda de actina e requer uma proteína de membrana denominada A27L 14 kDa. Nesse contexto, o intenso rearranjo molecular dos microtúbulos pode explicar o imenso dano no citoplasma da célula hospedeira. As proteínas de vírus envelopados extracelulares (EEV) F13L de 37 kDa, com atividade fosfolipásica e a glicoproteína B5R de 42 kDa também

participam do movimento de IMV à periferia da célula. O índice de liberação de partículas virais varia com diferentes tipos de células hospedeiras e cepa viral de *Vaccinia virus* (Figura 17B).

Até o momento, acredita-se que vários fatores possam levar a mudança de produção de proteínas celulares para produção de proteínas virais. Várias pesquisas têm sido desenvolvidas para explicar, molecularmente, o mecanismo pelo qual a síntese de nucleotídeos e proteínas da célula hospedeira possa mudar tal a ponto que a presença de proteínas de VACV dirija a produção de novas moléculas (MOSS et al., 2004). Assim, este conhecimento poderia orientar o desenvolvimento de novas drogas capazes de inibir o processo de replicação viral.

No Brasil, como em outras partes da América do Sul, pouco se sabe sobre a ocorrência e circulação de poxvírus em animais silvestres. Após a eliminação mundial do vírus da varíola humana na década de 70, alguns relatos de isolamento de poxvírus na América do Sul têm sido publicados, incluindo pesquisas de surtos de *Orthopoxvírus* no rebanho bovino leiteiro e em humanos, bem como de *Parapoxvirus* em rebanhos de ovelhas e cabras e o isolamento de cepas virais em animais selvagens ou de cativeiro (UEDA et al., 1978; ESPOSITO et al., 1980; MAZUR e MACHADO, 1989; FONSECA et al., 1998; DAMASO et al., 2000; MAZUR et al., 2000; TRINDADE et al., 2003). A ocorrência de surtos de varíola do macaco em animais de estimação e em humanos, em contato com estes animais, tem sido constantemente relatada nos EUA. Estes casos foram confirmados pelo isolamento em cultura de células e pelo sequenciamento do DNA das amostras de material biológico provenientes dos animais e de humanos acometidos pela doença. A provável origem dos surtos estava em roedores silvestres infectados, importados da África Ocidental para os EUA (REED et al., 2004).

Nos últimos anos, entretanto, muitos casos de doenças em gado bovino leiteiro, com patologia semelhante, foram relatadas em áreas rurais do Brasil. Algumas infecções humanas foram associadas com essas doenças nos rebanhos. Tais doenças, caracterizadas pelo aparecimento de lesões vesículo-pustulares e/ou nodulares nas tetas de vacas leiteiras, frequentemente, são relacionadas a infecções virais como as causadas pelos VACV, CPXV, PCPV, e vírus da mamilitite herpética bovina (SCHATZMAYR et al., 2000; FERNANDES et al., 2003).

Em nosso país, surtos de doença vesículo-pustular têm ocorrido constantemente em pequenas propriedades produtoras de leite, acarretando sérios prejuízos econômicos e casos cada vez mais graves em humanos. A doença vesículo-pustular típica de poxvírus tem sido clinicamente descrita com o aparecimento de lesões difusas na pele e mucosas, que progridem de máculas para pápulas, vesículas e pústulas antes de formarem crostas e cicatriz (DAMASO et al., 2000; FERNANDES et al., 2003; TRINDADE et al., 2003). A maioria das lesões contém células com múltiplas inclusões intracitoplasmáticas eosinofílicas, que representam o local de replicação viral nas células infectadas (TRIPARTHY et al., 1981; MOSS, 2001). A dúvida inicial era que o provável agente etiológico da infecção no gado bovino leiteiro e humanos fosse o CPXV. Porém, em todos os casos analisados no Brasil até o momento, não foi detectada a presença do CPXV, comprovando assim, o fato de que este vírus persiste somente, em hospedeiros-reservatório silvestres (mamíferos, pássaros e roedores), gado, animais de zoológico, e animais domésticos, incluindo gatos, em partes da Europa e Ásia (TRYLAND et al., 1998; DAMASO et al., 2000).

No Brasil, poucas pesquisas foram direcionadas para detectar a presença e circulação em animais silvestres. Recentemente, entretanto, um número crescente de isolamentos de poxvírus foi obtido a partir de amostras biológicas (líquido vesicular e crostas), provenientes de animais domésticos e silvestres, bem como de humanos. Todos esses relatos mostraram que tais vírus foram relacionados com o VACV e ainda suscitam a questão de o VACV estar ampla e ativamente circulando no país entre animais domésticos e silvestres. Assim, tal acontecimento é semelhante aos relatos de surtos causados por BPXV na Índia e no Sudeste da Ásia (DUMBELL e RICHARDSON, 1993).

Os anticorpos, ou imunoglobulinas, são proteínas encontradas nos fluidos biológicos. Pertencem à família das glicoproteínas e possuem uma estrutura em Y constituída por quatro cadeias polipeptídicas. Cada ramo da parte em V (porção Fab) transporta um sítio ativo complementar de um epítipo, podendo assim cada molécula de anticorpo ligar-se a duas moléculas de antígeno transportando um epítipo idêntico. A porção Fc, não participa diretamente na ligação com o antígeno mas permite a fixação a certas células, à proteína A dos estafilococos e ativa o

complemento, por exemplo. Cada linhagem de linfócito B produz apenas um tipo de anticorpo que reconhece um único epítipo.

Atualmente os anticorpos vêm sendo aplicados em diversas áreas da biologia, inclusive na área biotecnológica, principalmente como ferramentas terapêuticas, imunobiológicos, vacinas, moléculas direcionadoras de drogas entre outras funções.

Anticorpos monoclonais são proteínas homogêneas específicas que são formadas em resposta a um antígeno e que reagem especificamente contra este (STRYER, 1992). Kohler e Milstein em 1975 fusionaram células esplênicas (linfócitos B) de camundongos da linhagem BALB/c. As células obtidas após a fusão foram chamadas de células híbridas ou de hibridomas com células de mieloma (linhagem tumoral). Assim, eles obtiveram uma célula que possuía a capacidade de secretar grandes quantidades de anticorpo contra as hemácias de carneiro. As células de hibridomas retinham a característica das células do mieloma que era o vigor do crescimento indefinido e a das células esplênicas que era a produção de anticorpos.

Gershwint em 1981 descreveu o conceito básico envolvido na obtenção de anticorpo monoclonal a partir da secreção de células de hibridomas. As células esplênicas dos camundongos injetados com o antígeno desejado são fusionadas com linhagem de células de mieloma usando polietilenoglicol. Kelley e Lewin em 1986 verificaram que, logo após a fusão, surgiam os seguintes híbridos celulares: esplenócito-esplenócito, esplenócito-mieloma e mieloma-mieloma. Oi e Herzenberg em 1980 e Kelley e Lewin em 1986 determinaram que, logo após a fusão, as células devem ser transferidas para um meio seletivo contendo hipoxantina, aminopterina e timidina (Meio HAT). A aminopterina bloqueia a via normal da síntese de nucleotídeos, forçando a célula para uma via alternativa que utiliza hipoxantina e a timidina. Kelley e Lewin verificaram que essa via necessitava da enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRT) e que as células de mieloma não fusionadas e as células híbridas mieloma-mieloma não foram capazes de crescer nesse meio. Oi e Herzenberg em 1980 verificaram que as células do baço e as células fusionadas baço-baço morriam em, no máximo, duas semanas quando em cultura celular. As células híbridas mieloma-célula esplênica foram as únicas capazes de sobreviver e crescer utilizando HGPRT. Os clones de células híbridas produtoras de anticorpos específicos para o antígeno, selecionados por testes

imunológicos, são transferidos para novos poços, de forma que, estatisticamente, seja colocada apenas uma célula por poço. Dessa forma, as células que advirem serão filhas ou clones de uma única célula. A especificidade dos vários clones produtores de anticorpos monoclonais são determinados pela sua reatividade ao antígeno específico em questão. Após a caracterização dos anticorpos monoclonais produzidos, as culturas poderão ser produzidas em grandes quantidades *in vitro* ou os hibridomas poderão ser injetados na cavidade peritoneal dos animais da mesma linhagem que forneceram as células esplênicas para a produção de líquido ascítico (Oi e Herzenberg, 1980).

O presente trabalho visou a produção de anticorpos específicos para o reconhecimento de VACV WR. Para tal fim, camundongos BALB/c foram imunizados com purificado VACV WR (produzidos em células Vero) e inativados por luz ultravioleta (UV) numa concentração de  $4,3 \times 10^{11}$  p.f.u seguindo protocolo de imunizações já descritos (KANASHIRO, et al., 1999). Após o período de imunizações foi dado uma dose de reforço e os animais foram eutanasiados para obtenção dos esplenócitos e realização da fusão. O produto da fusão foi distribuído em 4 placas de 96 poços. Sendo que houve formação de hibridomas na maioria dos poços. O meio de cultura contido em cada poço foi testado frente ao antígeno de células Vero e VACV WR no *screening* por ELISA. Um total de 59 hibridomas demonstraram positividade ao reconhecimento do vírus. Partiu-se, então, para a clonagem de 12 hibridomas selecionados e o restante foi congelado em nitrogênio líquido. Como demonstrado no Quadro 1, 32 clones foram submetidos a fase inicial de clonagem, sendo que nenhum clone foi viável ao reconhecimento de VACV até a última clonagem.

Os resultados obtidos podem ser conseqüência da baixa concentração de proteína viral que foi utilizada nas imunizações dos animais. Após a fusão, 12 hibridomas viáveis foram clonados e, posteriormente, alguns foram responsivos ao antígeno de células Vero e outros contaminaram. Hibridomas inicialmente positivos foram perdendo a capacidade de produzir anticorpos específicos devido a uma provável desestabilização do metabolismo celular quando mantidas em cultura. O purificado viral VACV utilizado como antígeno uma vez que foi produzido em Vero pode ter adquirido antígenos celulares (KRAUSS, et al., 1999) e os anticorpos

responsivos dos animais tiveram reconhecimento aos sítios de ligação do antígeno de Vero . Esses dados demonstraram que os anticorpos obtidos no processo seriam inviáveis para a sua caracterização e para a padronização do Kit sorológico por ELISA pretendidos no estudo.

Aparentemente, a amostra viral utilizada nas imunizações apresentou um grande repertório de proteínas, constituindo-se de material impuro. Em outros trabalhos, as imunizações foram realizadas utilizando-se material com repertório de proteínas específico (CZERNY *et al.*, 1996). Esse dado pode corroborar para possíveis alternativas que viabilizariam a produção de anticorpos monoclonais contra sítios antigênicos específicos de VACV WR, como a glicoproteína B5R do vírus envelopado extracelular (EEV) (CARROL, *et al* , 2004). Estes pesquisadores produziram grande quantidade de proteína solúvel de B5R VACV WR através de um sistema de vetor de expressão baculovírus. As imunizações foram feitas utilizando 50µg de glicoproteína solúvel B5R.

Através de um protocolo de imunizações utilizando material viral em quantidade suficiente, é possível obter uma resposta positiva dos anticorpos frente à VACV WR. A partir disso, partiria-se para caracterização dos anticorpos e padronização do Kit diagnóstico por ELISA que é, por sua vez, de grande importância médica e veterinária.



# **CONCLUSÕES**

Os resultados aqui apresentados nos permitem concluir que:

- ✓ Células Vero infectadas com VACV WR seguindo metodologia já descrita, causou o mesmo Efeito Citopático (ECP) característico de outros trabalhos , onde se viu que 90% da monocamada celular fora acometida.
- ✓ Hibridomas após terem sido clonados não mantiveram o reconhecimento específico para antígeno de VACV WR, inviabilizando-os para experimentos subseqüentes. A construção do Kit de imunodiagnóstico por ELISA, portanto, não foi possível.
- ✓ Micrografias eletrônicas de VACV WR, em células Vero infectadas, nos permitiram evidenciar detalhadamente o Efeito Citopático em nível celular , a dinâmica dos distúrbios metabólicos à célula e o ciclo replicativo viral até a formação da partícula viral envelopada extracelular.

# **BIBLIOGRAFIA**

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S (2003) *Imunologia celular e Molecular* 4.ed. Rio de Janeiro.

ACHA, P.N., SZYFRES, B. (1986) VIROSIS. IN: *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. Organizacion Panamericana de la Salud, Publicación Científica n. 503, p. 297-551.

BEAUD, G., SHARIF, A., TOPAMASS, A., LEADER, D.P (1994) Ribossomal-protein S2/ SA kinase purified from HeLa cells infected with vaccinia virus corresponds to the B1R protein-kinase and phosphorylates in vitro the viral ssDNA-binding protein. *J Gen. Virol.*, 75: 283-293.

BEAUD, G., BEAUD, R. (1997) Preferential virosomal location of underphosphorilated H5R proetein synthesized in vaccinia virus infected cells. *Journal of General Virology*, 78 p. 3297-3302.

BEHBEHANI, A.M (1995) Poxviruses. Diagnostic procedures for viral , ricketisial and clamydial infections. *American Public Health Association* , p. 511-520.

BOWIE, A., KISS-TOTH, E., SYMONS, J.A., SMITH, G.L., DOWER, S.K., O'NEILL, L.A.J. (2000) A46R e A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. USA, 97:10162-10167.

BORGES, F.V (2005) Estudo da especificidade de dois anticorpos monoclonais utilizados na imunossexagem de espermatozóides de bovinos. Monografia apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia/UENF.

BROOKS, G.F., BUTEL, J.S., MORSE, S.A. (2000) Poxvírus. In: Microbiologia Médica. 21.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 330-339.

BROYLES,S.S ., LIU,X., ZHU, M., KREMER, M. (1999) Transcription factor YY1 is a vaccinia vírus late promoter activator. J. Biol. Chem., 274: 35662-35667.

CARRASCO,L.,BRAVO,R., (1986) Specific Proteins Synthesized during the viral litic cycle in vaccinia vírus – infected Hela Cells:analysis by high resolution , two dimensional gel eletroforesis. Journal of Virology ,p. 569-577.

CARRASCO, L., ESTEBAN, M. (1982) Modification of membrane permeability in vaccinia virus-infected cells. Virology, 117: 62-69.

CARROL, A. L., MOSS, B., COHEN, G.H (2004) Epitope- mapping studies define two major neutralization sites on the Vaccinia virus extracellular enveloped virus glycoprotein B5R. Journal of Virology, p. 6260-6271.

CHUNG,C.S; CHENG,C.H;HO,M.Y(2005) Vaccinia virus proteome:identification of proteins in vaccinia virus intracell.J. Virol. (2006) p. 2127-2140.

CONDIT, R.C., NILES, E.G (2002) Regulation of viral transcription elongation and termination during vaccinia virus infection. Biochim. Biophys. Acta, 1577: 325-336.

CUDMORE, S., RECKMANN, I., WAY, M. (1997) Viral manipulations of the actin cytoskeleton. Trends in Microbiol., 5: 142-148.

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

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

DESMYTER, J., MELNICK, J.L., RAWLES, W.E (1968) Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in line of African green monkey kidney cells (Vero). *J. Virol.*, 2 955-961.

DOMI, A., BEAUD, G. (2000) The punctate sites of accumulation of Vaccinia virus early proteins are precursors of sites of viral DNA synthesis. *Journal of General Virology* 81, 1231-1235.

DONATELE, D.M (2005) Estudo epidemiológico do surto da poxvirose humana e bovina no Estado do Espírito Santo. Tese Doutorado UENF.

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

ESPOSITO, J.J., BAXBY, D., BLACK, D.N., DALES, S., DARAI, G., DUMBELL, K.R., GRANADOS, R.R, JOKLIK, W.K., MCFADDEN, G., MOSS, B., MOYER, R.W., PICKUP, D.J., ROBINSON, A.J., TRIPATHY, D.N. ICTVdB: The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses; [Http://www.ictvdb.iacr.ac.uk/lctv.html](http://www.ictvdb.iacr.ac.uk/lctv.html) em 01/07/05.

ESPOSITO, J.J., PALMER, E.L., BORDEN, E.C., HARRISON, A.K., OBIJESKI, J.F., MURPHY, F.A (1980) Studies on the poxvirus Cotia. *J. Gen. Virol.*, 47:37-46.

ESPOSITO, J.J., FENNER, F. (2001) Poxviruses. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p 2885-2921.

ESTEBAN, M (1987) Structural and Functional Studies of a 39,000 Mr Immunodominant Protein of Vaccinia virus.

FERNANDES, ANDRÉ T. DA SILVA (2004): Isolamento e identificação por microscopia óptica e eletrônica de transmissão, de orthopoxvirus em gado bovino leiteiro e em humanos no Norte do Estado do Rio de Janeiro.

FERNANDES, A.T. S., TRAVASSOS, C.E.P.F, KROON, E.G. (2009) Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. *Journal of Clinical Virology* 44, p. 308-313.

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

FENNER, F. (1996) Poxviruses. In: FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., (eds.) *Fields Virology*. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, V.2, p. 2673-2682.

FAGLIARI, J.J., PASSIPIERI, M., OKUDA, H.T.F. (1999) Relato sobre ocorrência de pseudovariola em vacas lactantes e ordenhadores do município de Aparecida do Tabuado, MS. In: *Anais do Congresso Brasileiro de Buiatria*, 3. Arquivos do Instituto Biológico, v. 66, p.128.

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

GALMICHE, M.C., GOENAGA, J. (1999) Neutralizing and protective antibodies directed against Vaccinia virus envelope antigens. *Virology*, 254 p.71-80.

GERSHWIN, L. J. (1981) Hybridomas : The production of monoclonal antibodies. *California Veterinarian* , 10:31-33.

GUIDO, C.L., ESPER, G.K. (2002) Varíola, sua prevenção vacinal e ameaça como agente de bioterrorismo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 48(4): 357-362.

GUNASINGHE, S.K., HUBBS, A.E., WRIGHT, C.F (1998) A vaccinia virus late transcription factor with biochemical and molecular identity to a human cellular protein. *J.Biol. Chem.*, 273: 27524-27530.

HAGA, I.R (2005) Evasion of innate immunity by vaccinia virus. *Parasitology Cambridge Univ. Press*.

HARRISON, S.C., ALBERTS, B., MOSS, B. (2004) Discovery of antivirals against smallpox. *PNAS August* , 3 vol.101, número 31.

HARRIS J.S, LARSEN S.B, and MCPHERSON A. (1999) Comparison of intact antibody structures and the implications for effector functions. *Advances in Immunology* 72 : 191-208.

HOLLINSHEAD, M., RODGER, G., VAN EIJL, H., LAW, M., HOLLINSHEAD, R., VAUX, D.J., SMITH, G.L (2001) Vaccinia virus utilizes microtubules for movement to the cell surface. *J. Cell. Biol.*, 154: 389-402.

HOLLINSHEAD, M., VANDERPLASSCHEN, A. (1998) Vaccinia virus Intracellular Mature Virions Contain only one lipid membrane. *Journal of Virology* p. 1503-1517.

HRUBY, D.E., GUARINO, L.A., KATES, J.R (1979) Vaccinia virus replication. I. Requirement for the host-cell nucleus. *J.Virol.*, 29: 705-715.

HUSTON J.S, and GEOGE A.J (2001) Engineered antibodies take center stage. *Human antibodies* 10:127-142.

ICHIHASHI,Y.(1994) N-terminal Aminoacid sequences of Vaccinia virus Structural proteins. *Virology* 202844-852.

JENSEN, O.N (1996) Identification of the major membrane and core proteins of vaccinia virus by two dimensional gel eletroforesis. *Journal of Virology*, 1996.

JOKLIK, W.K (1964) The intracellular uncoating of poxvirus DNA.II. the molecular basis of the uncoating process. *J. Mol. Biol.* 8: 277-288.

JONES, S.L. (2004). Zoonotic poxvirus infections in humans. *Currente Opinion in Infectious Diseases*, 17:81-89.

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

LEFKOWITZ, E.J (2006) Poxvirus: past, present and future. *Virus Research* 117 105-118.

KELLEY, K.W., LEWIN, H.A (1986) Monoclonal antibodies: Pragmatic application of immunology and cell biology.*Journal Animal Science*, 63: 289-309.

KOHLER ,G . MILSTEIN ,C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975.

J Immunol. 2005 Mar 1;174(5):2453-5.

KRAUSS, O., HOLINSHEAD, R., SMITH, G.L (2002) An investigation of incorporation of cellular antigens into Vaccinia virus particles. Journal of General Virology 83 p. 2347-2359.

KURODA, Y., YOSHIDA, M., SHIBAHARA, T., MATSUI, T., NAKANE, T., HARA, H., INOSHIMA, Y., SENTSU, H. (1999). An epidemic of parapoxvirus infections among cattle: Isolation and antibody survey. *J. Vet. Med. Sci.* 61(7): 749-753.

LAW, M., SMITH, G.L (2001) Antibody neutralization of the extracellular enveloped form of vaccinia virus. *Virology*, 280 p. 132-142.

LEITE, J.A. (2003) Isolamento, identificação e caracterização molecular de Orthopoxvirus isolados em um surto de varíola bovina em Passatempo-MG. Dissertação de Mestrado em Microbiologia - Belo Horizonte/MG. Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 83 p.

LIEBERMANN, H. (1999) Infecções por vírus da varíola. In: BEER, J. Doenças infecciosas dos animais domésticos. 2.ed. São Paulo: Roca, p.338-346.

LOBATO, Z.I.P., FROIS, M.C., TRINDADE, G.S., GUEDES, M.I.M.C., KROON, E.G. (2004) Varíola bovina: zoonose reemergente avança em Minas Gerais. V&Z em Minas, Revista do Conselho Regional de Medicina Veterinária de Minas Gerais, 83:18-20.

MAZUR, C., MACHADO, R.D (1989) Detection of contagious pustular dermatitis vírus of goats in a severe outbreak. *Vet. Rec.*, 125: 419-420.

MAZUR, C., FERREIRA, I.I., RANGEL FILHO, F.B., GALLER, R (2000) Molecular characterization of Brazilian isolates of orf virus. *Vet. Microbiol.*, 73: 253-259.

MBUY, G.N., MORRIS, R.E., BUBEL, H.C. (1982) Inhibition of cellular protein synthesis by vaccinia virus surface tubules. *Virology*, 116: 137-147.

MEYER, H., ROOP, S.L. ESPOSITO, J.J. (1997) Gene for A-type inclusion body protein is useful for a polymerase chain reaction assay to differentiate *Orthopoxvirus*. *Journal Virological Methods*, 64:217-221.

MOSS, B. (1996) *Poxviridae: the viruses and their replication*. In: FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., (eds.) *Fields Virology*. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, V.2, p. 2637-2671.

MOSS, B., SHISLER, J.L. (2001) Immunology 101 at poxvirus: Immune evasion genes. *Seminars in Immunology*, 13:59-66

MURPHY, F.A., GIBBS, E.P.J., HORZINEK, M.C., STUDDERT, M.J. (1999) Poxviridae. In: MURPHY, F.A., GIBBS, E.P.J., HORZINEK, M.C., STUDDERT, M.J., (eds.) *Veterinary Virology*, 3.ed. San Diego: Academic Press, p. 277-291.

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 Sao Paulo and Goias States, Brazil: virus detection, isolation and identification. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 46(6):315-22.

OI,V.T., HERZENBERG,L.A (1980) Immunoglobulin secreting hybrid cell lines. In Mishell, B.B and S.M Shiigi, (eds) Selected methods in cellular immunology. San Francisco: Freeman an Co., p351-372.

OIE, K.L., PICKUP, D.J. (2001) Cowpox virus and other members of the orthopoxvirus genus interfere with regulation of NF- $\kappa$ B activation. *Virology*, 288:175-187.

PAYNE, L.(1978) Polypeptide compositionof extracelular enveloped vaccinia virus.J. *Virol.*27:28-37.

PERSON-FERNANDEZ, A., BEAUD, G (1986) Purification and characterization of a protein synthesis inhibitor associated with vaccinia virus. *J.Biol.Chem.*, 261: 8283-8289.

PLOUBIDOU, A., MOREAU, V., ASHMAN, K., RECKMANN, I., GONZALEZ, C., WAY , M. (2000) Vaccinia virus infection disrupts microtubule organization and centrossome function. *Embo J.*, 19: 3932-3944.

RACZ, M.L (2000) Viral cytopathic effect in cell culture – vaccinia virus. *American Society for microbiology*.

REED, K.D., MELSKI, J.W (2004) The detection of monkeypox in humans in the western hemisphere. *N. Engl. J.Med.*, 350:342-350.

ROPP, S.L., JIN, Q.I., KNIGHT, J.C. MASSUNG, R.F., ESPOSITO, J.J. (1995) PCR strategy for identification and differentiation of smallpox other and orthopoxviruses. *Journal Clinical Microbiology*, 33:2069-2076.

ROBERTS, L. K., SMITH, G.L (2008) Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. Trends in Microbiology Vol.16.

ROSALES, R., SUTTER, G., MOSS, B. (1994) A cellular factor is required for transcription of vaccinia viral intermediate – stage genes. Proc. Natl. Acad.Sci., 91:3794-3798.

SCHATZMAYR, H.G., LEMOS, E.R.S., MAZUR, C., SCHUBACH, A., MAJEROWICZ, S., ROZENTAL, T. , SCHUBACH, T.M.P., BUSTAMANTE, M.C., BARTH, O.M. (2000) Detection of poxvirus in cattle associated with human cases in the State of Rio de Janeiro: Preliminary Report. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 95 (5): 625-627.

SCHATZMAYR, H.G. (2001) A varíola, uma antiga inimiga. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 17(6):1525-1530.

SILVA, L.J. (2001) Guerra biológica, bioterrorismo e saúde pública. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 17(6):1519-1523.

SILVA, R.A., MORAES, LT. (1960) Nota sobre a ocorrência de varíola bovina no Estado do Rio de Janeiro. Estudo da doença no município de Três Rios. *Veterinária*, 14:31-35

SILVA, L.J (2001) Guerra biológica, bioterrorismo e saúde pública. Cad. De Saúde Pública V.17 n.6 Rio de janeiro 2001.

SMITH, G.L., LAW, M. (2004) The exit of Vaccinia virus from infected cells. *Virus Research* 16, p. 189-197.

STRYER, L. (1992) *Bioquímica* . 3 ed., Guanabara Koogam, Rio de Janeiro, p.881.

TAKAHASHI, T., OIE, M., ICHIHASHI, Y. (1994) N-terminal Amino Acid sequences of Vaccinia Virus Proteins. *Virology* 202, 844-852.

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

TRYLAND, M., SANDVIK, T., MEHI, R., BENNET, M., TRAAVIK, T., OLSVIK, O. (1998) Serological evidence for orthopoxvirus infection in Norwegian rodents and shrews. *J. Wildl. Dis.*, 34: 240-250.

TRIPARTHY, D.N., HANSON, L.E., CRANDELL, R.A. (1981) Poxviruses of veterinary importance: Diagnosis and infections. In: KURSTAK, E., KURSTAK, C. (eds.). *Comparative Diagnosis of Viral Diseases*, New York: Academic Press, v. 3.

UEDA, Y., TSURUHARA, K.R., TAGAYA, T. (1978) Studies on Cotia virus – an unclassified poxvirus. *J. Gen. Virol.*, 40: 263-276.

ULAETO, D., GROSENBACH, D., HRUBY, D. (1996) The vaccinia virus and A-type inclusion proteins are specific markers for intracellular mature virus particles. *Journal of Virology*. 70:3372-77.

VERARDI, P.H., AZIZ, F.H., AHMAD, JONES, L.A., BEYENE, B., NGOTHO, R.N., WAMWAYI, H.M., YESUS, M.G., EGZIABHER, B.G., YILMA, T.D. (2002) Long-term sterilizing immunity to rinderpest in cattle vaccinated with a recombinant vaccinia virus expressing high levels of the fusion and hemagglutinin glycoproteins. *J. Virol.*, 76:484-491.

WARD, B.M., MOSS, B. (2001) Vaccinia virus movement is associated with microtubules and independent of actin tails. *J. Virol.*, 75: 11651-11663.

WRIGHT, C.F., OSWALD, B.W., DELLIS, S. (2001) Vaccinia virus late transcription is activated in vitro by cellular heterogeneous nuclear ribonucleoproteins. *J. Biol. Chem.*, 276: 40680-40686.

WELBLEN, R. (2002) Vaccinia – varíola bovina e pseudovaríola. *Revista CFMV*, Brasília, 26:37-43.

YAGER, J.A. SCOTT, D.W (1993) The skin and appendages. *Pathology of domestic animals*. San Diego: Academic Press, p. 531-738.

ZHU, M., MOORE, T., BROYLES, S.S (1998) A cellular protein binds vaccinia virus late promoter and activates transcription in vitro. *J. Virol.*, 72: 3893-3899.

# 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](#)