

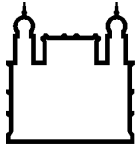
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**Mapeamento imunológico de epítomos lineares de células B
do vírus vaccínia, homólogos ao vírus varíola**

Jessica Joy Mokfienski

Rio de Janeiro
2007



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

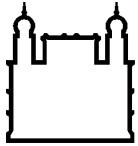
Jessica Joy Mokfienski

**Mapeamento imunológico de epítomos lineares de células B
do vírus vaccínia, homólogos ao vírus varíola**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador (es): Prof. Dr. Salvatore Giovanni De Simone
Prof. Dr. Hermann Gonçalves Schatzmayr

Rio de Janeiro, 01 de junho de 2007



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Jessica Joy Mokfienski

**Mapeamento imunológico de epítomos lineares de células B
do vírus vaccínia, homólogos ao vírus varíola**

Orientador (es): Prof. Dr. Salvatore Giovanni De Simone
Prof. Dr. Hermann Gonçalves Schatzmayr

Aprovada em: 01 de junho de 2007

Examinadores:

Prof. Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho

Prof. Dra. Joseli de Oliveira Ferreira

Prof. Dra. Bartira Rossi Bergmann

Prof. Dra. Cristiane Diniz Ano Bom

Prof. Dr. Floriano Paes Silva Júnior

Rio de Janeiro, 01 de junho de 2007

Esta dissertação foi desenvolvida sob orientação dos Drs. Salvatore Giovanni De Simone e Hermann Gonçalves Schatzmayr, no Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, com o apoio financeiro do IOC e CNPq.

Aos meus pais, Alfredo Mokfienski e Dorothy L. Mokfienski,
pelo seu amor incondicional.

Pela forma como me criaram, pela educação que me
deram, pelas oportunidades que me ofereceram, pelo apoio em
todo momento, por acreditarem e se orgulharem de mim.

Vocês são os melhores exemplos de vida que eu poderia
ter.

Love you, always!

*Suba alto; Suba longe. Seu objetivo é o céu; Seu
alvo, as estrelas.*

Inscrição no Williams College

Pegadas na Areia

Uma noite eu tive um sonho...

*Sonhei que estava andando na praia com o Senhor,
e através do Céu, passavam cenas de minha vida.*

*Para cada cena que passava,
percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia;
um era o meu e o outro do Senhor.*

*Quando a última cena de minha vida passou diante de nós,
olhei para trás, para as pegadas na areia,
e notei que muitas vezes no caminho da minha vida
havia apenas um par de pegadas na areia.*

*Notei também que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiosos da
minha vida.*

Isso aborreceu-me deveras, e perguntei então ao Senhor:

"Senhor, Tu me disseste que, uma vez que eu resolvi Te seguir,

*Tu andarias sempre comigo, todo o caminho, mas notei que
durante as maiores atribulações do meu viver havia na areia dos caminhos da
vida, apenas um par de pegadas.*

Não compreendo porque nas horas em que eu mais necessitava de Ti,

Tu me deixastes". O Senhor respondeu:

*Meu precioso irmão, Eu te amo e jamais te deixaria nas horas da tua prova e
do teu sofrimento.*

*Quando vistes na areia apenas um par de pegadas, foi exatamente aí que
EU TE CARREGUEI EM MEUS BRAÇOS".*

Margaret Fishback Powers

AGRADECIMENTOS

Aos pesquisadores Drs. Salvatore Giovanni De Simone e Hermann G. Schatzmayr pelo exemplo de profissionalismo e dedicação a pesquisa científica e por possibilitar meu desenvolvimento intelectual e a elaboração desta pesquisa. Meu respeito, admiração e agradecimento.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica (CNPq) pelo apoio financeiro.

Agradeço a todas as pessoas envolvidas direta ou indiretamente nesta pesquisa. Um especial agradecimento a todos os integrantes do DBBM que muito contribuíram para meu trabalho, minha adaptação ao Rio de Janeiro e a Fiocruz e que já fazem parte de muitas lembranças e realizações.

As secretárias Elizângela, Patrícia e Denilde por toda ajuda nos trabalhos burocráticos. A Cleide e Daniele por todas as dicas e apoio durante todo o processo de realização desta dissertação.

Ao curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular pela confiança em mim depositada.

A Tathiane Santos De Simone, por toda incondicional ajuda em tudo a que foi ou não requisitado, se tornando uma amiga e um exemplo. Pela força desde sempre, pelos toques, brigas, risadas e principalmente por todos os materiais emprestados.

Ao Herbert Leonel Guedes pelas inúmeras discussões, idéias e incentivos. Por sua grande ajuda nos trabalhos envolvendo modelagem molecular. Obrigada por abrilhantar ainda mais minha dissertação de mestrado.

Ao Bruno Rodrigues Simonetti por toda a disponibilidade e apoio durante esses dois anos, sempre muito atencioso e prestativo. Obrigada pela companhia durante as várias horas no processo de purificação viral, o que permitiu o enriquecimento dos resultados.

Ao estudante Lian Felipe, por ter me acompanhado durante o meu primeiro ano de mestrado ajudando na padronização de diversas técnicas e principalmente no meu desenvolvimento como orientadora.

A estudante de iniciação científica, Danielle Cunha, por toda ajuda conferida durante os trabalhos experimentais e escritos.

Ao Dr. José Pascoal Simonetti, laboratório de Núcleo de Retrovírus, por disponibilizar prontamente a ultracentrífuga para purificação do vírus.

A Dra. Ortrud Monika Barth Schatzmayr, Laboratório de Ultra-estrutura Viral, pelos trabalhos em microscopia eletrônica.

Ao Sr. José da Costa Filho, pelas culturas de poxvírus.

Aos Drs. Heinrich Gausepohl e Ole Brandt, da “Intavis Bioanalytical Instruments” pelo treinamento em instalação e operação do robô AutoSpot, fornecido nas dependências da empresa, Laboratório de Síntese Peptídica, Intavis, Alemanha. Pelas discussões e idéias sugeridas, e por sempre responderem prontamente aos meus questionamentos sobre a metodologia.

Ao Dr. Ronald Frank, do Centro de Pesquisa Alemão para Biotecnologia (German Research Centre for Biotechnology), por permitir o aprendizado de metodologias inovadoras em seu laboratório.

A galera responsável pela esterilização dos materiais do departamento.

A toda equipe do LBPP: Cristiane, Bruno, Antônia Lúcia, Genival, André Luís, Nathália, Thaísa, Isabel, Willian, Michelle, Floriano, Cissa, Beatriz por toda ajuda direta ou indireta durante este trabalho. Especialmente pelos inúmeros momentos engraçados e de descontração, e pelo enorme apoio e incentivo nas horas difíceis.

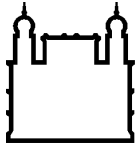
Aos que não integram mais a equipe do LBPP, mas que também contribuíram muito para a realização deste projeto: Cristiane Salles, Luís André e Mônica Álcón.

Aos meus irmãos, Jayme Alfredo Mokfienski e Lianne Joy Mokfienski, por todo apoio emocional.

Ao meu melhor amigo, Rodrigo Figueiredo, por ser meu porto seguro aqui no Rio de Janeiro.

Aos meus amigos Anna Beatriz, Mayra, Fernanda, Eduardo, Fernanda Mendes, Daniela, Pedro, Gabriel, Michele, Cibele, Carlos, Samuel, que rechearam esses últimos anos de muitas alegrias e foram fundamentais para meu conforto emocional durante esta trajetória.

E, principalmente, à minha família.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mapeamento imunológico de epítomos lineares de células B de vírus vaccínia, homólogos ao vírus varíola

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jessica Joy Mokfienski

A Varíola, uma doença endêmica por mais de 3000 anos e com alta taxa de mortalidade no mundo inteiro, foi erradicada em 1977 através de uma intensa campanha de vacinação usando o vírus vaccínia (VVAC), antígenicamente relacionado ao vírus varíola (VVAR). Ambos pertencem à família Poxviridae, gênero *Orthopoxvirus* e seus genomas compartilham de grande homologia. Importantes respostas de anticorpos estão dirigidas às proteínas de superfície das duas principais formas infecciosas de poxvirus, o vírus intracelular maduro (VMI) e o vírus extracelular envelopado (VEE).

Neste trabalho foram mapeados 27 epítomos lineares de células B do VVAC, homólogos ao VVAR, das principais proteínas responsáveis pela imunidade protetora humoral conferida pela vacina a Varíola. As proteínas B5R, H3L, L1R e A33R de VVAC foram selecionadas baseando-se no padrão de reatividade de soros de indivíduos infectados pelo vírus cantagalo (VCTG) em experimentos de western blotting e a identificação dos epítomos utilizando bibliotecas peptídicas compostas por 419 seqüências obtidas pela metodologia de Spot-synthesis.

Sete epítomos lineares foram identificados na proteína B5R de VEEs, sendo seis reatores cruzados e um reator específico aos soros de indivíduos infectados por VCTG. Dez epítomos lineares foram identificados na proteína H3L de VMIs, sendo oito reatores cruzados e dois reatores específicos aos soros de indivíduos infectados. Sete epítomos lineares foram identificados na proteína L1R de VMIs, sendo seis reatores cruzados e um reator específico ao soro de indivíduos infectados. No entanto, dos quatro epítomos lineares identificados na proteína A33R de VEEs, todos foram reatores tanto com o soro de indivíduos normais quanto ao soro de indivíduos infectados com VCTG. As análises de modelagem molecular empreendidas neste estudo identificaram que três dos quatro epítomos específicos ao VVAC estão dispostos na superfície das moléculas e fazem parte de regiões não estruturadas (coil) e um em região estruturada (alfa hélice). Sessenta e três por cento da predição teórica, por métodos computacionais, de regiões que correspondem a possíveis epítomos foram confirmados pelas análises experimentais empregando bibliotecas peptídicas. Além disso, neste estudo definimos estruturalmente todos os 27 epítomos lineares.

Embora tenhamos identificado vários epítomos B das principais proteínas imunogênicas, aparentemente específicos para vaccínia-varíola, outros estudos imunológicos devem ser realizados para nos certificarmos da especificidade. Independente deste fato, as informações obtidas neste estudo poderão ser úteis para o desenvolvimento de futuras terapias mais efetivas, baseadas em anticorpos para infecções por *Orthopoxvirus* e possivelmente para o desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para infecções por *Orthopoxvirus* e ou vaccínia-varíola.

ABSTRACT

Smallpox, an endemic disease for more than 3000 years, with a high fatality rate, was eradicated in 1977 during an intense vaccination campaign using vaccinia virus (VVAC), antigenically related to variola virus (VVAR). Both of them belong to de Poxviridae family, genera *Orthopoxvirus*, and share great homology in their genomes. Important antibody responses are directed to surface proteins of the main infectious forms of poxvirus, intracellular mature virus (IMV) and extracellular enveloped virus (EEV).

In this study, 27 linear B cell epitopes of the main proteins of the VVAC responsible for humoral immunity conferred by smallpox vaccine were mapped. The B5R, H3L, L1R and A33R proteins from VVAC were selected basing on the reactivity pattern of sera from individuals infected with cantagalo virus (VCTG) in Western blotting experiments and the identification of the epitopes using peptide libraries composed of 419 sequences, obtained by the Spot-synthesis method.

Seven linear epitopes were identified on VEEs B5R protein, six of them were cross reacted and one reacted specifically to sera from individuals infected with VCTG. Ten linear epitopes were identified on IMVs H3L protein, eight of them were cross reacted and two reacted specifically to sera from infected individuals. Seven linear epitopes were identified on IMVs L1R protein, six of them were cross reacted and one reacted specifically to sera from infected individuals and, although four linear epitopes were identified on the EEVs A33R protein, all of them cross reacted with normal sera and with sera from individuals infected with VCTG. Molecular modeling analysis performed in this study identified that three of the four linear VCTG specific epitopes are disposed on the surface of the molecules and are part of non-structured regions (coil) and one of them is located on a structured region (alfa-helice). Sixty three percent of the teoric prediction of regions that possibly correspond to epitopes were confirmed by the experimental analyses using peptide libraries. In addition, in this study we defined structurally all of the 27 linear epitopes identified.

Even though we have identified several linear B cell epitopes of the main immunogenic proteins, apparently specific to vaccinia-variola viruses, other immunologic studies must be performed to certify their specificity. Independently of this fact, the information obtained in this study will be useful for the future development of more effective therapies based on antibodies to *Orthopoxviruses* infections and possibly for the development of a rapid diagnostic test for *Orthopoxvirus* infections or for vaccine-variola.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS = Síndrome da imunodeficiência humana
CDC = Centers for Disease Control and Prevention
CTG = complexo trans-Golgi
DCM = diclorometano
DMF = dimetilformamida
DNA = ácido desoxiribonucléico
EGPA-SDS = eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
HIV = vírus da imunodeficiência humana
IgG = imunoglobulina do tipo IgG
OMS = Organização Mundial da Saúde
ORFs = “pautas abertas de leitura”
Realtime-PCR = reação em cadeia pela polimerase em tempo real
RM = rede de microtúbulos
SCR = seqüências consenso, curtas e repetidas
SDS = dodecil sulfato de sódio
SFB = soro fetal bovino
SPOT = Spot-synthesis, síntese em ponto
TFA = ácido trifluoroacético
TTBS = Tampão Tris-HCl 150 mM, pH 7.2, contendo 0,2% de Tween 20
VBP = vírus bufalopox
VCTG = vírus cantagalo
VEC = partícula viral envelopada associada à célula
VEE = vírus envelopado extracelular
VI = partículas virais imaturas
VIE = vírus intracelular envelopado
VIG = imunoglobulina anti-VVAC
VMI = vírus maduro intracelular
VMPX = monkeypox vírus
VVAC = vírus vaccinia
VVAR = vírus varíola

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1 Aspectos patológicos da infecção por vírus variola (VVAR)	4
Figura 2 Visão geral da morfogênese do vírus vaccínia (VVAC).....	12
Figura 3 Vaccínia progressiva no local de vacinação	18
Figura 4 Predição de possíveis regiões de reconhecimento por anticorpos através do programa DNASTAR.....	28
Figura 5 Comparação da estrutura primária da proteína B5R de VVAC com a proteína B6R de VVAR	29
Figura 6 Comparação da estrutura primária da proteína A33R de VVAC com a proteína A33R de VVAR.....	29
Figura 7 Comparação da estrutura primária da proteína H3L de VVAC com a proteína H3L de VVAR.....	30
Figura 8 Comparação da estrutura primária da proteína L1R de VVAC com a proteína L1R de VVAR.....	30
Figura 9 Imagem do vírus cantagalo purificado (VCTG) obtida por microscopia eletrônica.....	31
Figura 10 Reatividade do soro de indivíduos vacinados (V1 a V8) com extrato protéico viral (VTCG), por western blotting.....	32
Figura 11 Reatividade do soro de indivíduos e bovinos infectados pelo VCTG ao extrato protéico viral, por western blotting	34
Figura 12 Reatividade de um “pool” de soro humano infectado por VCTG ao extrato protéico viral, por western blotting.	35
Figura 13 Caracterização dos epítomos da proteína B5R de VVAC.	37
Figura 14 Refinamento das seqüências dos epítomos B5R-SEQ1 ⁽²⁰⁻⁴⁴⁾ e B5R-SEQ2 ⁽⁷⁴⁻⁹⁸⁾ usando sobreposição de 5 resíduos.....	39
Figura 15 Comparação das seqüências epitópicas B5R-EP1 ⁽³⁵⁻⁴⁴⁾ e B5R-EP2 ⁽⁸³⁻⁹²⁾ da proteína B5R de VVAC com suas homólogas em VVAR.....	40
Figura 16 Modelagem molecular da proteína B5R de VVAC.....	41
Figura 17 Localização espacial dos epítomos B5R-EP1 ⁽³⁵⁻⁴⁴⁾ e B5R-EP1 ⁽⁸³⁻⁹²⁾ na estrutural tridimensional da proteína B5R.....	42
Figura 18 Caracterização dos epítomos da Proteína A33R de VVAC.....	43
Figura 19 Caracterização dos epítomos da proteína H3L de VVAC.....	45
Figura 20 Reanálise da caracterização dos epítomos da proteína H3L de VVAC.....	46
Figura 21 Refinamento das seqüências dos epítomos H3L-SEQI ⁽⁶⁵⁻⁸³⁾ , H3L-SEQII ⁽⁹⁸⁻¹²²⁾ , H3L-SEQIII ⁽¹⁰⁹⁻¹⁴⁰⁾ e H3L-SEQIV ⁽²⁴⁵⁻²⁸¹⁾ usando sobreposição de 7 resíduos.	49

Figura 22	Refinamento das seqüências dos epítomos H3L-SEQI ⁽⁶⁵⁻⁸³⁾ , H3L-SEQII ⁽⁹⁸⁻¹²²⁾ , H3L-SEQIII ⁽¹⁰⁹⁻¹⁴⁰⁾ e H3L-SEQIV ⁽²⁴⁵⁻²⁸¹⁾ usando sobreposição de 5 resíduos.	50
Figura 23	Confirmação da especificidade imunológica dos peptídeos H3L-EP1 ⁽⁷⁴⁻⁸³⁾ e H3L-EP2 ⁽¹⁰³⁻¹¹²⁾ da proteína H3L ao VVAC	51
Figura 24	Comparação das seqüências epitópicas H3L-EP1 ⁽⁷⁴⁻⁸³⁾ e H3L-EP2 ⁽¹⁰³⁻¹⁰²⁾ da proteína H3L de VVAC com suas homólogas em VARV.....	51
Figura 25	Caracterização dos epítomos da proteína L1R de VVAC.....	52
Figura 26	Refinamento das seqüências dos epítomos L1R-SEQI ⁽¹¹⁻²⁹⁾ , L1R-SEQII ⁽⁹³⁻¹¹¹⁾ e L1R-SEQIII ⁽²²⁸⁻²⁴⁷⁾ usando sobreposição de 5 resíduos.....	54
Figura 27	Comparação das seqüências epitópicas L1R-EP1 ⁽¹⁶⁻²⁵⁾ e L1R-EP2 ⁽²²⁸⁻²⁴²⁾ da proteína L1R de VVAC com suas homólogas em VARV.....	55
Figura 28	Localização espacial dos epítomos L1R-EP1 ⁽¹⁶⁻²⁵⁾ e L1R-EP2 ⁽²²⁸⁻²⁴²⁾ na estrutura tridimensional da proteína L1R.....	56

LISTA DE TABELAS

		página
TABELA 1	Comparação da antigenicidade da proteína B5R predita pelo algoritmo de Jameson e Wolf com a identificação imunológica pelo método e SPOT.....	38
TABELA 2	Comparação da antigenicidade da proteína A33R predita pelo algoritmo de Jameson e Wolf com a identificação imunológica pelo método de SPOT.....	44
TABELA 3	Comparação da antigenicidade da proteína H3L predita pelo algoritmo de Jameson e Wolf com a identificação imunológica pelo método de SPOT das Figs 19 e 20.....	47
TABELA 4	Comparação entre as regiões imunodominantes identificadas nos experimentos das Figs. 19 e 20.....	48
TABELA 5	Comparação da antigenicidade da proteína L1R predita pelo algoritmo de Jameson e Wolf com a identificação imunológica pelo método de SPOT.....	53

ÍNDICE

	página
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A Doença	1
1.2 Agente etiológico.....	2
1.3 Patogenia e manifestações clínicas.....	3
1.4 Diagnóstico.....	5
1.5 Potencial agente de bioterrorismo	5
1.6 Emergência de outros <i>Orthopoxvirus</i>	6
1.7 <i>Orthopoxvirus</i> no Brasil	7
1.8 Vírus vaccínia, a vacina contra a Varíola	9
1.9 Proteínas Imunogênicas	13
1.10 Prevalência de anticorpos anti-VVAR	16
1.11 Efeitos colaterais da vacina para a Varíola	16
1.12 Futuras vacinas para a Varíola	19
1.13 Vacinas peptídicas sintéticas	20
1.14 Justificativa	21
2. OBJETIVO	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Análise computacional	23
3.2 Células, vírus e purificação	23
3.3 Soros e anticorpos monoclonais	23
3.4 Dosagem de proteína	24
3.5 EGPA-SDS.....	24
3.6 Western blotting	24
3.7 Síntese de peptídeos	25
3.8 Imunoensaios	25
3.9 Análise dos “spots” nas membranas.....	25
3.10 Mapeamento tridimensional epítomos	26
4. RESULTADOS	27
4.1 Predição de epítomos	27
4.2 Alinhamento de seqüências	27
4.3. Caracterização do vírus por microscopia eletrônica	31
4.4 Avaliação da capacidade reativa de soro de indivíduos vacinados às proteínas de VCTG por Western blotting	31
4.5 Avaliação da capacidade reativa de soro de pacientes e animais infectados pelo VCTG por Western blotting	33
4.6 Mapeamento de epítomos	36
4.6.1 Mapeamento de epítomos da proteína B5R de VVAC	36
4.6.2 Mapeamento de epítomos da proteína A33R de VVAC	43
4.6.3 Mapeamento de epítomos da proteína H3L de VVAC	45
4.6.4 Mapeamento de epítomos da proteína L1R de VVAC	52
5. DISCUSSÃO	57
5.1 Identificação dos Epítomos e Especificidade pelo Método SPOTs	57
5.2 Soro “normal” e sua Reatividade	60
5.3 Correlação entre os Métodos Computacionais e os Resultados Experimentais	60
5.4 Importância dos Epítomos	61
6. CONCLUSÕES	62
7. REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

a. A Doença

A varíola é uma doença infecciosa causada pelo vírus varíola (VVAR), e se divide em duas formas principais: a varíola “major”, com 30% de letalidade, e a varíola “minor”, também conhecida como alastrim, que era mais comum e tinha 1% de casos fatais (também existiam manifestações mais raras da doença, como a hemorrágica e a maligna). Essas enfermidades são causadas por *Orthopoxvirus variolae*, pertencentes à família Poxviridae, que inclui vírus causadores das formas variantes da doença em animais, próprias do gado bovino (a varíola bovina), dos macacos, das galinhas e dos camelos (Geddes, 2006).

A origem da varíola, como a de diversas outras doenças, é cercada de mistérios do tempo. A época mais provável do início de sua disseminação ocorreu quando o homem passou a organizar-se em comunidades e começou a viajar. No livro “varíola e sua erradicação” da Organização Mundial da Saúde (OMS), o seguinte comentário é feito: “É impossível fazer mais do que supor sobre o berço da varíola, a qual deve ter se desenvolvido como doença humana em algum tempo quando a agricultura irrigada permitiu que populações humanas crescessem bastante, talvez há uns 6000 anos” (Fenner *et al.*, 1988). A varíola estabeleceu-se na Índia, China e Europa enquanto as cidades cresciam e se desenvolviam, com epidemias que mataram mais de 30% das pessoas infectadas. No início do século XV, a exploração e colonização europeia resultou na introdução da infecção no Caribe e na América Central, de onde se disseminou para o México, Peru e Brasil. No final do século XVI, foi uma causa importante de doença e morte na Europa, sudoeste da Ásia e China. Nos séculos XVIII, disseminou-se pela Europa, África e Américas. A varíola causou inúmeras epidemias, aniquilou populações inteiras (como diversas tribos de índios brasileiros) e mudou o curso da história. Em meados do século XVIII, foi considerada uma doença endêmica no mundo inteiro, com exceção da Austrália. Ao final do século XIX, a forma mais branda da doença, Alastrim, apareceu nas Américas e na África do Sul (Geddes, 2006).

No dia 14 de maio de 1796, o médico inglês Edward Jenner retirou pequena quantidade de fluido das mãos de uma camponesa e inoculou em um jovem de oito anos. Com o tempo, constatou-se que a criança havia se tornado imune à varíola. Jenner realizou esse experimento após observar que pessoas antes infectadas com o vírus da varíola bovina (bem mais branda) nunca manifestavam a varíola humana: estava descoberta a vacina contra a enfermidade. No entanto, Jenner não foi o primeiro a desenvolver um modo de imunização contra a varíola. Muito antes (por volta do ano 1000), a medicina tradicional chinesa já utilizava um método que consistia em extrair o pus das vesículas em estágio avançado de um doente e inoculá-lo em jovens fortes e saudáveis. Normalmente, esses indivíduos adquiriam formas brandas da doença e a seguir tornavam-se imunes a ela. Seja como for, a descoberta de Jenner mudou a história da imunologia – a própria palavra vacina vem do latim *vaccinus*, de *vacca* (vaca) (Fenner *et al.*, 1988).

Posteriormente, novos conhecimentos e técnicas foram introduzidas e foi aprimorada a fabricação da vacina para a varíola que passou a conter formas vivas do vírus vaccinia (VVAC), de origem misteriosa, pertencente à mesma família do VVAR, porém muito menos agressivo. O programa de erradicação (1966-1980) compreendeu uma mobilização coordenada e internacional que incluía a padronização de vacinas, das técnicas de vacinação, diagnóstico laboratorial e abordagens para o controle de surtos. Este programa foi considerado um dos grandes sucessos na história da saúde pública (Barquet & Domingo, 1997). Em 1980, a OMS declarou a varíola erradicada mundialmente (Fenner *et al.*, 1988).

b. Agente etiológico

O VVAR pertence ao gênero *Orthopoxvirus*, da família Poxviridae, que são os maiores e mais complexos vírus que infectam humanos. Uma série de poxvírus pode causar doenças em humanos, incluindo os vírus molluscum contagium, vaccínia e monkeypox vírus (VMPX) (Fenner *et al.*, 1988; Henderson *et al.*, 2004). A maior parte dos outros *Orthopoxvirus* estão restritos a hospedeiros animais, ainda que alguns possam causar lesões localizadas em humanos (Fenner *et al.*, 1988). Existe uma proteção cruzada substancial entre poxvírus do mesmo gênero, o que permitiu a erradicação da varíola através da vacinação com o VVAC (Fenner *et al.*, 1988; Henderson *et al.*, 2004). As duas variantes do VVAR – varíola “major” e varíola “minor” – diferem clinicamente (Fenner *et al.*, 1988; Geddes, 2006) e podem ser distinguidas em laboratório pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) (Ropp *et al.*, 1995).

A varíola foi erradicada antes do advento da tecnologia molecular moderna, mas grandes avanços tomaram espaço e os genomas de várias cepas do VVAR foram concluídos (Massung *et al.*, 1994; Shchelkunov *et al.*, 1995; Shchelkunov *et al.*, 2000). Até o presente momento, apenas algumas das 200 proteínas codificadas pelo seu genoma foram totalmente caracterizadas (Rubins *et al.*, 2004). Um dos grandes interesses no estudo dos poxvírus (VVAR) está focado em sua capacidade de burlar o sistema imune do hospedeiro. O que se sabe é que os poxvírus produzem uma gama de proteínas que modulam a resposta imune, tanto inata quanto adaptativa, do hospedeiro: inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IFN, IL-1), complemento, quimiocinas, expressão de receptores celulares (MHC-I e MHC-II) e a apoptose das células infectadas, interferindo nas vias de transdução (Seet *et al.*, 2003).

c. Patogenia e manifestações clínicas

O vírus entra no corpo humano através do trato respiratório e implanta-se nas células epiteliais da orofaringe e na mucosa pulmonar. Essas células são os locais de acúmulo do vírus e de sua replicação ativa. No início da infecção os pacientes são altamente contagiosos através da transmissão aérea, devido à elevada concentração de partículas virais existentes no início do trato respiratório (Henderson, 1999).

Depois de se instalar no trato respiratório o vírus migra para os nódulos linfáticos, onde continua a replicar-se. Este passo está associado com a viremia primária, assintomática, que ocorre 3 a 4 dias depois da infecção. Depois deste pequeno período de viremia existe um período de latência de 4 a 14 dias, durante o qual os vírus se multiplicam no sistema reticuloendotelial (Fenner *et al.*, 1988), fornecendo uma janela imunológica com a oportunidade de vacinação (Fenner *et al.*, 1988; Massoudi *et al.*, 2003) e a possibilidade de profilaxia com antivirais (Bray e Roy, 2004).

No final do período de incubação (12º ao 14º dia), o vírus migra para locais de crescimento das células imunes, onde se replica nos leucócitos maduros. Cerca de 24h após a infecção dos órgãos do sistema imune é liberada uma elevada concentração de vírus para a circulação sanguínea, levando a uma viremia secundária (Fenner *et al.*, 1988). Durante esta fase, as membranas mucosas da boca e da faringe são infectadas. O vírus invade o epitélio capilar da camada dérmica da pele, levando ao desenvolvimento de lesões. Essas primeiras lesões dérmicas progridem para lesões vesiculares e posteriormente pustulares (ao fim do 8º ou 9º dia do aparecimento das primeiras lesões), que se formam preferencialmente na face e nas extremidades e que

gradualmente cobrem o corpo inteiro (Henderson, 1999). As pústulas permanecem durante cinco a oito dias criando posteriormente uma crosta. Nesta fase pode ocorrer uma pequena elevação da temperatura, principalmente se o paciente sofrer uma infecção bacteriana oportunista. As lesões têm uma distribuição centrífuga e periférica e geralmente encontram-se todas no mesmo estágio de desenvolvimento (Fig. 1A e B). Clinicamente, esta fase é designada de prodromal e caracteriza-se por erupções cutâneas e sintomas como febre elevada (cerca de 40°C), dores de cabeça, mal-estar e prostração (Fenner *et al.*, 1988).

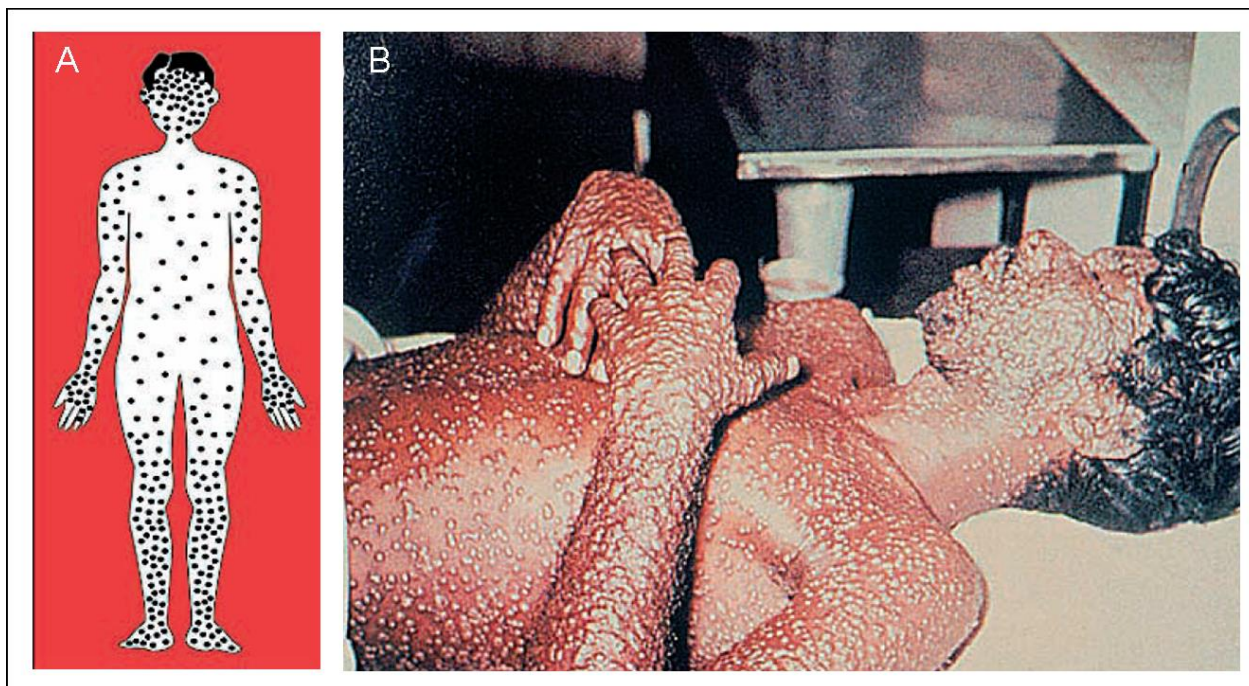


Figura 1. Aspectos patológicos da infecção por VVAR (A) Distribuição centrífuga e periférica das lesões epidérmicas. (B) Caso típico de infecção pelo vírus varíola (Moore *et al.*, 2006).

As lesões na orofaringe e na pele contêm partículas virais em abundância, particularmente no início da doença. Os vírus também se encontram presentes na urina e nas secreções da conjuntiva, com níveis decrescentes durante a convalescença. O desenvolvimento da infecção sistêmica da varíola fatal está associado com a coagulação intravascular disseminada, hipotensão e colapso cardiovascular. Na varíola hemorrágica esses eventos são exacerbados pela falha na coagulação sanguínea e o vírus permanece detectável no sangue do paciente até sua morte (Fenner *et al.*, 1988).

d. **Diagnóstico**

O diagnóstico laboratorial do *Orthopoxvirus* pode ser feito a partir do isolamento viral em membrana clorolantóide de embrião de galinha, microscopia eletrônica (Fenner *et al.*, 1988 e Shchelkunov *et al.*, 2005), sorologia e por técnicas de biologia molecular. A detecção de ácido desoxiribonucléico (DNA) de *Orthopoxvirus* ou especificamente do VVAR pode ser feita por meio da reação em cadeia pela polimerase em tempo real (Realtime-PCR) (Nitsche *et al.*, 2004; Olson *et al.*, 2004).

e. **Potencial agente de bioterrorismo**

Classificada como uma das enfermidades mais devastadoras da história da humanidade, a varíola foi considerada erradicada pela OMS em 1980. No entanto, a doença voltou às manchetes de jornal, em virtude da suposição de que ela possa ser utilizada como arma biológica.

O vírus varíola “major” é considerado um potencial agente de bioterrorismo porque causa uma doença altamente contagiosa que se dissemina facilmente de pessoa para pessoa, é extremamente resistente aos agentes físicos externos, como por exemplo, variações de umidade e temperatura e pode ser facilmente produzido em larga escala (Shchelkunov *et al.*, 2005). Além disso, tem sido mostrado que o VVAR é capaz de disseminar-se por distâncias consideráveis em forma de aerossol e que a infecção pode ocorrer mesmo em pequenas doses virais (Henderson, 1998).

A varíola foi a primeira e única doença erradicada com sucesso no mundo. O paradoxo da situação atual é que a vitória triunfante sobre a doença e o cancelamento mundial da vacinação rotineira contra a varíola após 1980 resultou num aumento gradual do volume da população humana suscetível ao vírus, aumentando assim a ameaça do VVAR como um potencial agente de bioterrorismo (Bray & Buller, 2004).

Atualmente apenas dois laboratórios oficiais armazenam o VVAR sob condições estritamente seguras e inspecionados pela OMS – o CDC [Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, GA, USA)] e State Research Center of Virology and Biotechnology Vector (Koltsovo, Novosibirsk oblast, Russia) (Shchelkunov *et al.*, 2005). No entanto, é possível que fontes potenciais do VVAR ainda existam em algum laboratório ou até na natureza (Roizman *et al.*, 1994). O antigo representante do programa de armas biológicas da União Soviética comunicou que seus laboratórios produziram, no passado, o VVAR em larga escala e que disponibilizaram-no sob a forma de arma biológica para uso numa possível guerra. Cientistas que deixaram a antiga União Soviética podem ter levado ilegalmente consigo estoques do vírus para ameaçar nações (Alibek, 2004). Não existem provas de que tal transferência tenha ocorrido, assim como nenhuma forma de provar que não ocorreu. Alegações têm sido feitas de que o Iraque, Iran, Coreia do Norte e outras nações possam ter o vírus, ainda que durante a visita de cientistas norte-americanos ao Iraque em 2003 não tenham sido encontradas evidências de algum programa de arma biológica com a varíola (Zanders, 2004). Especula-se ainda que o VVAR possa re-emergir do armazenamento a baixas temperaturas, como por exemplo, de cadáveres de vítimas da varíola preservados na Sibéria Ártica Glacial (Berche, 2001).

Além disso, o conhecimento da seqüência completa do genoma do VVAR e a existência de plasmídios contendo o genoma viral completo têm levantado a possibilidade da inserção de genes específicos do VVAR em genomas de outros *Orthopoxvirus*, permitindo assim a construção de cepas de vírus altamente contagiosas (Smith, 1999).

f. Emergência de outros *Orthopoxvirus*

A emergência de outros *Orthopoxvirus* patogênicos a várias espécies animais, que tenham se tornado adaptados aos seres humanos (Berche, 2001), pode ser colocado como uma nova ameaça. Os patógenos mais perigosos dentre os *Orthopoxvirus* são o monkeypox vírus (VMPX) e cowpox vírus. Ao contrário do VVAR que infecta exclusivamente o homem, o VMPX e cowpox vírus são agentes de infecções zoonóticas com amplo espectro de hospedeiros, incluindo os humanos. Mudanças evolutivas desses vírus podem levar a um aumento de sua patogenicidade aos humanos. Uma preocupação se coloca, pois é possível controlar infecções zoonóticas mas virtualmente impossível de erradicá-las (Shchelkunov *et al.*, 2005).

Entre os anos de 1996 a 1999, foi observado um aumento da incidência de monkeypox em humanos no sul e oeste da África, provavelmente devido ao fim da vacinação contra a varíola. Essa doença é adquirida primariamente pelo contato com animais infectados, mas também pode ser transmitida de pessoa para pessoa através de aerossóis respiratórios ou por fluidos corporais. A gravidade da doença vai de branda a severa com casos de fatalidade de 10 a 17% (Sale *et al.*, 2006).

Durante a primavera de 2003, o VMPX foi importado para os EUA através do comércio internacional de roedores da África. Em julho de 2003, 72 casos de monkeypox humana estavam sob investigação em Illinois, Indiana, Kansas, Missouri, Ohio e Wisconsin, com 37 casos confirmados em laboratório. Esta provavelmente não será a última vez que uma doença relativamente remota, como monkeypox, se apresenta nos EUA de uma forma clássica. Ainda que uma proibição tenha sido subsequente estabelecida sobre a importação e transporte de roedores da África, o atual movimento de carga e de seres humanos ao redor do mundo garante que novos agentes infecciosos continuarão a viajar pelo mundo com grande velocidade. (Sale *et al.*, 2006).

g. *Orthopoxvirus* no Brasil

Existe pouca informação sobre a ocorrência de poxvírus selvagens no Brasil e na América do Sul. No entanto, vários estudos têm sido conduzidos recentemente no que diz respeito à circulação de poxvírus relacionados a surtos de varíola bovina, reportando um grande número de isolados de VVAC (Damaso *et al.*, 2000; Trindade *et al.*, 2003; 2004; Nagasse-Sugahara *et al.*, 2004).

De outubro de 2001 a janeiro de 2003, o Instituto Adolfo Lutz (São Paulo) recebeu fluidos de vesículas e pústulas de pacientes com suspeita clínica de “estomatite vesicular” ou varíola bovina. Estes pacientes eram da área rural do Vale do Paraíba, ao leste do estado de São Paulo. Em sua maioria eram trabalhadores leiteiros que apresentavam lesões com aspecto vesículo pustular nas mãos, nos braços, nos antebraços e alguns deles, no rosto. É provável que o trabalho manual da retirada do leite, ainda uma prática comum de pequenos produtores naquela região, a proximidade entre as fazendas e a facilidade de comércio em feiras de gado tenham facilitado a disseminação do vírus. Na mesma ocasião, houve um surto de varíola bovina que afetou aproximadamente 1.500 cabeças de gado na mesma região do Vale do Paraíba. Uma outra região em que um surto de varíola bovina ocorreu foi no Vale de São Patrício, aproximadamente a 1200 km do vale do Paraíba. Entre ambas localidades há muitas cidades pequenas que apresentam pequenos acidentes (Nagasse-Sugahara *et al.*, 2004).

A doença afetou pessoas de todas as faixas etárias, com predominância em grupos com idade inferior a 30 anos. Este resultado já era previsto uma vez que a maioria desses trabalhadores leiteiros não estava vacinada

contra a varíola, mas eram os que tinham um contato maior com o gado infectado. Nos últimos anos, a maior parte das infecções humanas causadas pelos vírus cowpox e VMPX ocorreram também em indivíduos com idade inferior a 18 anos, que não foram vacinados contra a varíola (Fenner, 1996; Sale *et al.*, 2006).

Schatzmayr *et al.* (2000) descreveram a ocorrência de casos humanos e bovinos de infecções por poxvírus no estado do Rio de Janeiro. Análises feitas por microscopia eletrônica foram consistentes com infecções causadas por *Parapoxvirus* e *Orthopoxvirus*, ambos da família Poxviridae. Espécies de *Orthopoxvirus* foram isoladas dos casos humanos e bovinos.

Em outro estudo, Damaso *et al.* (2000) descreveram características de um *Orthopoxvirus* recentemente descoberto, vírus cantagalo (VCTG), que foi isolado de vacas e ordenhadores em 1999, durante um surto ocorrido em fazendas no estado de Rio de Janeiro. É provável que o VCTG tenha persistido de forma selvagem nos últimos 20 anos e estabelecido ciclos efetivos de transmissão em algum animal local, como roedores, que tenham transmitido o VCTG a vacas leiteiras, e das vacas aos trabalhadores leiteiros. Supõe-se que o VCTG seja produto de mutações do VVAC, usado na vacinação anti-variolica, e que foi mantido ao longo do tempo na natureza, baseando-se no fato de que durante a campanha de vacinação, era relativamente comum ter animais infectados por indivíduos recentemente vacinados com VVAC.

Foi investigado também um surto dessa doença exantêmica em seres humanos e no gado na região da Zona da Mata mineira. Setenta e duas fazendas situadas em 20 municípios daquela região foram visitadas e o padrão da doença estudado. Mil e vinte vacas ficaram doentes nos rebanhos visitados e 83% dos casos humanos ocorreram concomitante com a doença nos animais. Queda na produção de leite e infecções secundárias foram freqüentemente observadas. Soro e crostas de animais doentes e convalescentes foram coletados e o diagnóstico laboratorial mostrou que um *Orthopoxvirus*, mais precisamente VVAC estava envolvido neste surto (Lobato *et al.*, 2005).

Em um primeiro momento pensou-se que a persistência do VVAC na natureza fosse um fenômeno raro. No entanto, relatos feitos na Índia demonstraram que, com a erradicação da varíola, houve a emergência do vírus bufalopox (VBP), que causa lesões similares às do VVAC em búfalos e gado leiteiro, e em humanos em contato com tais animais infectados. Epidemias causadas por VBP tornaram-se uma grande infecção zoonótica ocupacional, com importantes conseqüências econômicas (Kolhapure *et al.*, 1997).

Ocorrências de surtos causados pela infecção de vírus vaccinia-símile em humanos têm sido relatadas recentemente em diversas áreas de nosso país (Damaso *et al.*, 2000; Schatzmayr *et al.*, 2000; Trindade *et al.*, 2003). De acordo com Damaso *et al.* (2000), os vírus detectados no Brasil poderiam ser também uma nova cepa de vírus vaccinia-símile, epidemiologicamente similar ao VBP. Não se sabe por quanto tempo estes vírus circularam no Brasil; existem relatos sobre a ocorrência de varíola bovina e vaccínia em seres humanos desde 1910. Há diversos documentos antigos que descrevem surtos com características clínicas e epidemiológicas similares àquelas que estão agora ocorrendo. É importante mencionar que muitos desses surtos de anos atrás ocorreram na mesma região onde os casos recentemente relatados ocorreram (Nagasse-Sugahara *et al.*, 2004).

Em uma era de preocupação com um potencial evento de bioterrorismo, a emergência do VMPX nos EUA e de VVAC no Brasil serve como um alerta oportuno de que os *Orthopoxvirus* continuam a explorar naturalmente novos nichos ecológicos e geográficos. Um melhor entendimento das etapas envolvidas na evolução de *Orthopoxvirus* zoonóticos, incluindo VMPX e VVAC, pode ser relevante para a compreensão dos eventos que conduziram à evolução do VVAR, um agente de grave patogenicidade humana, de eficiente transmissão e altamente especializado ao seu hospedeiro (Likos *et al.*, 2005).

A vacinação rotineira preventiva contra a varíola cessou, e até o momento esteve limitada somente a um pequeno grupo de pesquisadores e assistentes que manipularam este agente e outros *Orthopoxvirus* patogênicos aos seres humanos. O fato de que a maioria da população (aquelas pessoas que nasceram após o cancelamento da vacinação contra a varíola) não apresenta imunidade alguma a varíola, enquanto o resto da população apresenta um drástico decréscimo de sua imunidade, torna esta questão especialmente crítica (Shchelkunov et al., 2005).

h. Vírus vaccínia, a vacina contra a varíola

O vírus VVAC, mais conhecido como sendo a vacina utilizada para alcançar a erradicação global da varíola (Fenner *et al.*, 1988), é também um membro do gênero *Orthopoxvirus*. Compartilha características com outros membros deste gênero, como um genoma de DNA dupla-fita de aproximadamente 200 kb, sítio de replicação citoplasmático, codificação de muitas enzimas para a transcrição e replicação de seu DNA, e disponibilidade de uma complexa via de morfogênese que produz diferentes formas de vírions infecciosos a partir de cada célula infectada (Moss, 2001).

O genoma de diversas cepas de VVAC encontra-se depositado em banco de dados. Todos possuem uma região central altamente conservada de aproximadamente 100 kb e regiões terminais mais variáveis onde existem algumas deleções, transposições e mutações levando alguns genes à inatividade. Seus genes apresentam-se altamente empacotados, com pouco DNA não codificante e “pautas abertas de leitura” (ORFs) que não apresentam íntrons (Gubser & Smith, 2002; Upton *et al.*, 2003; Gubser *et al.*, 2004;). O conteúdo gênico e seu arranjo são altamente conservados. Em direção a cada terminal cromossômico, os genes passam a ser (em sua maioria) não essenciais para replicação viral em cultura de células, mas codificam proteínas que afetam a virulência em hospedeiros. As proteínas codificadas por estes genes fornecem um retrato fascinante de como este grande vírus de DNA desenvolveu numerosos mecanismos para escapar da resposta imune do hospedeiro (Smith & Law, 2004).

O VVAC, como outros *Orthopoxvirus*, existe predominantemente sob duas formas infecciosas chamadas vírus maduro intracelular (VMI) e o vírus envelopado extracelular (VEE) que são estruturalmente e antigenicamente diferentes (Boulter & Appleyard, 1973). O VEE é envolvido por uma membrana lipídica a mais do que a forma VMI, e assim, deve apresentar mais de uma membrana para poder entrar no citosol. Os mecanismos pelos quais as formas VMI e VEE penetram nas células são ainda pouco conhecidos (Carter *et al.*, 2003).

Uma vez em que a replicação do DNA tenha sido iniciada, ocorre a expressão de genes intermediários. Estes codificam diversas proteínas que são necessárias para a expressão de genes tardios, tais como fatores de transcrição tardios. A classe tardia de genes codifica a maioria das proteínas essenciais para a montagem de novas partículas virais e também as enzimas que são empacotadas dentro dos novos vírions, para iniciar um próximo ciclo de infecção (Smith & Law, 2004).

A morfogênese do vírus inicia-se em “fábricas” citoplasmáticas que são repletas de organelas celulares (Ichihashi *et al.*, 1971). As primeiras estruturas visíveis são compostas de proteínas virais e de lipídios derivados da célula hospedeira. Estas estruturas crescem até formarem partículas virais imaturas (VI) que são não infectantes, mas que ganham infectividade durante um processo que envolve a condensação do núcleo viral e a clivagem de uma série de proteínas do capsídeo (Moss & Rosenblum, 1973). As partículas VMI resultantes representam a maioria da progênie infecciosa de cada célula infectada, mas não são suficientes para a propagação

eficiente da infecção, sendo as formas envelopadas adicionais do vírus necessárias para este processo (Smith & Law, 2004).

A formação dos vírions envelopados ocorre quando algumas partículas VMI deixam as “fábricas” em um processo que envolve o transporte pela rede de microtúbulos (RM) – Fig. 2 (Sanderson *et al.*, 2000). Estes vírions são transportados para perto do centro de organização dos microtúbulos onde são envelopados por uma camada dupla de membrana derivada do complexo trans-Golgi (CTG) (Schmelz *et al.*, 1994) ou dos endossomos (Tooze *et al.*, 1993; van Eijl *et al.*, 2002). O vírus resultante é chamado de vírus intracelular envelopado (VIE), que contém duas membranas a mais que a partícula VMI. As partículas VIE são transportadas pela RM para a periferia celular através dos microtúbulos (Hollinshead *et al.*, 2001; Rietdorf *et al.*, 2001; Ward & Moss, 2001a). Quando os vírions alcançam a superfície celular, a membrana mais externa do VIE funde-se com a membrana plasmática da célula para expor uma partícula envelopada na superfície celular, num processo que lembra a exocitose de vesículas intracelulares. Este vírion é chamado de partícula viral envelopada associada à célula (VEC), se for mantido na superfície celular, e VEE se for liberado. VEC e VEE são estruturalmente indistinguíveis, mas diferem em sua localização e função na disseminação do vírus. VEC são importantes para a transmissão célula-célula (Rodriguez & Smith, 1990; Blasco & Moss, 1992) e induzem a formação de filamentos de actina sob a membrana plasmática onde o VEC está aderido (Stokes, 1976; Blasco *et al.*, 1991; Cudmore *et al.*, 1995; van Eijl *et al.*, 2000). Estes filamentos de actina crescentes propõem a partícula VEC da célula hospedeira para células vizinhas. Em contraste, os VEEs são os responsáveis pela propagação da infectividade viral em larga escala em cultura de células (Boulter & Appleyard, 1973; Payne, 1980; Law *et al.*, 2002) e *in vivo* (Payne, 1980). Comparado ao VMI, a partícula VEE é cercada por um envelope lipídico extra que é frágil e facilmente rompido (Ichihashi, 1996b; Roos *et al.*, 1996; Vanderplasschen *et al.*, 1997). A membrana exterior de VEE confere maior resistência à neutralização por anticorpos e a ação do sistema do complemento, mas, se for removida, uma partícula VMI infecciosa será liberada. (Boulter & Appleyard, 1973; Vanderplasschen *et al.*, 1998b).

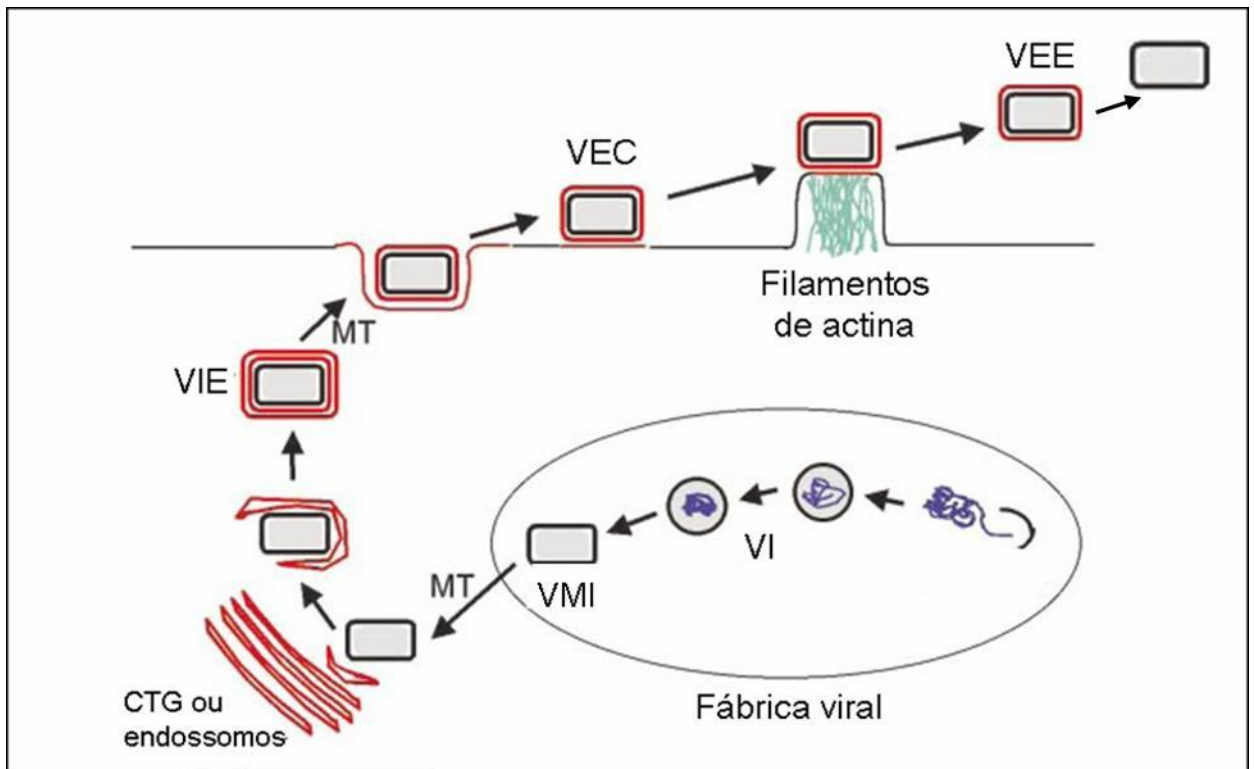


Figura 2. Visão geral da morfogênese do vírus vaccínia (VVAC): As partículas VMI são produzidas em fábricas virais e se movem pelos microtúbulos (MT) para as membranas do complexo Trans-golgi (CTG) ou para os endossomos. Lá, o VMI é envolvido por uma membrana dupla para formar a partícula VIE que se move até a superfície celular pelos microtúbulos. Na superfície celular, a membrana mais externa do VIE funde-se com a membrana plasmática celular para forma a partícula VEC que induz a formação de filamentos de actina que expelirão o vírion da célula. As partículas VEC podem também ser liberadas para formar VEEs e, se estas partículas tiverem sua membrana extracelular rompida, passam a ser VMIs. (adaptado de Smith *et al.*, 2002).

Os VVAC são estruturas macromoleculares complexas que possuem cerca de 100 proteínas diferentes, das quais 18 são proteínas do envelope (Smith *et al.*, 2002). Dada a complexidade antigênica do envelope do VVAC, anticorpos aos múltiplos polipeptídeos do envelope devem ter o potencial de contribuir à proteção conferida à uma pessoa imunizada. Entretanto, poucos trabalhos têm sido feitos para identificar alvos de anticorpos humanos neutralizantes no envelope de VVAC (Davies *et al.*, 2005b). Mas, é de se esperar que respostas importantes de anticorpos estariam dirigidas às proteínas de superfície encontradas nas duas formas principais do vírus infeccioso, VMI e VEE (Vandersplasschen *et al.*, 1998a).

i. **Proteínas Imunogênicas**

A proteína B5R é codificada pelo gene B5R e é um alvo importante de anticorpos neutralizantes de VEE (Galmiche *et al.*, 1999; Law & Smith, 2001; Hooper *et al.*, 2003). É uma proteína glicosilada tipo I de membrana de 42kDa, com composição aminoacídica de 35.1 kDa (Engelstad *et al.*, 1992; Isaacs *et al.*, 1992). Seu ectodomínio é compreendido de quatro domínios com similaridade a seqüências consenso, curtas e repetidas (SCR1, SCR2, SCR3 e SCR4), mais uma seqüência denominada “stalk”, de 51 aminoácidos, situada junto à região transmembrana. Diversos estudos têm mostrado que a proteína B5R é necessária para o empacotamento eficiente de VMI em VEE, para a formação de filamentos de actina e para virulência (Engelstad & Smith, 1993; Wolffe *et al.*, 1993; Sanderson *et al.*, 1998).

Da mesma forma, foi demonstrado que anticorpos reativos à B5R poderiam neutralizar inteiramente VEEs selvagens a um nível similar ao da imunoglobulina (IgG) hiperimune induzida por vacinação com VVAC (Law & Smith, 2001). Foi proposto que os epítomos neutralizáveis da proteína B5R estariam na região SCR1 (Law & Smith, 2001) e que o domínio stalk poderia também contribuir para as propriedades neutralizáveis do SCR1 (Galmiche *et al.*, 1999; Aldaz-Carroll *et al.*, 2005a). Tais proposições foram reforçadas (Aldaz-Carroll *et al.* (2005a) com a sugestão de que a região de interseção SCR1-SCR2 e o stalk da proteína B5R constituem os epítomos neutralizáveis principais e que SCR3 e SCR4, por não estarem expostos na superfície do B5R, parecem não ser tão-imunogênicos quanto os primeiros domínios. Este estudo apresentou dados que sugerem que ambas regiões N e C terminais da B5R faziam parte de um epitopo descontínuo com constituição intra ou intermolecular.

Embora outros estudos moleculares sejam necessários, aceita-se que anticorpos induzidos durante a vacinação, e que sejam direcionados à B5R, são os principais responsáveis pela neutralização de VEE. Uma vez em que os VEEs são importantes para a patogênese de *Orthopoxvirus*, a proteína B5R é considerada um alvo imunoterapêutico chave para o desenvolvimento de futuras terapias baseadas em anticorpos ou para novas vacinas de subunidades ou vacinas de DNA para a varíola (Galmiche *et al.*, 1999; Hooper *et al.*, 2003; 2004).

Uma outra proteína de membrana importante de VEE é codificada pelo gene A33R tardiamente na infecção. A A33R é uma proteína multiglicosilada, com 20,5 kDa, presente na membrana externa de VEE, e parece ter uma função na adesão viral e na penetração celular do vírus (Roper *et al.*, 1996).

Uma proteína imunodominante importante do VMI é a proteína do envelope H3L, codificada pelo gene H3L. A H3L é uma proteína expressa na superfície da forma VMI de VVAC, possui 37.4 kDa e participa na adesão e entrada de VVAC em células alvo. Estudos bioquímicos indicaram que a proteína H3L é expressa tardiamente na infecção, sendo necessária durante a morfogênese viral para a conversão em VMI (Da Fonseca *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000) e para a manutenção da estrutura do vírion (Da Fonseca *et al.*, 2000).

Dentre os alvos do VVAC, a proteína H3L é freqüentemente reconhecida pelos soros de indivíduos vacinados, sendo os anticorpos anti- H3L componentes de proteção importantes contra a infecção por VVAR em humanos. Em geral, anticorpos neutralizantes anti-VMI protegem através da neutralização do inóculo viral e anticorpos anti-VEE/VEC pela limitação da disseminação do vírus após a infecção, ainda que exista discussão a respeito da contribuição relativa *in vivo* dos anticorpos contra as formas VMI versus VEE/VEC (Davies *et al.*, 2005b)

Anticorpos à proteína H3L são um componente dominante da resposta aos antígenos da superfície do VVAC e são capazes de neutralizar o vírus *in vitro*. Além disso, a imunização de ratos com a H3L induz

anticorpos neutralizantes fortes. Animais imunizados com a H3L ou que receberam transferência passiva de anticorpos anti-H3L apresentam-se protegidos de um desafio letal com o VVAC patogênico. Tais dados caracterizaram também a proteína H3L como uma boa candidata para inclusão em uma vacina para a varíola, baseada em subunidades protéicas (Davies *et al.*, 2005a; Davies *et al.*, 2005b).

A L1R é uma proteína miristoilada transmembrana de 27.1 kDa, expressa na superfície da forma VMI do vírus. É uma proteína essencial ao vírus porque a repressão do gene L1R acarreta não maturação viral (Ravanello & Hruby, 1994). A L1R tem uma função crítica na morfogênese de poxvírus (Su *et al.*, 2005) e também estaria envolvida na infecção porque anticorpos anti-L1R são capazes de bloquear a invasão de células hospedeiras pela forma VMI do vírus (Wolffe *et al.*, 1995; Ichihashi & Oie, 1996).

A L1R tem sido utilizada em vacinas de DNA multigênicas capazes de bloquear desafio viral letal em camundongos e primatas não humanos (Hooper *et al.*, 2004). Num outro estudo, uma vacina protéica multicomponente que continha a proteína L1R também foi capaz de bloquear a infecção por VVAC em camundongos (Fogg *et al.*, 2004). Além disso, um estudo feito por Aldaz-Carroll *et al.* (2005b) propôs que o epítipo neutralizante estaria localizado entre os resíduos 118 e 128.

Estudos em imunização de camundongos demonstraram que VVAC, consistindo predominantemente de VMI, induziu altos títulos de anticorpos neutralizantes, mas falhou na proteção contra um desafio por VVAC (Turner & Squires, 1971). A falha foi atribuída à incapacidade da vacina de induzir anticorpos neutralizantes para VEE (Fenner *et al.*, 1988). Portanto, indicando que as proteínas de ambas formas infecciosas do vírus são importantes para a proteção. As proteínas A33R, B5R, L1R e H3L são bem conservadas entre *Orthopoxvirus*, sendo as identidades de aminoácidos entre os ortólogos de VVAC e VVAR de 94, 93, 99 e 96%, respectivamente. Portanto, acredita-se que anticorpos às proteínas de VVAC conferem proteção cruzada contra a VVAR e outros *Orthopoxvirus*.

A vacinação de ratos com genes que codificam as proteínas encontradas na superfície das duas formas infecciosas do vírus VVAC (L1R encontrada em VMI e A33R encontrada em VEE) forneceu um nível maior de proteção do que a vacinação com um ou outro gene sozinho Hopper *et al.* (2000). Em outro estudo, a vacinação com a combinação dos genes L1R e A33R, ou A27L e B5R protegeu ratos da infecção por VVAC-WR (Western Reserve) e a imunização de macacos resus com uma vacina de DNA contendo os quatro componentes, induziu anticorpos contra pelo menos três dos quatro imunógenos (Hopper *et al.*, 2003).

Da mesma forma o emprego de uma vacina recombinante multiprotéica induziu um título maior de anticorpos para ambas formas VMI e VEE de VVAC Fogg *et al.* (2004) do que a vacinação com o vírus vivo. Mais ainda, as proteínas recombinantes protegeram camundongos mais eficientemente contra um desafio letal do VVAC do que a vacina contendo o vírus vivo (Fogg *et al.*, 2004). Portanto, no conjunto estes estudos sugerem que a imunidade protetora é conseguida com maior sucesso por vacinas que contenham ou expressem proteínas das membranas externas de ambas formas virais do que outros tipos de antígenos e que anticorpos desempenham um papel importante na proteção e vacinação.

Em outro estudo, anticorpos monoclonais humanizados de chimpanzé, reativos à proteína B5R, foram capazes não somente de proteger camundongos de um desafio letal com VVAC, mas também de conferir proteção terapêutica em camundongos quando administrados dois dias após a exposição ao vírus (Chen *et al.* 2006). Esta foi a primeira alternativa utilizando a imunização passiva de imunoglobulina anti-VVAC (VIG) para o tratamento de complicações da vacinação contra a varíola e uma nova abordagem à prevenção e ao tratamento

da varíola. Estes anticorpos foram capazes de neutralizar *in vitro* a forma extracelular do VVAC, assim como a forma extracelular de VVAR (Chen *et al.*,2006).

j. Prevalência de anticorpos anti-VVAR

O possível uso do VVAR como arma biológica tem levantado algumas questões sobre o nível de proteção conferido pela vacinação remota contra a varíola. A vacinação rotineira cessou no fim dos anos 70 e, portanto, a maioria da população vacinada anteriormente não tem sido exposta ao VVAC nos últimos 25 ou 30 anos (Viner & Isaacs, 2005). Conseqüentemente, é importante conhecer e entender o estado atual de proteção das populações.

Viner & Isaacs (2005) examinaram os títulos de anticorpos e a duração da capacidade de neutralização de VVAC após a vacinação contra a varíola. A forte neutralização de VEEs é particularmente importante, devido ao papel desta forma viral na disseminação do vírus (Payne, 1980). Após a vacinação contra a varíola, o soro possui a capacidade de neutralizar VEE e VMI por um longo período. Em seu estudo, quase 20% dos indivíduos vacinados a mais de 25 anos apresentaram pequena ou nenhuma capacidade de neutralização de VEE, constatando que a neutralização total de VEE diminuiu 20 anos após a vacinação (Viner & Isaacs, 2005). Em contraste, respostas de anticorpos anti-vaccínia e títulos de neutralização de VMI permanecem relativamente estáveis por até 75 anos (Hammarlund *et al.*, 2003).

Não obstante ao fato de que anticorpos induzidos pelas duas formas infectantes de VVAC têm vida longa, uma proporção substancial da população nunca foi vacinada ou apresenta níveis muito baixos de anticorpos. Alto nível de proteção pode ser conseguido apenas pela revacinação e, portanto, existe uma necessidade de desenvolvimento de vacinas novas e mais seguras para a varíola (Pu *et al.*, 2005).

1.11 Efeitos colaterais da vacina para a varíola

As vacinas atualmente licenciadas para a varíola são vacinas contendo o vírus vivo, de VVAC atenuado derivado de linfa de bezerro. Ainda que este tipo de vacina tenha sido utilizado para a erradicação da varíola no mundo, limitações em relação a sua segurança estão muito bem documentadas de forma a impedir sua aplicação na população civil sem a ocorrência de um novo surto (Poland, 2005).

A re-introdução da vacinação contra a varíola em resposta ao risco de bioterrorismo tem trazido consigo a necessidade de se administrar as complicações adversas decorrentes da vacinação, devendo ser considerada uma profilaxia alternativa para as pessoas em que a vacinação é contra indicada até que uma nova vacina mais segura seja desenvolvida. A VIG representa um componente importante de políticas de preparo, sendo indicado atualmente nos casos de reações adversas decorrentes da vacinação contra a varíola. Um estudo indicou que a taxa de mortalidade associada com eczema pós-vacinação foi reduzida de 30-40% a 7% após a introdução de VIG como tratamento (Witteck, 2006).

A vacina contra a varíola é menos segura do que outras vacinas utilizadas atualmente. Ela está associada com conhecidos efeitos colaterais que vão de brandos até severos. Dentre as reações brandas incluem-se a formação de lesões satélites, febre, dor muscular, linfadenopatia regional, fadiga, dores de cabeça, náusea, erupções na pele e dor no local da vacinação (Belongia & Naleway, 2003).

Nos anos 60, reações adversas severas associadas à vacinação contra a varíola nos EUA incluíram morte, vaccínia progressiva, eczemas, encefalite pós-vacinal e infecção generalizada por VVAC. Os efeitos colaterais foram aproximadamente dez vezes mais comuns em indivíduos vacinados pela primeira vez do que em revacinados. A taxa de fatalidade era também quatro vezes maior em vacinados pela primeira vez, comparados à

revacinados. A inoculação acidental é o efeito adverso mais comum associado à vacinação contra a varíola. A maior parte das lesões são curadas sem a necessidade de terapia, mas a VIG pode ser útil em lesões mais complicadas (Belongia & Naleway, 2003).

A vaccínia progressiva é definida como uma replicação descontrolada do VVAC no sítio de vacinação e leva a uma necrose lenta e progressiva do tecido ao seu redor – Fig. 3A e B (Fulginiti *et al.*, 1968; Bray & Wright, 2003). Esta condição afeta tipicamente indivíduos com sistema imune comprometido. A vaccínia progressiva é fatal se não for tratada, porém, o tratamento com VIG ou o antiviral cidofovir pode ser protetor em alguns casos (Fulginiti *et al.*, 1968 ; Goldstein *et al.*, 1975).

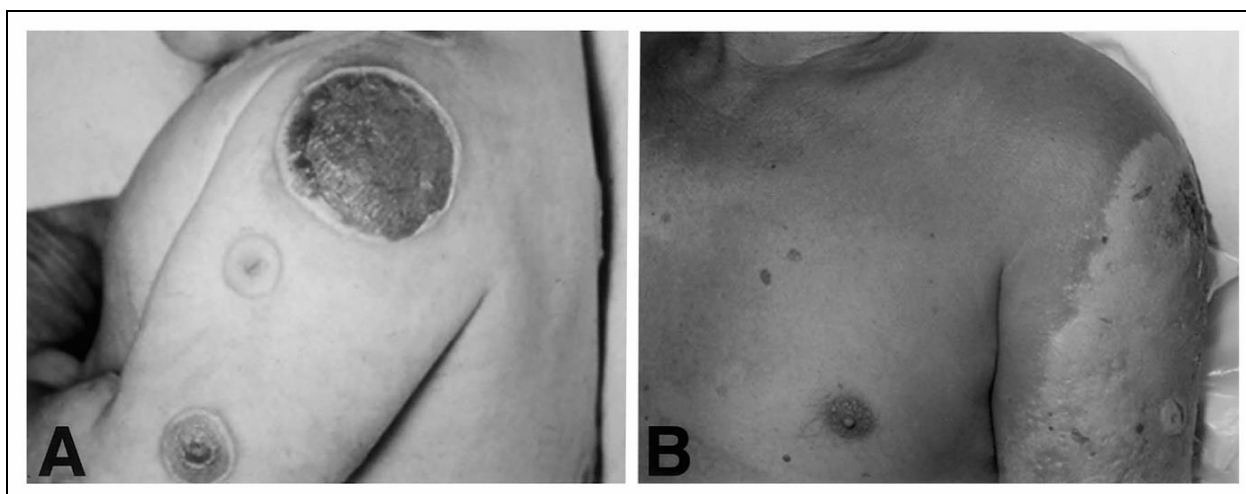


Figura. 3. Vaccínia progressiva no local de vacinação. (A) bebê portador de imunodeficiência; (B) idoso com linfossarcoma (Bray & Wright, 2003).

Encefalite pós-vacinal é um efeito colateral raro, mas que freqüentemente leva bebês e crianças à morte. Nenhuma predisposição a esta condição foi identificada até o momento, e tratamento com VIG tem efeito pequeno ou nenhum sobre esta enfermidade. A vaccínia generalizada resulta da disseminação do VVAC pelo sangue. Pacientes afetados por esta condição apresentam erupções generalizadas na pele que são tipicamente limitadas e não requerem terapia.

Indivíduos com dermatite atópica, independente do grau de gravidade da doença, correm o risco de desenvolverem um eczema, portanto não devem receber vacinação contra a varíola antes de uma possível exposição. As pessoas com sistema imune deficiente apresentam um risco maior para o desenvolvimento de

complicações após a vacinação. Neste grupo incluem-se pessoas imunocomprometidas devido a uma doença específica (como por exemplo, HVI/AIDS, leucemia, linfoma, imunodeficiência herdada), pacientes com órgãos transplantados e àqueles sob efeito de medicamentos imunossupressivos como altas doses de corticóides ou metotrexato. A vacinação também é contra-indicada para pessoas com severas doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico que pode danificar o sistema imune. Indivíduos sob quimioterapia ou radioterapia também correm risco de desenvolverem complicações e, portanto, não devem ser vacinados (Cono *et al.*, 2003).

Recentemente, um novo efeito colateral foi identificado quando o governo de EUA começou a vacinar civis e as forças armadas com a cepa DryVax de VVAC (nome comercial da atual vacina licenciada para a varíola). Um pequeno número dos vacinados desenvolveu uma inflamação no coração, o que derrubou o entusiasmo para a campanha ambiciosa (Enserink, 2004).

Não obstante, a vacinação é uma ferramenta crítica para o controle da varíola, apesar do risco relativamente elevado de complicações em alguns indivíduos (Belongia *et al.*, 2003). A disponibilidade da vacina é também um problema uma vez que o estoque existente tem mais de 20 anos de produção e dispõe de quantidade limitada (Greenberg *et al.*, 2005). No entanto, os métodos para produção desta vacina a partir de linfa de bezerro não são mais aceitos pelos padrões internacionais devido à ausência de controle de qualidade em seu processo e do risco potencial de contaminação pelo agente infeccioso associado com a doença bovina, encefalite bovina espongiiforme, causada por prions. Sendo assim, as organizações do governo dos EUA identificaram a necessidade de desenvolvimento de uma nova vacina para a varíola, a fim de reabastecer o estoque limitado da vacina existente (Halsell *et al.*, 2003). Novos métodos de produção são necessários para eliminar o boi como intermediário. Por considerações éticas e por segurança, estudos com desafios ou experimentações de campo não podem ser feitos para provar a eficácia. Conseqüentemente, a avaliação da eficácia de uma nova geração de vacinas para a varíola necessita de uma compreensão e conhecimento mais amplo sobre a resposta imune ao VVAC e das estruturas responsáveis pela proteção (Greenberg *et al.*, 2005).

1.12 Futuras vacinas para a varíola

Uma nova geração de vacinas para a varíola inclui o vírus vaccínia modificado Ankara (VMA) e outros poxvírus não replicantes que, ainda que demonstrem um alto grau de segurança, parecem ter imunogenicidade substancialmente menor do que a vacina tradicional com o VVAC vivo (Slifka, 2005).

O VMA é um agente vacinal vivo altamente atenuado que tem limitada capacidade de se replicar em linhagens de células de mamíferos que foi utilizado previamente em estudos com macacos e humanos. Mais de 15% do genoma original do VVAC foi perdido (Meyer *et al.*, 1991), mas a maior parte dos genes que codificam proteínas estruturais foi mantido, sugerindo que determinantes antigênicos-chaves foram preservados (Parrino *et al.*, 2007). A vacina tem a capacidade de ser tanto segura quanto imunogênica em relação à vacina atualmente licenciada e suporta a futura avaliação da imunização da população em geral com duas doses de VMA como sendo uma forma segura de promover uma plataforma de imunidade a *Orthopoxvirus* (Parrino *et al.*, 2007). No entanto, a avaliação de sua eficácia não é possível devido à ausência da doença. Dados recentes gerados em modelos animais imunizados com VMA demonstram que esta vacina confere proteção contra a varíola e vírus relacionados como o VVAC e VMPX (Earl *et al.*, 2004; Wyat *et al.*, 2004).

Um outro candidato para vacina é um vírus atenuado, da cepa Lister de VVAC, LC16m8, desenvolvido e largamente utilizado no Japão antes da erradicação global da varíola (Kenner *et al.*, 2006), e que foi

administrado por escarificação. Em um estudo utilizando dois modelos animais, uma única inoculação intraepidérmica de LC16m8 foi equivalente a proteção conferida pela vacina DryVax contra infecção por *Orthopoxvirus* letais (Empig *et al.*, 2006). Mas ainda existe a necessidade de mais estudos para que o vírus LC16m8 possa ser considerado uma melhor alternativa em relação à DryVax e outras vacinas não atenuadas, em programas de preparo a varíola.

Uma outra opção seria melhorar a segurança da atual vacina através da imunização com uma estratégia clínica segura, como uma vacina de DNA, que aumentaria a imunidade antes da exposição à vacina viva de VVAC, de forma a diminuir potenciais riscos de complicações. Otero *et al.* (2006) testaram uma estratégia a fim de melhorar a eficácia e segurança da atual vacina que envolveu a primização com plasmídios de DNA codificando os genes A4L, A27L e H5R de VVAC. Um aumento considerável nas respostas antígeno específicas, de interferons, alta proliferação celular e resposta humoral antígeno específicas foram detectadas em camundongos Balb/C primados com os plasmídios, quando comparados aos controles, após o desafio com VVAC. (Otero *et al.*, 2006).

1.13 Vacinas peptídicas sintéticas

O desenvolvimento de vacinas por metodologias convencionais é limitado devido a uma série de fatores, como efeitos colaterais indesejados, presença de contaminantes e dificuldade de armazenamento. (Santona *et al.*, 2002). Para superar essas limitações, peptídeos sintéticos ainda estão sendo considerados uma alternativa atraente porque são mais seletivos, quimicamente definidos, mais seguros e estáveis. Além disso, seqüências podem ser selecionadas em uma proteína, eliminando assim outros segmentos potencialmente responsáveis por efeitos não desejados, conhecidos ou ainda desconhecidos devido à estimulação não específica ou indesejável (Tam, 1995). Além disso, os imunógenos peptídicos são mais prováveis de resistir à desnaturação e podem ser facilmente armazenados e transportados sem refrigeração (Tam, 1995).

1.14 Justificativa

O desenvolvimento de uma definição consensual sobre o que é necessário para o desenvolvimento de imunidade protetora e os mecanismos envolvidos ajudaria na avaliação de abordagens atuais e futuras sobre vacinas (Slifka, 2005). Com essa compreensão, os atuais candidatos a vacinas poderiam ser projetados para estimular clones de células B e T que compõem uma resposta imune bem sucedida, sendo o padrão-ouro a indução de anticorpos neutralizantes (Parham, 2001).

Embora exista uma vacina eficaz contra a varíola humana, muito pouco se conhece a respeito de como ocorre o controle imunológico. Neste trabalho pretendemos aprofundar o conhecimento, identificando estruturas peptídicas (epítomos) alvos da resposta imune humoral ao vírus vaccínia. A identificação de regiões imunodominantes de antígenos alvos da resposta imune é uma importante área na pesquisa em imunologia molecular. O tipo de abordagem, quando sistematicamente aplicada, pode gerar informações valiosas quanto ao número e localização dos sítios antigênicos, fato importante para entender-se mais sobre a aquisição de uma imunidade protetora de diversas patologias.

2. OBJETIVO

Mapeamento imunológico de epítomos B lineares das proteínas B5R, A33R, L1R e H3L do vírus vaccínia, homólogos ao vírus varíola.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise computacional: As seqüências completas das proteínas B5R (número de acesso no PDB: P21115), A33R (número de acesso no PDB: P68616), H3L (número do acesso no PDB: P20497) e L1R (número de acesso no PDB: P20540) de VACV foram obtidas do banco de dados SWISSPROT (<http://www.expasy.ch>). Os alinhamentos múltiplos foram realizados utilizando o programa ClustalW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW-XXL.html>) e a determinação da identidade entre as seqüências através do BLASP 2.2.2 (<http://ca.expasy.org/tools/blast/>).

A predição de seqüências peptídicas que correspondem a possíveis epítomos foi realizada utilizando o programa DNASTAR – versão Windows (Inc., Madison, WI) através do algoritmo de Jameson e Wolf. A predição de estruturas em α -hélice, folhas- β e em “ombro” foi feita pelo algoritmo de Chou e Fasman e a predição de estruturas em “cotovelo” pelo algoritmo de Garnier e Robson.

3.2 Células, vírus e purificação: Vírus cantagalo (VCTG), disponível no Departamento de Virologia, FIOCRUZ, foi propagado em culturas contínuas de células Vero em meio modificado por Dulbecco, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Oie *et al.*, 1990).

Para a purificação, 100 mL de cultura de vírus foram submetidos à centrifugação (35.000 x g, 30 min, 25° C). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado dissolvido em 100 mL de tampão McIlvaine (citrato/fosfato 4mM, pH 7.8, 0,1% NaN₃). Após nova centrifugação (35.000 x g, 30 min, 25° C), o precipitado foi dissolvido em 10 mL de tampão McIlvaine-azida e a suspensão submetida a um gradiente de sacarose (30, 40, 50 e 60%). A suspensão viral (6 mL) foi depositada sobre a solução de sacarose a 30% (6 mL) preparada em tampão McIlvaine (citrato/fosfato 4 mM, pH 7.8) e os tubos submetidos à centrifugação (39000 x g, 20 min, 25° C).

Os vírus foram recuperados da camada de 50% de sacarose e lavados, duas vezes, por centrifugação (35000 x g, 60 min, 25° C) com 10 mL cada de Tampão McIlvaine. O último precipitado foi dissolvido em 10 mL de água Mili-Q e re-centrifugado como anteriormente por 30 min. O procedimento de lavagem em água foi repetido por mais duas vezes e a suspensão viral acondicionada a -60° C (Zwartouw *et al.* 1962).

3.3 Soros e anticorpos monoclonais: Para o presente estudo, 4 soros de indivíduos infectados com VCTG e 10 soros de indivíduos supostamente vacinados contra a varíola (com idade superior a 30 anos) e um “pool” de soros humanos normais (idade inferior a 30 anos, controles) foram utilizados. Três soros bovinos oriundos de animais infectados por VCTG e soro fetal bovino (Difco, USA) também foram utilizados. Todos os soros de indivíduos infectados foram recolhidos de surtos recentemente ocorridos no estado do Rio de Janeiro. Cada soro foi analisado por western blotting, e a partir dos soros que reconheciam um maior número de antígenos virais (infectado e vacinado), foi feito um “pool”. O “pool” de soros foi alíquotado, armazenado a -20 °C, e utilizado para caracterização os epítomos.

Anticorpo monoclonal anti-V5 tag, reconhecendo a seqüência GKPIPPLLGLDST, foi obtido da Invitrogen (USA) e utilizado quando necessário como marcador do processo de síntese peptídica.

3.4 Dosagem de proteína: A concentração de proteína nas amostras de vírus purificado foi determinada utilizando o kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, CA, USA), baseado no método de Bradford, 1976.

3.5 EGPA-SDS: A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (EGPA-SDS) foi realizada usando gel de separação de 12% e as condições descritas por Laemmli (1970). Alíquotas contendo 45 µg de preparações virais purificadas foram misturadas com mesmo volume de tampão de amostra (Tris-HCl 0,187M, pH 7,0 SDS 2,0% (m/v), azul de bromofenol 1,0% (m/v), glicerol 27% (v/v)] e β-mercaptoetanol 5,0% (v/v)) e submetidas a aquecimento (2 min, 100 °C). As amostras foram aplicadas no gel e a eletroforese conduzida a 100 V por 90 min utilizando um sistema Mini-proteom III (Bio-Rad, USA). As massas moleculares das proteínas foram determinadas comparando-se a sua migração com as massas moleculares de marcadores de peso molecular (Sigma Chemical, USA). As proteínas separadas pelo gel EGPA-SDS foram visualizadas por coloração com comassie blue.

3.6 Western blotting: Para o imunoblotting, após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (0,2 µm, 50 min, 15 V) utilizando um sistema semi-seco de transferência (Bio-Rad, USA). Os sítios livres das membranas de nitrocelulose foram bloqueados por 2 horas com leite mólico a 3% em tampão Tris-HCl 150mM contendo 0,2 % Tween 20 (TTBS). As membranas foram lavadas três vezes (10 min, cada) em tampão TTBS e em seguida incubadas (2 h, 25 °C) com o anticorpo primário (“pool” de soros de indivíduos infectados com VCTG, “pool” de soros humanos normais, “pool” de soros de indivíduos vacinados contra a varíola, “pool” de soros bovinos de animais infectados e soro fetal bovino) diluído 1:300 em tampão TTBS contendo 1% de leite mólico. Após lavagem por quatro vezes (10 min, cada) em TTBS, foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina, IgG de coelho anti-IgG humana (Abcam, USA) e IgG de coelho anti-IgG bovina, (Abcam, USA), e diluídos 1:1000 em TTBS contendo 1% de leite mólico por duas horas. Após mais três lavagens em TTBS (10 min, cada), a reação antígeno-anticorpo foi revelada utilizando como substrato BCIP/NBT de acordo com as instruções do fabricante (Abcam, USA) ou utilizando o kit com substrato para conjugado HRP (Bio-Rad, USA).

3.7 Síntese de peptídeos: A síntese múltipla de peptídeos em membrana de celulose foi realizada através da técnica F-moc utilizando um sintetizador ASP222 (ABIMED, Alemanha) como descrito por Ronald Frank (2002). O plano de distribuição de aminoácidos, bem como a determinação dos protocolos para síntese das bibliotecas de peptídeos das proteínas do VVAC foram definidos em um computador, utilizando o programa Multipeps (Intavis, Alemanha). A seqüência VSQEVKRYFCVKTMN foi utilizada como controle negativo da síntese devido a sua não reatividade com IgG humana.

A ativação da membrana foi processada através de três sucessivas lavagens (2 min) com dimetilformamida (DMF) e o acoplamento de cada aminoácido realizado duas vezes. A proteção foi realizada com solução de anidrido acético a 2% em DMF e a desproteção em solução de piperidina a 20% em DMF. Todos esses procedimentos foram realizados manualmente e a membrana seca a temperatura ambiente antes do início de cada ciclo. A desproteção final foi realizada pela incubação da membrana por uma hora em solução de desproteção [2,0% de água milli-Q, 2,8% triisopropilsilano, 47,6% ácido trifluoroacético (TFA) e 47,6% diclorometano (DCM)]. Após quatro lavagens com DCM (30 s), quatro com DMF (2 min) e duas lavagens com etanol (2 min), a membrana foi submetida aos ensaios imunológicos. Quando não usada imediatamente, foi acondicionada a -20 °C, até seu uso.

3.8 Imunoensaios: A revelação da reação antígeno-anticorpo foi realizada como descrito por Frank e Overwin (1996). As membranas foram previamente lavadas com etanol (2 min), quatro vezes em tampão Tris-HCl 150 mM (10 min) e bloqueadas por 12 horas em solução TTBS contendo 3 % de leite mólico. Em seguida, incubadas com anticorpo primário (“pool” de soros de indivíduos infectados com VCTG e “pool” de soros humanos normais) diluído 1:200 em tampão TTBS contendo 1% de leite mólico. Após quatro ciclos de lavagens com TTBS, foram incubadas (2 h) com anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina [IgG de coelho anti-IgG humana (Abcam, USA)] diluído 1:5000 em TTBS contendo 3% de leite mólico. Após quatro novos ciclos de lavagens (10 min) em TTBS, as membranas foram incubadas com substrato quimioluminescente (CPD star, Applied Biosystems, USA) e expostas a filmes de raio-X (Kodak, USA).

3.9 Análise dos “spots” nas membranas: Além da análise visual da reatividade dos peptídeos, imagens em formato TIFF foram obtidas após escaneamento (scanner GS800, Bio-Rad) das membranas e o padrão de reatividade dos peptídeos avaliado utilizando o software PD-Quest (Bio-Rad, USA). O “spot” com sinal mais intenso numa membrana foi assinalado como tendo 100% de intensidade, e todos os outros valores foram expressos em porcentagem relativa. Apenas os spots com valores densitométricos superiores a 20% de intensidade foram considerados positivos (Hujer *et al.*, 2004).

3.10 Mapeamento tridimensional dos epítomos: A análise da posição tridimensional dos epítomos em cada proteína foi realizada utilizando o programa Swiss PDB Viewer (www.expasy.ch). A proteína L1R apresentava a sua estrutura tridimensional depositada no “protein data bank” (PDB) sob o número de acesso 1YPY. A proteína B5R não apresentava a sua estrutura depositada e portanto, a sua modelagem foi conseguida com êxito baseada numa proteína homóloga (número de acesso no SwissProt: P68639). A proteína B5R foi modelada utilizando a proteína reguladora do complemento do vírus vaccínia (VCP, número de acesso no PDB – 1RID) como molde utilizando o programa Swiss Model através do “First Approach Mode”. Foi utilizada uma etapa de minimização de energia e minimização harmônica, selecionando todos os aminoácidos deslocados no “Ramachandran plot”. A minimização foi realizada em 20 etapas de “step descent”, 2000 etapas de “step descent” e 2000 etapas de “conjugated gradient”. As proteínas A33R e H3L não apresentavam estruturas resolvidas, bem como não havia a possibilidade de modelagem por homologia devido à ausência no banco de proteínas homólogas estruturadas. As superfícies moleculares e a acessibilidade ao solvente das estruturas tridimensionais foram calculadas através do Swiss PDB Viewer.

4. RESULTADOS

4.1 Predição de epítomos

Os resultados das predições de estruturas secundárias utilizando o programa DNASTar estão apresentados na Fig. 4. Dentre as proteínas de superfície de VEEs analisadas, a B5R (Fig. 4A) e a A33R (Fig. 4B), foram identificadas como altamente imunogênicas. A B5R apresentou pelo menos 10 regiões antigênicas (Tabela 1, pg 39) enquanto a A33R apresentou seis (Tabela 2, pg 45). Em relação às proteínas de superfície de VMI, a H3L (Fig. 4C) e L1R (Fig. 4D) também se apresentaram altamente imunogênicas com 14 (Tabela 3, pg 48) e 13 (Tabela 5, pg 54) regiões antigênicas, respectivamente. Os resultados deste estudo, bem como as regiões que caracterizam as estruturas secundárias, estão apresentados na figura 4. Os resultados obtidos pelo DNASTAR estão de acordo com a literatura ([Hooper et al., 2003](#); [Fogg et al., 2004](#)), onde estas proteínas são indicadas como as mais imunogênicas, e as principais responsáveis pelo desenvolvimento da imunidade protetora.

4.2 Alinhamento de seqüências

Após a escolha das proteínas de VVAC com maior potencial antigênico, suas seqüências foram alinhadas com seqüências de proteínas ortólogas em VVAR utilizando o programa ClustalW e a identidade entre as seqüências determinada através do programa BLASTP 2.2.2.

Através deste alinhamento múltiplo pretendeu-se determinar o grau de identidade entre as seqüências protéicas dos dois vírus e, assim, validar a escolha das proteínas que teriam seus epítomos mapeados. Através deste alinhamento, confirmou-se a existência de uma homologia superior a 90% entre as proteínas B5R, A33R, H3L e L1R de VVAC com suas ortólogas em outros *Orthopoxvirus* como rabbitpox, cowpox, camelpox, monkeypox vírus, e identidade de 93 (Fig. 5), 94 (Fig. 6), 96 (Fig. 7) e 99% (Fig. 8), respectivamente, com suas ortólogas em VVAR.

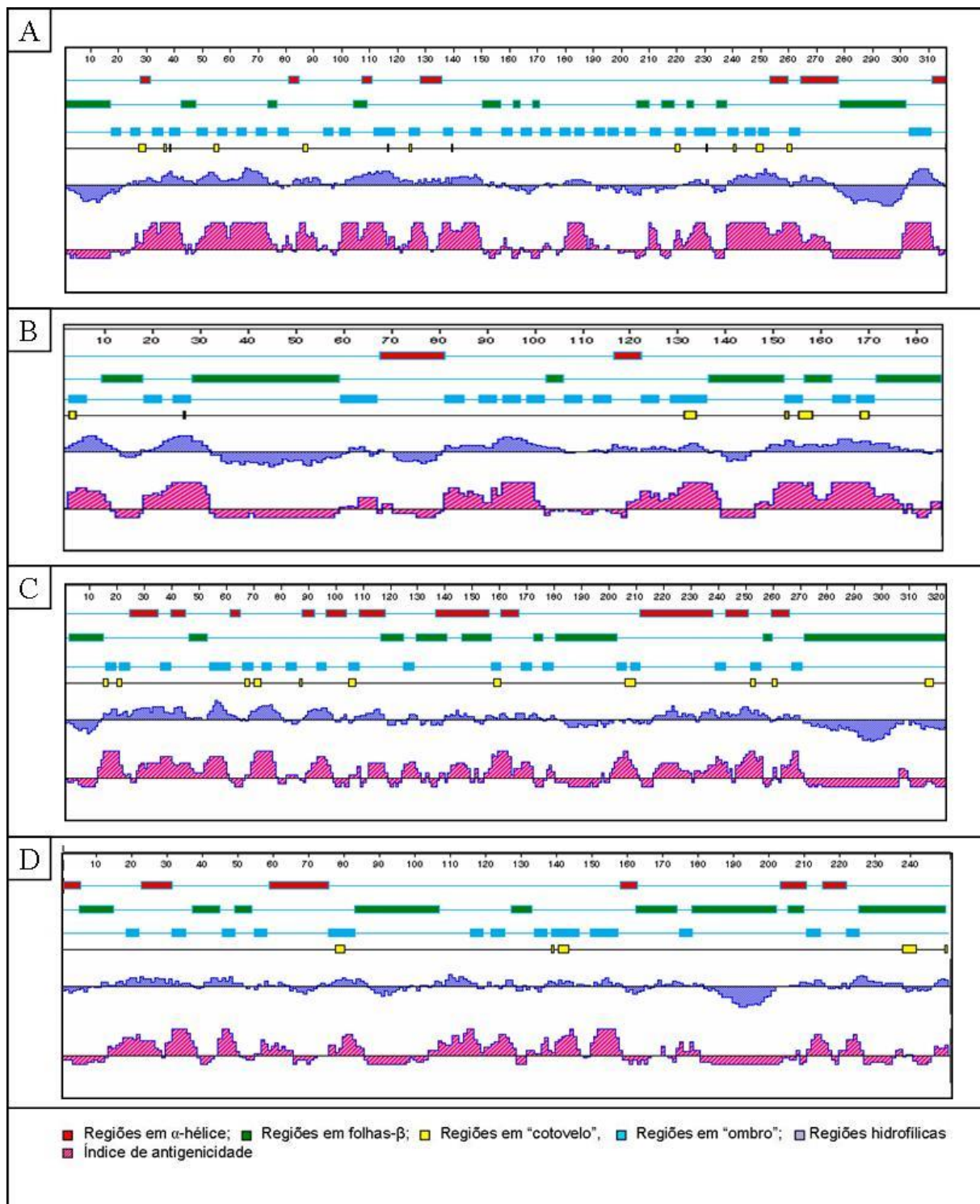


Figura 4. Predição de possíveis regiões de reconhecimento por anticorpos através do programa DNASTAR em proteínas de VVAC. (A) Proteína B5R de VEE, 317aa, 35.1 kDa; (B) Proteína A33R de VEE, 185aa, 20.5 kDa; (C) Proteína H3L de VMI, 324 aa, 37.4 kDa; (D) Proteína L1R de VMI, 259aa, 27.1 kDa.

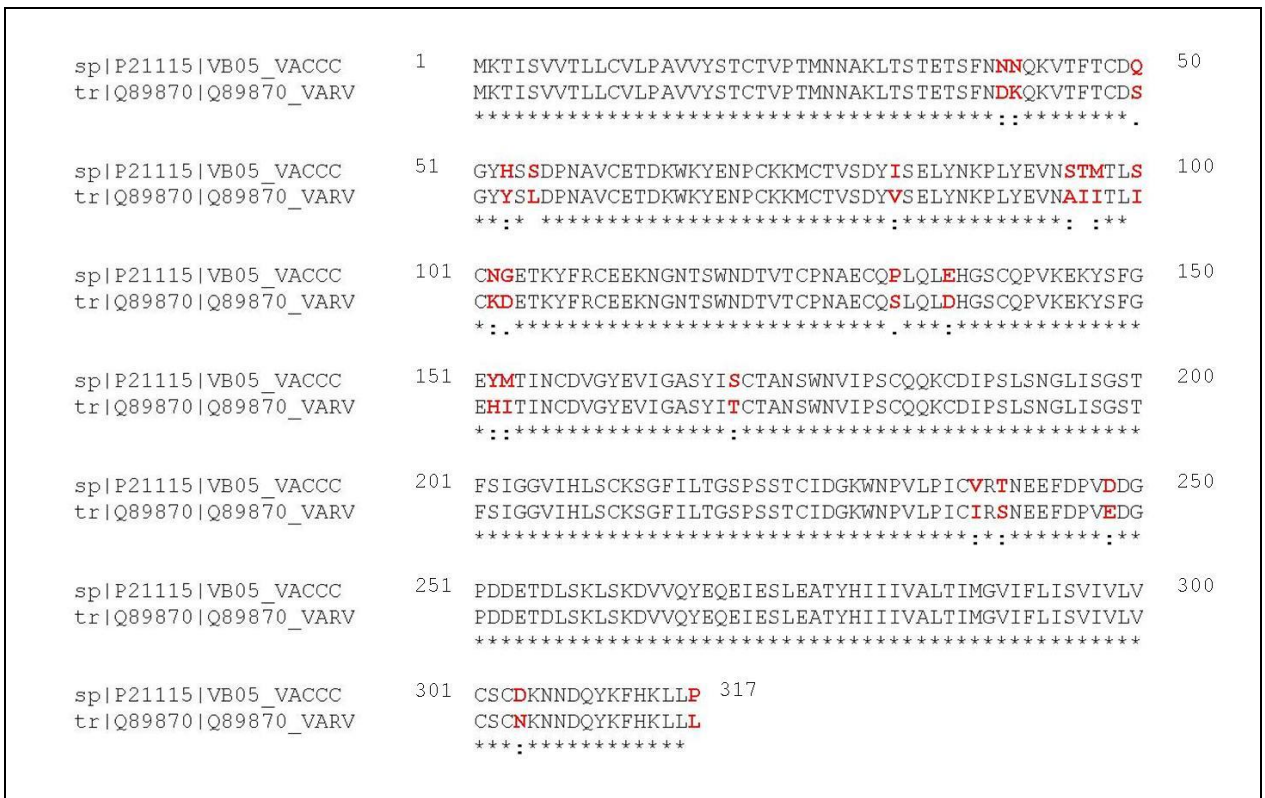


Figura 5. Comparação da estrutura primária da proteína B5R de VVAC (nº de acesso: P21115) com a proteína B6R de VVAR (nº de acesso: Q89870) em ClustalW. Uma identidade de 93% foi encontrada entre as duas seqüências, usando o programa BLASTP 2.2.2. As regiões discordantes estão assinaladas em vermelho.

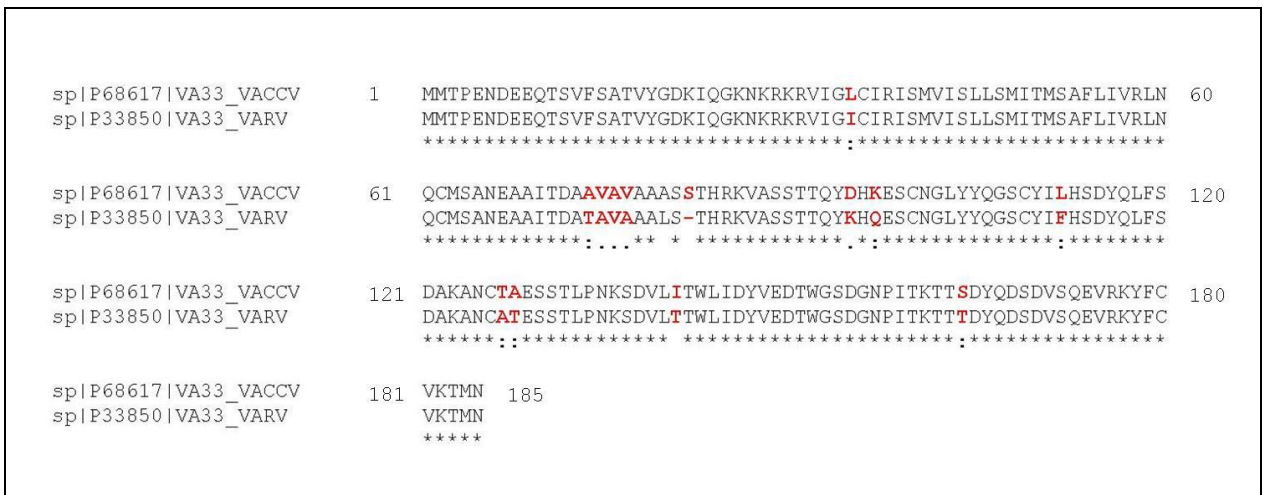


Figura 6. Comparação da estrutura primária da proteína A33R de VVAC (nº de acesso: P68616) com a proteína A33R de VVAR (nº de acesso: P33850) em ClustalW. Uma identidade de 94% foi encontrada entre as duas seqüências, usando o programa BLASTP 2.2.2. As regiões discordantes estão assinaladas em vermelho.

sp P20497 VP35_VACCC	1	-MAVKT	PVIVPVIDRPPSETFPNV	HEHINDQKFD	VDKNEVMPEKRN	VVVVKDDPDHY	60
sp P33059 VP35_VARV		MATV	NKTPVIVPVIDRPPSETFPN	LHEHINDQKFD	VDKNEVMPEKRN	VVIVKDDPDHY	
: . ***** . ***** . *****							
sp P20497 VP35_VACCC	61	KDYAFIQ	WTGGNIRNDDKYTHFFSGFC	NMCTEETKRNIARHLALWDS	NFFTELENKKVE		120
sp P33059 VP35_VARV		KDYAFI	HWTGGNIRNDDKYTHFFSGFC	NMCTEETKRNIARHLALWDS	KFFTELENKKVE		
***** . ***** . *****							
sp P20497 VP35_VACCC	121	YVVIVENDN	VIEDITFLRPLVKAMHDKKIDIL	QMREIITGNKVKTEL	VMDKNH	TIIFTYTG	180
sp P33059 VP35_VARV		YVVIVENDN	VIEDITFLRPLVKAMHDKKIDIL	QMREIITGNKVKTEL	VMDKNH	VIIFTYTG	
***** . *****							
sp P20497 VP35_VACCC	181	GYDVLSAYI	IRVTTALNIVDEIISKGLSSGF	YFEIARIENEMKINRQILD	NAAKYVEH		240
sp P33059 VP35_VARV		GYDVLSAYI	IRVTTALNIVDEIISKGLSSGF	YFEIARIENEIKINRQIM	NSAKYVEH		
***** . ***** . *****							
sp P20497 VP35_VACCC	241	DPRLVAEHR	FENMKPNFWSRIGTAAAKRYP	GVMYAFTTPLISFFGL	FDINVI	GLIVILFI	300
sp P33059 VP35_VARV		DPRLVAEHR	FENMKPNFWSRIGTAAVKRYP	GVMYAFTTPLISFFGL	FDINVI	GLIVILFI	
***** . *****							
sp P20497 VP35_VACCC	301	MFMLIFNVK	SKLLWFLGTFTVTA	FI			324
sp P33059 VP35_VARV		MFMLIFNVK	SKLLWFLGTFTVTA	FI			

Figura 7. Comparação da estrutura primária da proteína H3L de VVAC (nº de acesso: P20497) com a proteína H3L de VVAR (nº de acesso: P33059) em ClustalW. Uma identidade de 96% foi encontrada entre as duas seqüências, usando o programa BLASTP 2.2.2. As regiões discordantes estão assinaladas em vermelho.

sp P20540 VM25_VACCC	1	MGAAASIQT	VNTLSERISSKLEQEANASAQTK	CDIEIGNFYIRQNHG	CNLTVKNMCSAD		60
sp P33040 VM25_VARV		MGAAASIQT	VNTLSERISSKLEQEANASAQTK	CDIEIGNFYIRQNHG	CNLTVKNMCSAD		

sp P20540 VM25_VACCC	61	ADAQLDAVLS	AAETYSGLTPEQKAYVPAMFTA	ALNIQTSVNTVVRDF	FENYVKQTCNSSA		120
sp P33040 VM25_VARV		ADAQLDAVLS	AAETYSGLTPEQKAYVPAMFTA	ALNIQTSVNTVVRDF	FENYVKQTCNSSA		

sp P20540 VM25_VACCC	121	VVDNKLKI	QNVIIDECYGAPGSPTNLEF	INTGSSKGNCAIKALMQL	TTKATTQIAPRQVA		180
sp P33040 VM25_VARV		VVDNKLKI	QNVIIDECYGAPGSPTNLEF	INTGSSKGNCAIKALMQL	TTKATTQIAPRQVA		

sp P20540 VM25_VACCC	181	GTGVQFYM	IVIGVILAAALFMYAKRMLFT	STNDKIKLILANKEN	VHWTTYMDTFFRTSP		240
sp P33040 VM25_VARV		GTGVQFYM	IVIGVILAAALFMYAKRMLFT	STNDKIKLILANKEN	VHWTTYMDTFFRTSP		

sp P20540 VM25_VACCC	241	MVIATTD	MQN				250
sp P33040 VM25_VARV		MVIATTD	IQN				
***** . **							

Figura 8. Comparação da estrutura primária da proteína L1R de VVAC (nº de acesso: P20540) com a proteína L1R de VVAR (nº de acesso: P33040) em ClustalW. Uma identidade de 99% foi encontrada entre as duas seqüências, usando o programa BLASTP 2.2.2. As regiões discordantes estão assinaladas em vermelho.

4.3. Caracterização do vírus por microscopia eletrônica

Uma vez que apenas dois laboratórios no mundo estão habilitados a trabalhar com o VVAR e com o soro de pacientes infectados por ele, este estudo foi conduzido utilizando o VCTG, derivado da cepa VVAC-IOC (Damaso *et al.*, 2000), que foi utilizada como vacina para erradicação da varíola no Brasil. A purificação do VCTG foi feita por gradiente de sacarose, de acordo com o método desenvolvido por Zwartow *et al.* (1962) e o vírus analisado por microscopia eletrônica (Fig. 9).

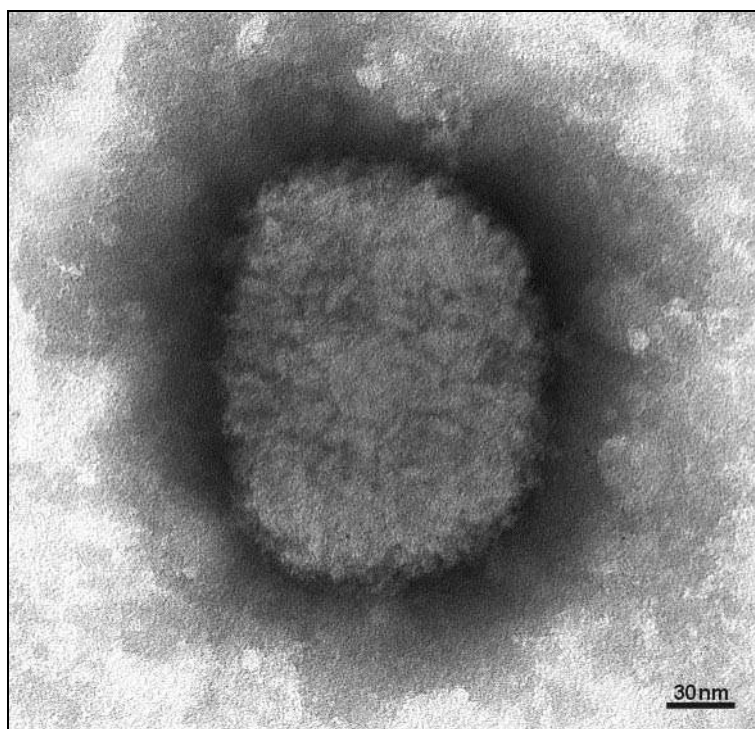


Figura 9. Imagem do vírus cantagalo purificado (VCTG) obtida por microscopia eletrônica. Foto: O.M. Barth/IOC.

4.4 Avaliação da capacidade reativa de soro de indivíduos vacinados às proteínas de VCTG por western blotting

Devido à indisponibilidade de soros de indivíduos infectados pelo VCTG, este trabalho iniciou-se avaliando a capacidade do soro de indivíduos vacinados contra a varíola de reagir com proteínas do VCTG. O objetivo deste estudo seria validar estes soros para utilização na etapa de mapeamento de epítomos. Para tanto, as proteínas virais resolvidas por EGPA-SDS foram transferidas para membrana de nitrocelulose e a reatividade avaliada por Western blotting. O soro de oito indivíduos vacinados contra a varíola e “pool” de soros de indivíduos não vacinados foram utilizados como anticorpo primário (Fig. 10). Apenas uma proteína correspondente à banda de 37kDa foi reconhecida pelo soro dos indivíduos 3, 4 e 7 enquanto o soro dos indivíduos 1, 2 e 5 reagiu com duas bandas protéicas, de 35 kDa e 37 kDa, que corresponderiam às proteínas B5R de VEE e H3L de VMI, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com a literatura uma vez em que respostas de anticorpos anti-VEE decrescem 25 anos após a vacinação (Viner & Isaacs, 2005), enquanto que respostas anti-VMI permanecem relativamente estáveis por até 75 anos (Hammarlund *et al.*, 2003). O soro do

indivíduo 3 apresentou ainda reatividade com outras duas bandas protéicas de aproximadamente 66 kDa e 67 kDa que não foram identificadas.

O “pool” de soros de indivíduos não vacinados não reagiu com as proteínas virais.

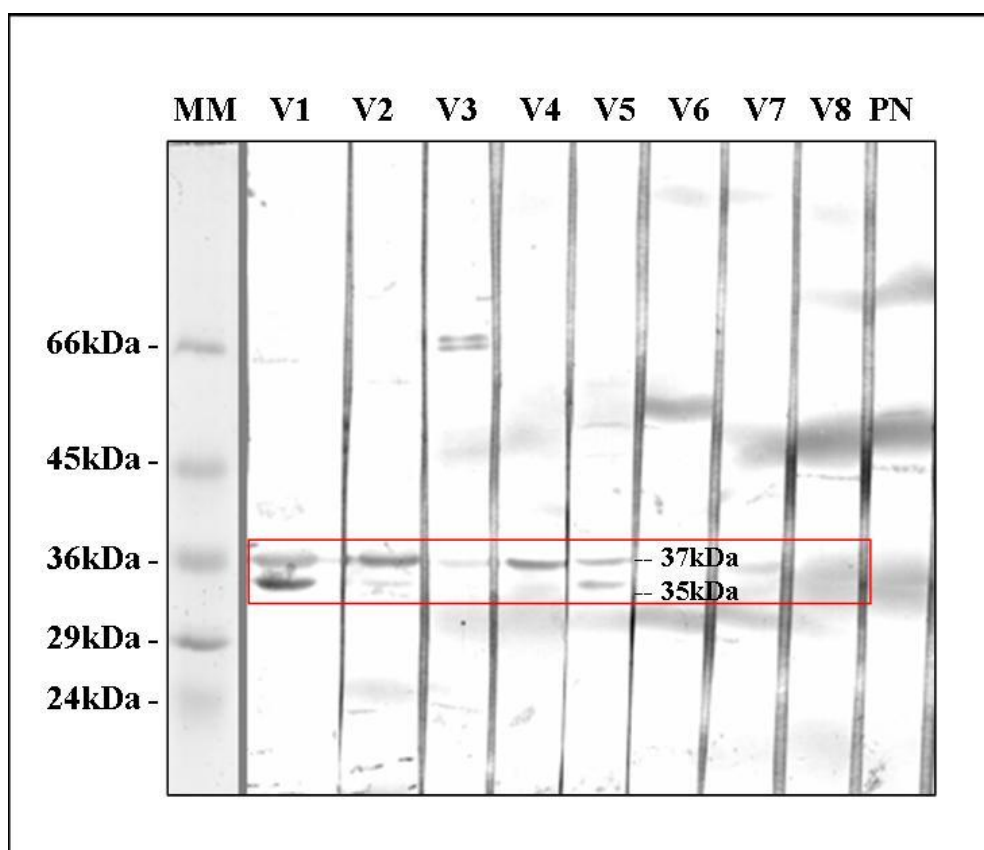


Figura 10. Reatividade do soro de indivíduos vacinados (V1 a V8) com extrato protéico viral (VCTG), por western blotting utilizando anticorpo conjugado à fosfatase alcalina. Uma preparação de vírus VCTG purificado foi solubilizado em tampão de amostra e cerca de 40 μ g de proteínas foram aplicadas por canaleta. MM, proteínas de padrão de peso molecular; PN, controle negativo da imunodeteção com “pool” de soros de indivíduos não vacinados. As manchas escuras na imagem devem-se a artefatos do scanner.

A não reatividade dos soros dos indivíduos 6 e 8 às proteínas do VCTG pode ser explicada pelo fato de que ambos nasceram depois de 1975, próximo ao ano da erradicação da varíola (Fenner *et al.*, 1988), e portanto, receberam apenas uma dose da vacina o que pode justificar a baixa concentração de anticorpos.

Apesar do reconhecimento das proteínas B5R (35 kDa) e H3L (37 kDa) pelo soro de alguns indivíduos vacinados, não foi possível identificar as proteínas A33R (20 kDa) e L1R (27 kDa), indicando baixa reatividade de anticorpos anti-VVAC no sangue. A partir do soro dos indivíduos 1, 2, 3, 4, 5 e 7 foi feito um “pool” de soros de indivíduos vacinados para utilização em experimentos subsequentes.

4.5 Avaliação da capacidade reativa de soro de pacientes e animais infectados pelo VCTG por western blotting

Em janeiro de 2006 houve a ocorrência de um surto de infecção afetando um rebanho bovino e trabalhadores rurais no município de Cordeiro no Rio de Janeiro, com características similares a infecção por

VVAC. Amostras de soro de pacientes e animais infectados foram coletadas e analisadas pelo laboratório de Flavivírus (Virologia-IOC) que identificou que se tratava de infecção pelo VCTG. Neste trabalho, o soro de quatro indivíduos e três animais infectados foram então analisados por western blotting para verificar a reatividade as proteínas do VCTG.

Todos os soros dos indivíduos infectados por VCTG (linhas 1, 2, 3 e 4) apresentaram forte reatividade às bandas protéicas de 35 kDa e 37 kDa, correspondentes às proteínas B5R de VEE e H3L de VMI, respectivamente. O soro do paciente da linha 1 reagiu também com uma outra banda protéica de aproximadamente 22 kDa que pode ser atribuída a proteína A33R de VEE. Uma outra banda protéica de 48 kDa reagiu com o soro de três pacientes infectados, no entanto a proteína não foi identificada. O “pool” de soros de indivíduos vacinados manteve sua baixa reatividade com as bandas protéicas correspondentes às proteínas B5R e H3L e o “pool” de soros de indivíduos não vacinados não apresentou reatividade alguma às proteínas de VCTG (Fig. 11A).

Da mesma forma, os soros de boi infectados (Fig. 11B) também apresentaram maior reatividade com as bandas protéicas relativas às proteínas B5R e H3L. O soro do animal da linha 1 também apresentou reatividade à banda protéica de massa molecular de aproximadamente 22 kDa, que possivelmente corresponde a proteína A33R e o soro fetal bovino não apresentou reatividade às proteínas do VCTG. Estes dois estudos envolvendo soros de pacientes e animais infectados pelo VCTG demonstraram que duas proteínas são majoritárias na indução de resposta de anticorpos anti-VCTG, a B5R que está presente na membrana de VEEs e H3L, presente na membrana de VMIs. Ambas já foram descritas como sendo as principais proteínas imunogênicas de VVAC, VVAR e outros *Orthopoxvirus* (Bell *et al.*, 2004; Davies *et al.*, 2005).

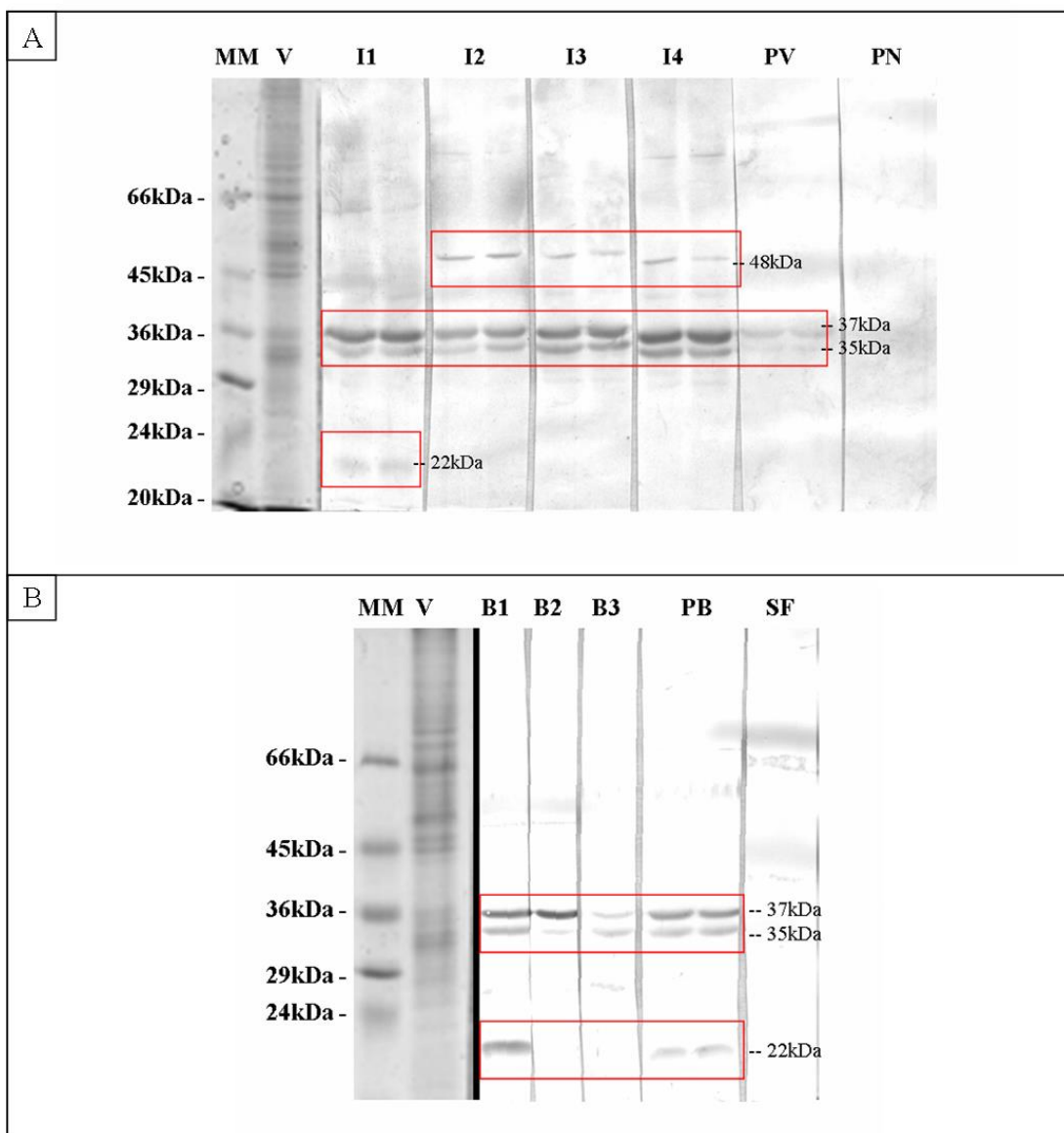


Figura 11. Western blotting utilizando cerca de 40 µg extrato protéico viral (VCTG); (A) soro de indivíduos infectados (I1-I4) e (B) soro de bois infectados (B1-B3) com VCTG e revelação utilizando anticorpo conjugado à fosfatase alcalina. MM, proteínas de padrão de peso molecular; V, VCTG purificado corado com comassie blue; PV, “pool” de soros de indivíduos vacinados; PN, “pool” de soros de indivíduos não vacinados; PB, “pool” de soros bovinos de animais infectados; SF – controle negativo da imunodeteção com soro fetal bovino.

O imunoblotting revelado com anti-IgG humana conjugada a peroxidase apresentou um poder de resolução maior (Fig. 12) do que o anticorpo conjugado a fosfatase alcalina (Fig. 11). Esta forma de revelação se mostrou superior à anterior para a detecção das proteínas virais, pois além das três bandas protéicas de 37 kDa, 35 kDa e 21 kDa já identificadas anteriormente, uma outra banda protéica de massa molecular de aproximadamente 27 kDa, correspondente a proteína L1R, foi reativa ao “pool” de soros humanos infectados. O “pool” de soros de indivíduos não vacinados não apresentou reatividade às proteínas do VCTG.

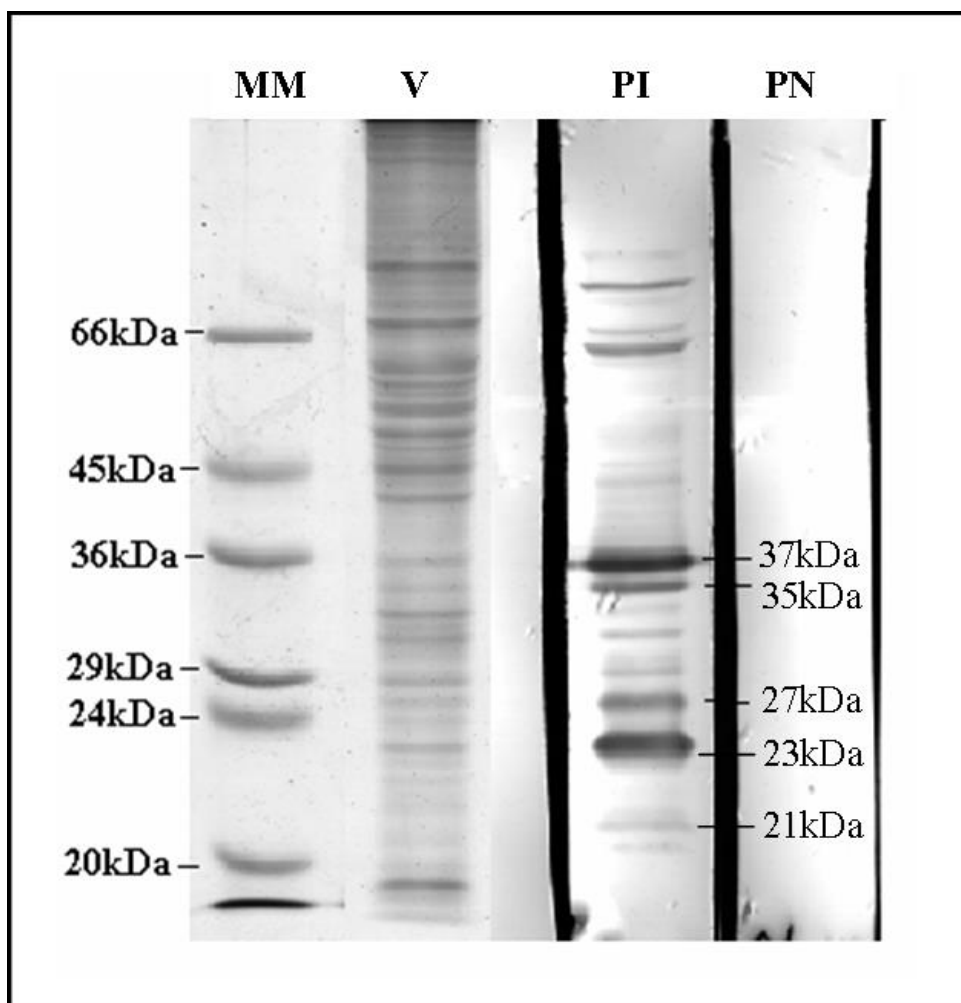


Figura 12. Reatividade de um “pool” de soros de indivíduos infectados por VCTG com extrato protéico viral (VCTG), por western blotting utilizando anticorpo conjugado à peroxidase. Uma preparação de vírus VCTG purificado foi tratada com tampão de amostra e cerca de 40 µg de proteínas aplicadas por canaleta. Membrana marcada após western blotting. MM, proteínas padrão de peso molecular; V, VCTG purificado corado com comassie blue; PI, “pool” de soros de indivíduos infectados por VCTG; PN, “pool” de soros de indivíduos não vacinados.

4.6 Mapeamento de epítomos

A determinação dos epítomos do VCTG por ensaios imunológicos sobre as membranas sintetizadas pela metodologia de SPOT foi realizada utilizando “pool” de soros de indivíduos infectados por VCTG ao invés de soro de indivíduos vacinados contra a varíola porque a reatividade foi superior para estes soros. Como controle negativo optou-se pela utilização de soros de indivíduos não vacinados.

4.6.1 Mapeamento de epítomos da proteína B5R de VVAC

A biblioteca peptídica da proteína B5R consistiu em um arranjo de oligopeptídeos de 15 resíduos de aminoácidos com sobreposição de 12 resíduos (Fig. 13A), sob a forma de 101 spots distribuídos em 5 linhas. O

“pool” de soro humano infectado reagiu mais intensamente com sete regiões, B5R-1⁽²⁸⁻⁴⁵⁾, B5R-2⁽⁷³⁻⁹⁶⁾, B5R-3⁽¹⁰⁶⁻¹²³⁾, B5R-4⁽¹⁴²⁻¹⁵⁶⁾, B5R-5⁽¹⁵³⁻¹⁷¹⁾, B5R-6⁽²²⁹⁻²⁵²⁾, B5R-7⁽²⁵⁰⁻²⁷⁰⁾, identificadas na Fig. 13A e B.

Um estudo comparativo entre a predição de epítomos por métodos computacionais e os dados experimentais obtidos (Fig. 13) estão apresentados na Tabela 1. Das 10 regiões antigênicas previstas, 7 foram confirmadas pelos estudos experimentais.

A partir dos dados obtidos na Fig. 13, uma nova estratégia de síntese foi utilizada para refinamento dos resultados, ou seja, para a identificação da melhor seqüência que caracteriza os epítomos. Para tanto, foi projetada outra biblioteca peptídica contendo as regiões imunodominantes B5R-1⁽²⁸⁻⁴⁵⁾ e B5R-2⁽⁷³⁻⁹⁶⁾ que consistiu em um arranjo de oligopeptídeos de 10 resíduos com sobreposição de 5, sob a forma de 8 spots distribuídos em uma linha (Fig. 14A). Dentre as seqüências, o peptídeo ETSFNNNQKV pertencente à B5R-SEQI⁽²⁰⁻⁴⁴⁾ e os peptídeos SDYISELYNK e ELYNKPLYEV pertencentes à B5R-SEQII⁽⁷⁴⁻⁹⁸⁾ tiveram alta reatividade ao “pool” de soros de indivíduos infectados, sendo que os últimos compartilharam a seqüência ELYNK. O padrão de reatividade de algumas regiões ao soro de indivíduos infectados foi bem similar quando comparado ao “pool” de soros de indivíduos não vacinados (Fig. 14B).

O peptídeo correspondente ao epítomo SELYNKPLYE (B5R-EP2⁽⁸³⁻⁹²⁾) foi sintetizado em membrana de SPOT e teve sua especificidade confirmada ao soro humano infectado por VCTG (Fig. 14C).

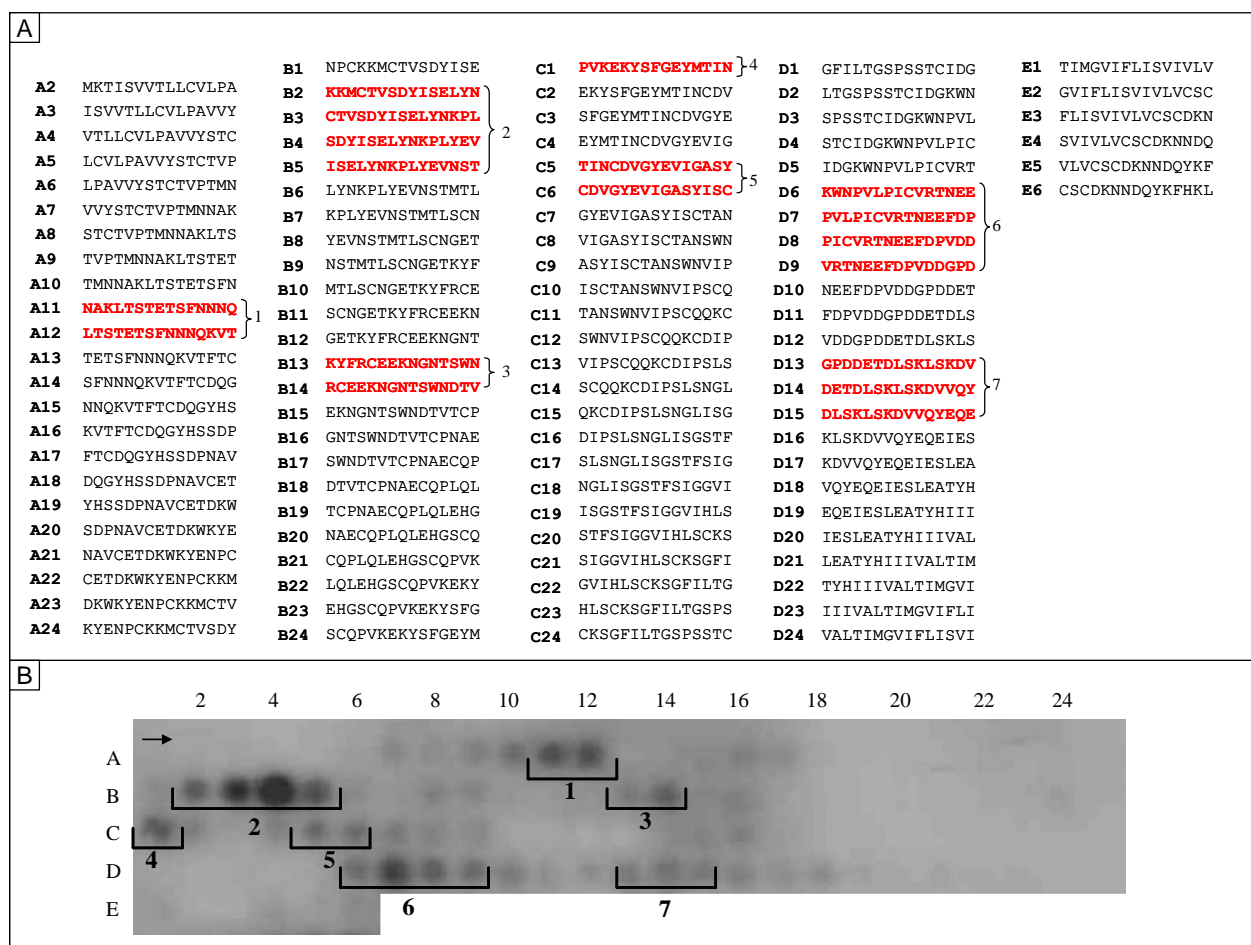


Figura 13. Caracterização dos epítomos da proteína B5R de VVAC. (A) A biblioteca peptídica da proteína B5R foi gerada a partir de um arranjo de oligopeptídeos de 15 resíduos com sobreposição de 12, sob a forma de 101 spots distribuídos em 5 linhas. (B) Detecção de regiões imunodominantes, por imunoenaios, utilizando “pool”

de soros de indivíduos infectados por VCTG, diluído 1:200. Controles positivos e negativos da síntese e revelação foram incluídos como descrito em materiais e métodos.

TABELA 1. Comparação da antigenicidade da proteína B5R predita pelo algoritmo de Jameson e Wolf com a identificação imunológica pelo método de SPOT.

Predição de regiões antigênicas	Regiões imunodominantes determinadas experimentalmente
31-43	28-45
49-77	73-96
86-92	73-96
100-119	106-123
125-131	-
136-150	142-171
181-188	-
224-232	229-270
239-275	229-270
302-311	-

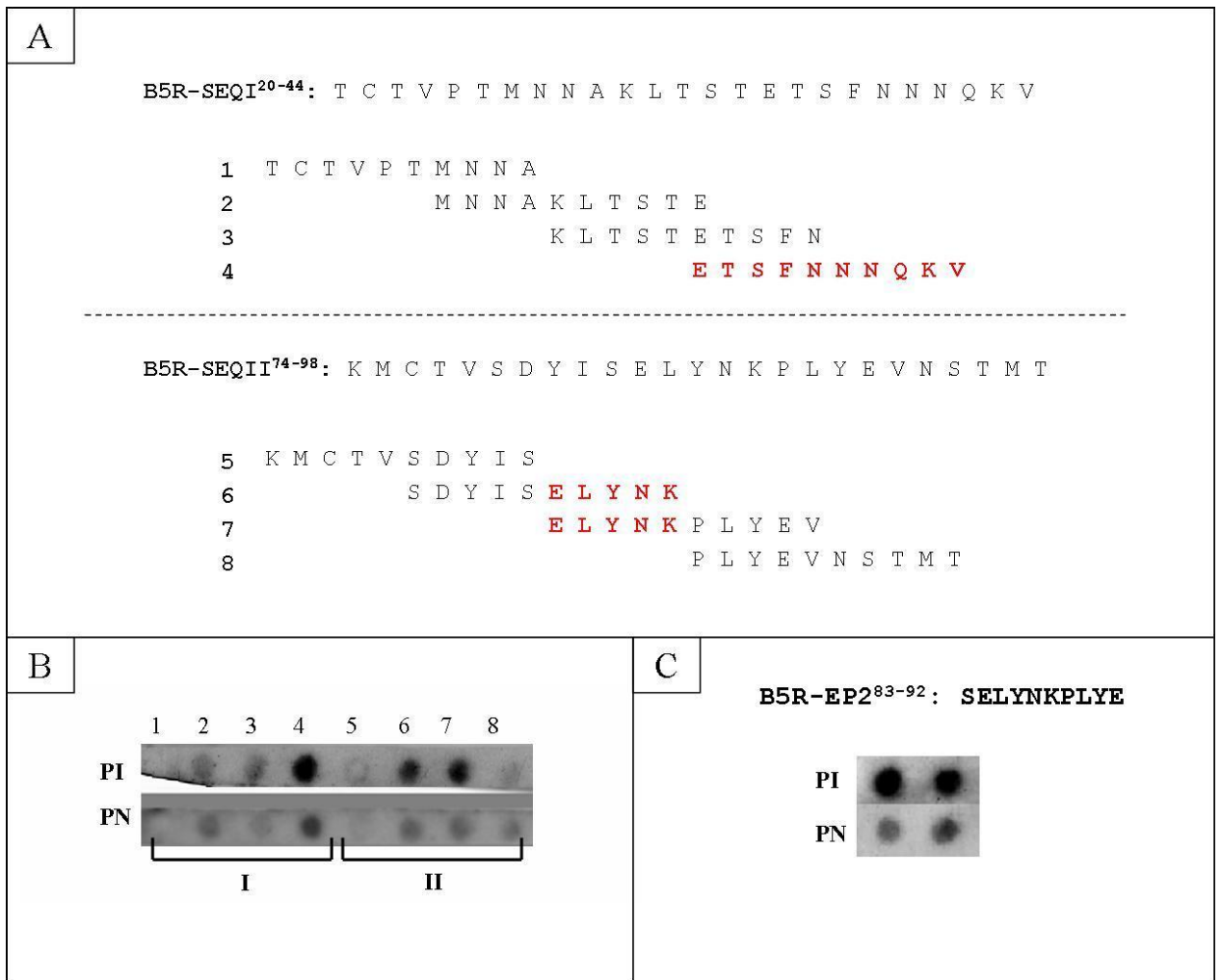


Figura 14. Refinamento das seqüências dos epítomos da B5R-SEQ1⁽²⁰⁻⁴⁴⁾ e B5R-SEQ2⁽⁷⁴⁻⁹⁸⁾ (A) A biblioteca peptídica consistiu em um arranjo de oligopeptídeos de 10 resíduos com sobreposição de 5, sob a forma de 8 spots distribuídos em 1 linha. (B) Identificação dos epítomos por imunoblotting. (C) Ensaio imunológico confirmando a especificidade do epítomo B5R-EP2⁽⁸³⁻⁹²⁾ ao VCTG. PI, “pool” de soros de indivíduos infectados por VCTG; PN, “pool” de soros de indivíduos não vacinados para a varíola, ambos diluídos 1:200. Todos os experimentos foram realizados duas vezes, com idênticos resultados. Controles positivos e negativos da síntese e revelação foram incluídos como descrito em materiais e métodos.

As seqüências dos epítomos B5R-EP1⁽³⁵⁻⁴⁴⁾ e B5R-EP2⁽⁸³⁻⁹²⁾ foram analisadas pelo programa BLASTP 2.2.2 para determinação do grau de identidade com seqüências ortólogas de outros *Orthopoxvirus*. Os epítomos B5R-EP1⁽³⁵⁻⁴⁴⁾ e B5R-EP2⁽⁸³⁻⁹²⁾ revelaram 80% e 100% de identidade com o VVAR, respectivamente (Fig. 15A e B). Ambos apresentaram 100% de identidade com outros *Orthopoxvirus* como o buffalopox, rabbitpox e horsepox vírus.

A			
P21115_VVAC:	35	ETSFNNNQKV	44
		ETSFN+ QKV	
Q89870_VVAR:	35	ETSFNDKQKV	44
B			
P21115_VVAC:	83	SELYNKPLYE	92
		SELYNKPLYE	
Q89870_VVAR:	83	SELYNKPLYE	92

Figura 15. Comparação das seqüências epitópicas de vírus vaccínia (P21115_VVAC) com suas homólogas em vírus varíola (Q89870_VVAR). As identidades dos epítomos B5R-EP1⁽³⁵⁻⁴⁴⁾ (A) e B5R-EP2⁽⁸³⁻⁹²⁾ (B) foram de 80% e 100%, respectivamente, e determinadas pelo programa BLASTP 2.2.2.

A proteína B5R foi então submetida ao Swiss-model, sendo alinhada com a proteína reguladora de complemento do VVAC. O alinhamento utilizado para a modelagem molecular por homologia está representado na Fig. 16A e o modelo tridimensional obtido está demonstrado na Fig. 16B. A proteína não apresenta estruturas em α -hélice e apresenta poucas estruturas em folha- β (observadas em amarelo no alinhamento, sendo a maioria da estrutura aberta e em “ombro”).

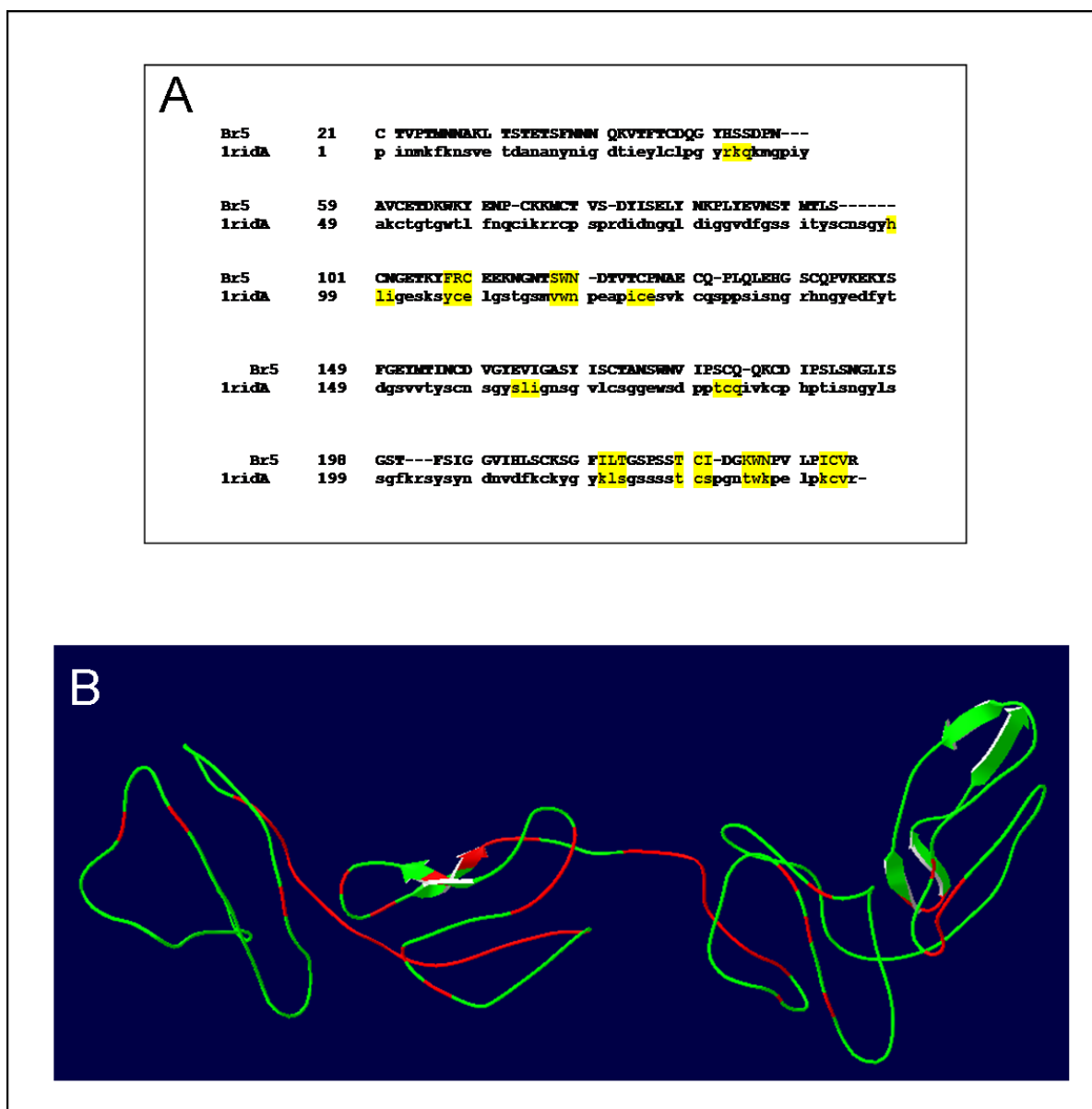


Figura 16. Modelagem molecular da proteína B5R de VVAC (A) A proteína B5R foi submetida ao swiss-model e alinhada com a proteína reguladora de complemento do VVAC (VCP – número de acesso: P68638) e este alinhamento utilizado para a modelagem molecular por homologia. Em amarelo estão representadas as regiões em folha- β . (B) Estrutura tridimensional da proteína B5R em “ribbon” colorida de acordo com “B factor”. Em verde estão representadas as regiões bem conservadas em relação ao molde e em vermelho estão indicadas as regiões não conservadas.

Os sítios epitópicos foram então mapeados no modelo da proteína B5R representada em “ribbon”, visualizada pelo programa Swiss-PDB Viewer (Fig. 17A). Utilizando o mesmo programa, a superfície molecular da proteína foi mapeada e colorida pelo potencial eletrostático. Verificou-se que os dois epítomos, B5R- EP1⁽³⁵⁻⁴⁴⁾ (Fig. 17B) e B5R-EP2⁽⁸³⁻⁹²⁾ (Fig. 17C), localizam-se na superfície da proteína. As regiões representando os dois epítomos apresentaram área de superfície altamente acessível, ou seja, as cadeias laterais dos aminoácidos apresentaram-se expostas na superfície da proteína (Fig. 17B e C). Em relação ao B5R-EP2⁽⁸³⁻⁹²⁾, foi observado que os aminoácidos Leu⁽⁸⁵⁾, Asn⁽⁸⁷⁾, Pro⁽⁸⁹⁾ e Leu⁽⁹⁰⁾ são os mais acessíveis, sendo possivelmente os mais importantes no reconhecimento pelos anticorpos (Fig. 17C).

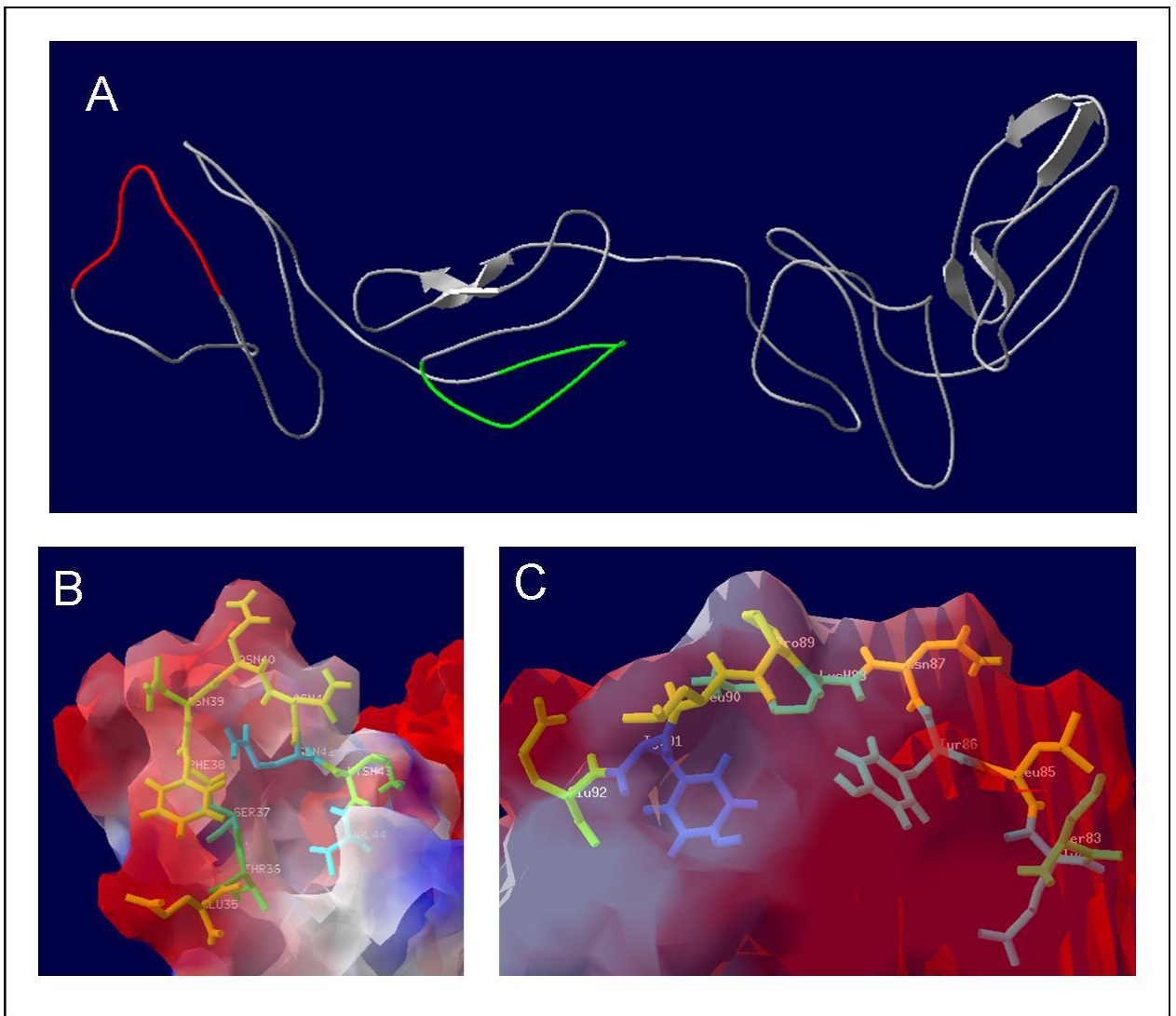


Figura 17. Localização espacial dos epítomos B5R-EP1⁽³⁵⁻⁴⁴⁾ e B5R-EP2⁽⁸³⁻⁹²⁾ na estrutural tridimensional da proteína. (A) Estrutura tridimensional representada em “ribbon” e visualizada pelo programa Swiss-PDB Viewer. Em vermelho destaca-se o epítomo B5R-EP1⁽³⁵⁻⁴⁴⁾ e em verde o B5R-EP2⁽⁸³⁻⁹²⁾. Utilizando o mesmo programa, a superfície molecular da proteína foi mapeada e colorida quanto ao seu potencial eletrostático. Os aminoácidos referentes aos epítomos foram destacados quanto a acessibilidade ao solvente (quanto mais para o azul, menos acessível e quanto mais para o vermelho mais acessível). Evidenciação em maiores detalhes do epítomo B5R-EP1⁽³⁵⁻⁴⁴⁾ em (B) e B5R-EP2⁽⁸³⁻⁹²⁾ em (C).

4.6.2 Mapeamento de epítomos da proteína A33R de VCTG

A biblioteca peptídica da proteína A33R consistiu de um arranjo de oligopeptídeos de 15 resíduos com sobreposição de 12 (Fig. 18A), sob a forma de 57 spots distribuídos em 3 linhas. Ambos os “pools” de soros apresentaram baixa reatividade aos peptídeos, apesar de que o “pool” de soros de indivíduos infectados reagiu mais intensamente com quatro regiões, A33R-1⁽⁸⁰⁻⁹⁵⁾, A33R-2⁽⁹¹⁻¹⁰⁵⁾, A33R-3⁽¹⁴²⁻¹⁵⁴⁾, A33R-4⁽¹⁶⁰⁻¹⁷⁴⁾, identificadas na Fig. 18A e B.

Não foi feita uma nova estratégia de síntese para refinamento destes resultados porque as regiões imunodominantes identificadas apresentaram reatividade apenas ligeiramente superior ao “pool” de soros de indivíduos não vacinados contra a varíola.

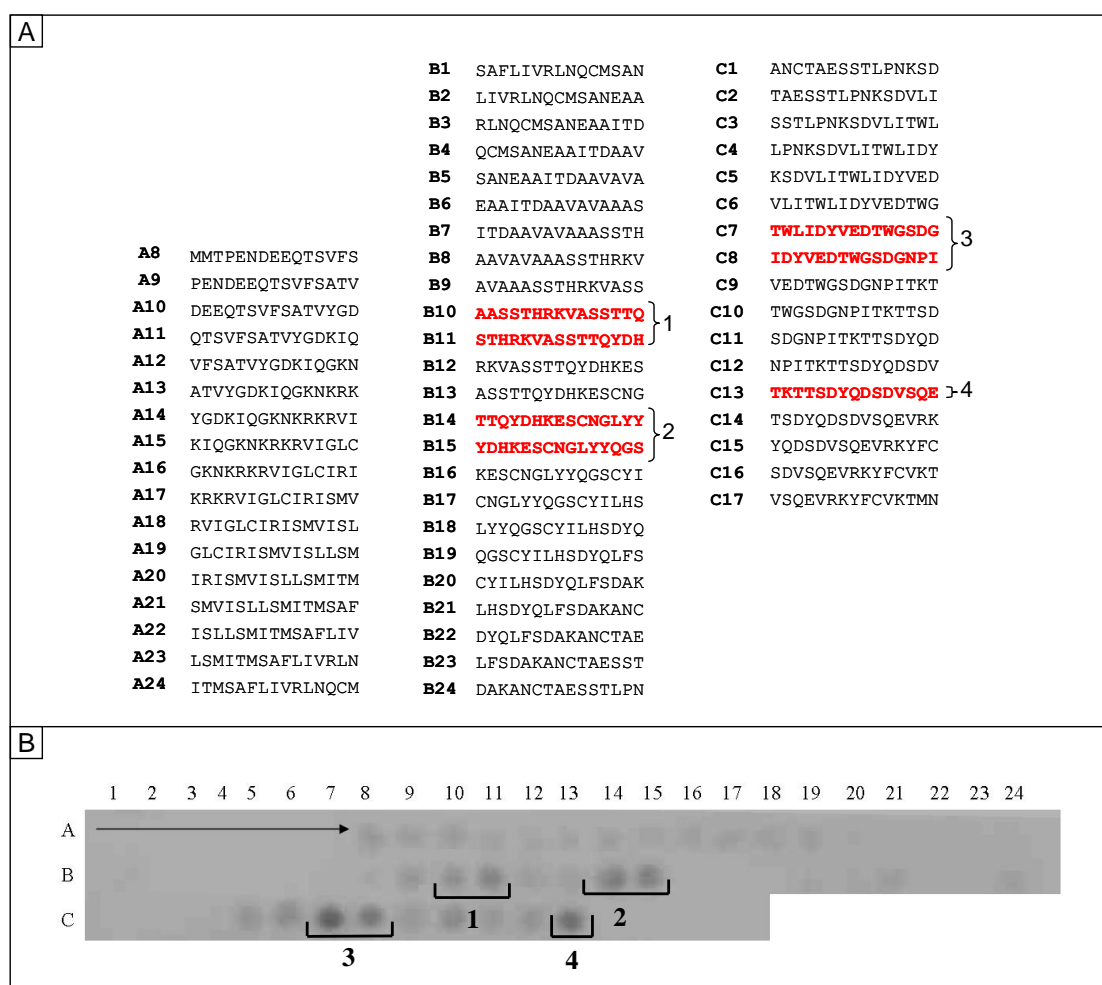


Figura 18. Caracterização dos epítomos da Proteína A33R de VVAC. **(A)** A biblioteca peptídica consistiu de um arranjo de oligopeptídeos de 15 resíduos com sobreposição de 12, sob a forma de 58 spots distribuídos em 3 linhas. **(B)** Detecção de regiões imunodominantes, por imunoenaios, utilizando “pool” de soros de indivíduos infectados por VCTG, diluído 1:200. Controles positivos e negativos da síntese e revelação foram incluídos como descrito em materiais e métodos.

A comparação entre a eficiência do método preditivo com os dados experimentais está apresentada na Tabela 2. Confirmando a tendência observada para a proteína B5R, um número maior de epítomos preditos foi observado também com esta proteína. Das 6 regiões antigênicas preditas, 4 delas foram confirmadas pela metodologia de SPOT.

TABELA 2. Comparação da antigenicidade da proteína A33R predita pelo algoritmo de Jameson e Wolf com a identificação imunológica pelo método de SPOT.

Predição de regiões antigênicas	Regiões imunodominantes determinadas experimentalmente
03-11	-
19-32	-
64-67	-
82-101	80-96
82-101	91-108
120-139	-
151-177	142-159
151-177	160-174

4.6.3 Mapeamento de epítomos da proteína H3L de VCTG

As bibliotecas peptídicas da proteína H3L consistiram de dois arranjos de oligopeptídeos de 15 resíduos com sobreposição de 12 (Figs 19A e 20A), sob a forma de 104 spots distribuídos em 5 linhas. Os dois “pools” de soros apresentaram reação cruzada com alguns peptídeos, no entanto o “pool” de soros de indivíduos infectados reagiu mais intensamente com sete regiões, H3L-1a⁽⁶⁷⁻⁸¹⁾, H3L-2a⁽⁹⁴⁻¹¹⁴⁾, H3L-3a⁽¹¹²⁻¹³²⁾, H3L-4a⁽¹²⁴⁻¹³⁸⁾, H3L-5a⁽²⁴⁷⁻²⁶⁴⁾, H3L-6a⁽²⁵⁹⁻²⁷⁹⁾, H3L-7a⁽²⁷⁴⁻²⁸⁸⁾, identificadas na Fig. 19A e B.

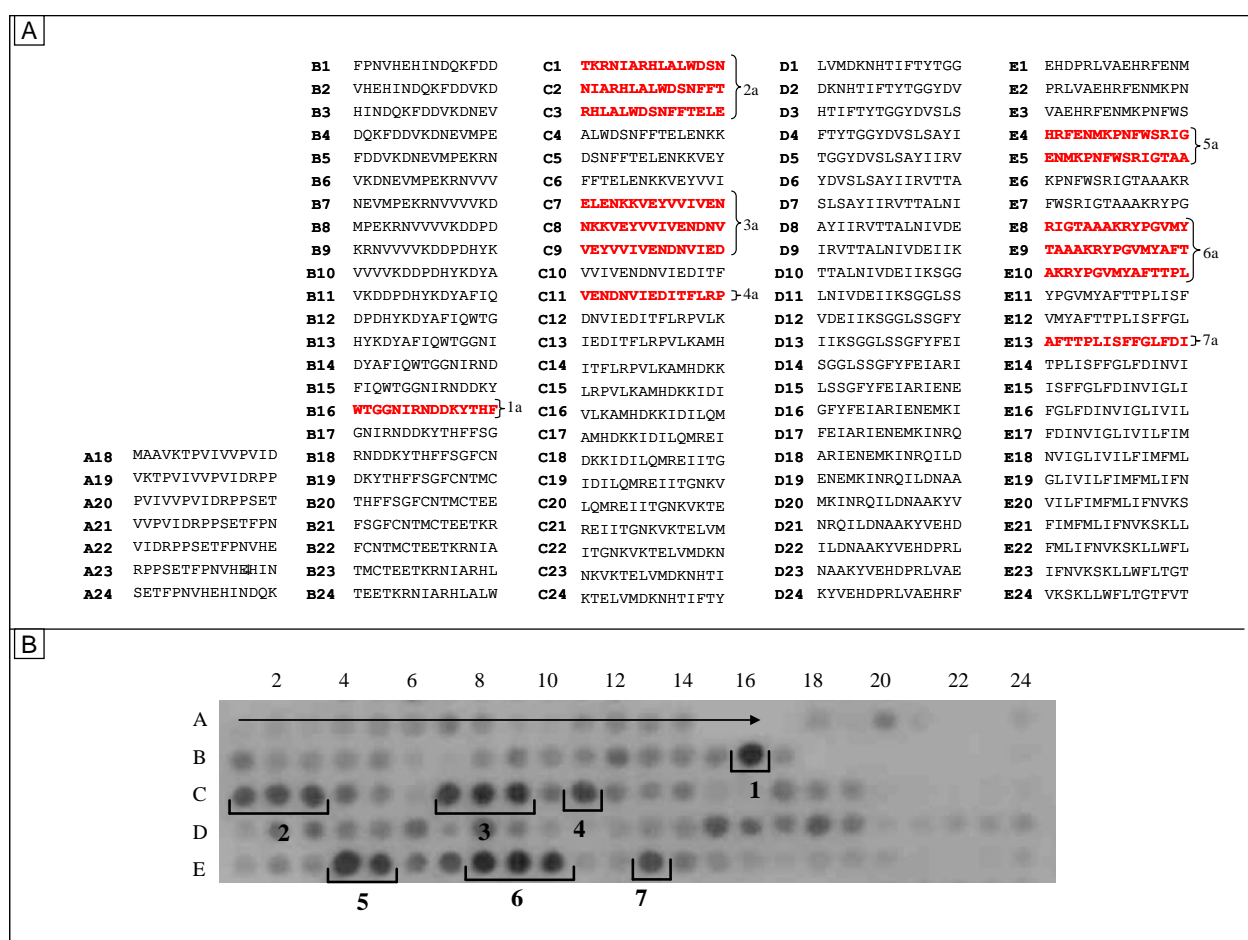


Figura 19. Caracterização dos epítomos da proteína H3L de VACV (membrana a). **(A)** A biblioteca peptídica consistiu de um arranjo de oligopeptídeos de 15 resíduos com sobreposição de 12, sob a forma de 104 spots distribuídos em 5 linhas. **(B)** Detecção das sete regiões imunodominantes utilizando “pool” de soros de indivíduos infectados por VCTG, diluído 1:200. Controles positivos e negativos da síntese e revelação foram incluídos como descrito em materiais e métodos.

Numa segunda membrana sintetizada com a mesma estratégia, o “pool” de soros humanos infectados reagiu mais intensamente com seis regiões H3L-1b⁽⁵⁸⁻⁷²⁾, H3L-2b⁽⁹⁷⁻¹¹⁷⁾, H3L-3b⁽¹¹²⁻¹³²⁾, H3L-4b⁽¹⁶⁹⁻¹⁸³⁾, H3L-5b⁽¹⁷⁵⁻¹⁸³⁾, H3L-6b⁽²³²⁻²⁶⁴⁾, identificadas na Fig. 20A e B. Essas regiões que apresentaram alta reatividade nas duas membranas compartilharam de seqüências comuns, indicando a presença de epítomos de células B imunodominantes.

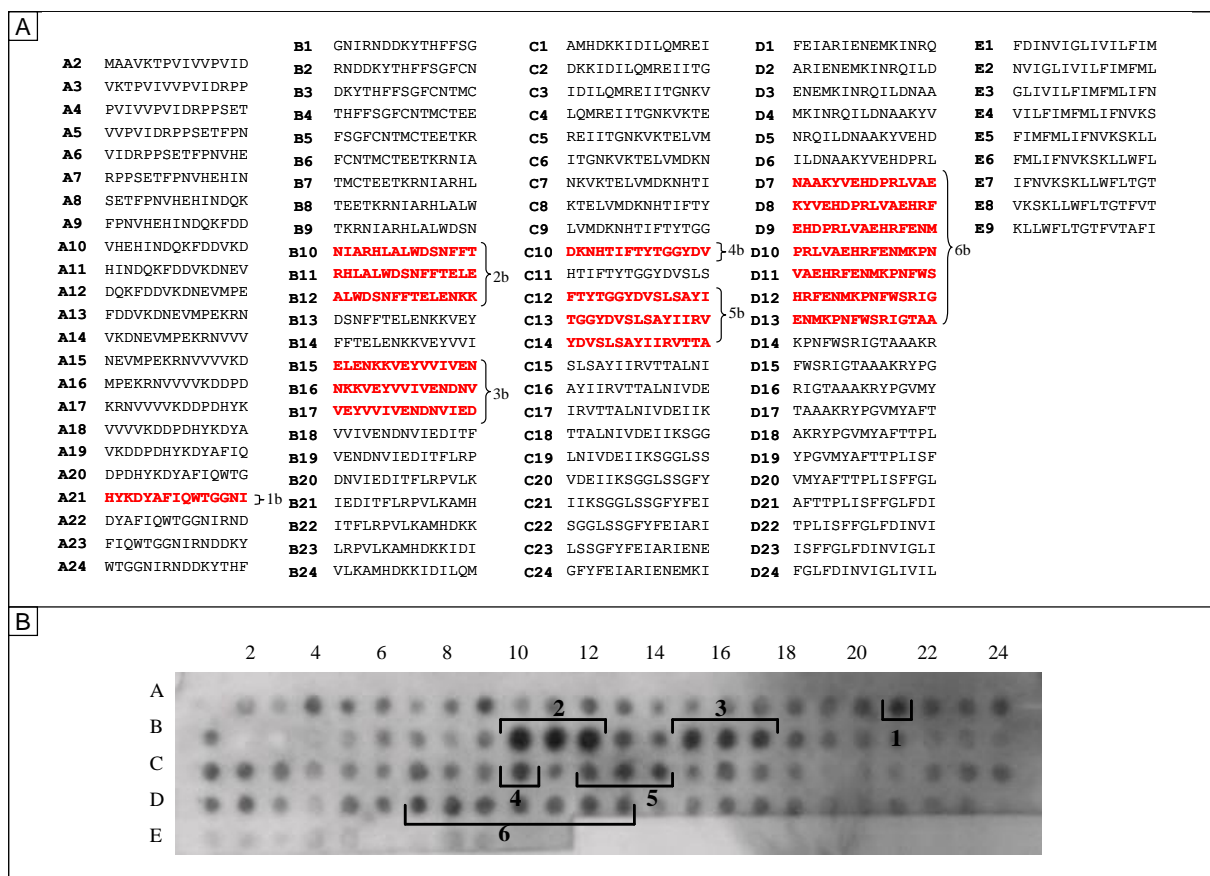


Figura 20. Reanálise da caracterização dos epítomos da proteína H3L de VACV (Fig. 19) (membrana b). **(A)** A biblioteca peptídica consistiu de um arranjo de oligopeptídeos de 15 resíduos com sobreposição de 12, sob a forma de 104 spots distribuídos em 5 linhas. **(B)** Detecção de seis regiões imunodominantes utilizando “pool” de soros de indivíduos infectados por VCTG, diluído 1:200. Controles positivos e negativos da síntese e revelação foram incluídos como descrito em materiais e métodos.

Antes de prosseguir na caracterização dos epítomos, uma comparação aos métodos computacionais foi realizada. Os resultados estão apresentados na Tabela 3. Seguindo a tendência das outras duas proteínas analisadas, com a H3L praticamente todas as regiões preditas foram confirmadas experimentalmente como epítomos imunoreativos.

TABELA 3. Comparação da antigenicidade da proteína H3L predita pelo algoritmo de Jameson e Wolf com a identificação imunológica pelo método de SPOT das Figs 19 e 20.

Predição das regiões antigênicas	Regiões imunodominantes determinadas experimentalmente	
14-22	–	–
28-60	–	58-72
70-78	67-81	–
90-99	94-114	97-117
113-119	112-132	112-132
125-131	124-138	169-183
142-149	–	–
155-164	–	–
166-172	–	175-195
201-210	–	–
218-230	–	–
232-245	–	232-264
247-256	247-264	–
264-271	259-279	–
	274-288	–

A Tabela 4 apresenta uma comparação entre as seqüências imunodominantes identificadas nos dois experimentos das Fig 19 e 20 e a sua resultante.

TABELA 4. Comparação entre as regiões imunodominantes identificadas nos experimentos das Figs 19 e 20.

Regiões imunodominantes determinadas experimentalmente		Sequências comuns aos dois experimentos (a e b)
Membrana a	Membrana b	
H3L-1a(67-81)	H3L-1b(58-72)	67-72
H3L-2a(94-114)	H3L-2b(97-117)	97-114
H3L-3a(112-132)	H3L-3b(112-132)	112-132
H3L-4a(124-138)	H3L-3b(112-132)	124-132
-	H3L-4b(169-183)	-
-	H3L-5b(175-183)	-
H3L-5a(247-264)	H3L-6b(232-264)	232-264
H3L-6a(259-279)	H3L-6b(232-264)	259-264
H3L-7a(274-288)	-	-

A partir destes estudos, uma nova estratégia foi utilizada para refinamento dos resultados. Para tanto, foi obtida uma biblioteca peptídica correspondendo à quatro seqüências da proteína H3L contendo as regiões imunodominantes comuns, identificadas na Tabela 4. As seqüências H3L-SEQI⁽⁶⁵⁻⁸³⁾, H3L-SEQII⁽⁹⁸⁻¹²²⁾, H3L-SEQIII⁽¹⁰⁹⁻¹⁴⁰⁾ e H3L-SEQIV⁽²⁴⁵⁻²⁸¹⁾ foram sintetizadas em dois arranjos que consistiram de oligopeptídeos de 10 resíduos, o primeiro com sobreposição de 7 (Fig. 21A) e o segundo com sobreposição de 5 resíduos (Fig. 22A).

Na estratégia com sobreposição de 7 resíduos de aminoácidos, os peptídeos HLALWDSNFF e LWDSNFFTEL pertencentes à H3L-SEQII⁽⁹⁸⁻¹²²⁾, tiveram alta reatividade ao “pool” de soro humano infectado e compartilharam da seqüência de aminoácidos LWDSNFF (Fig. 21B). Interessantemente, o padrão de reatividade dos peptídeos correspondentes às seqüências H3L-SEQI⁽⁶⁵⁻⁸³⁾, H3L-SEQIII⁽¹⁰⁹⁻¹⁴⁰⁾ e H3L-SEQIV⁽²⁴⁵⁻²⁸¹⁾ ao “pool” de soros de indivíduos infectados foi bem similar à reatividade ao “pool” de soros de indivíduos não vacinados (Fig. 21B).

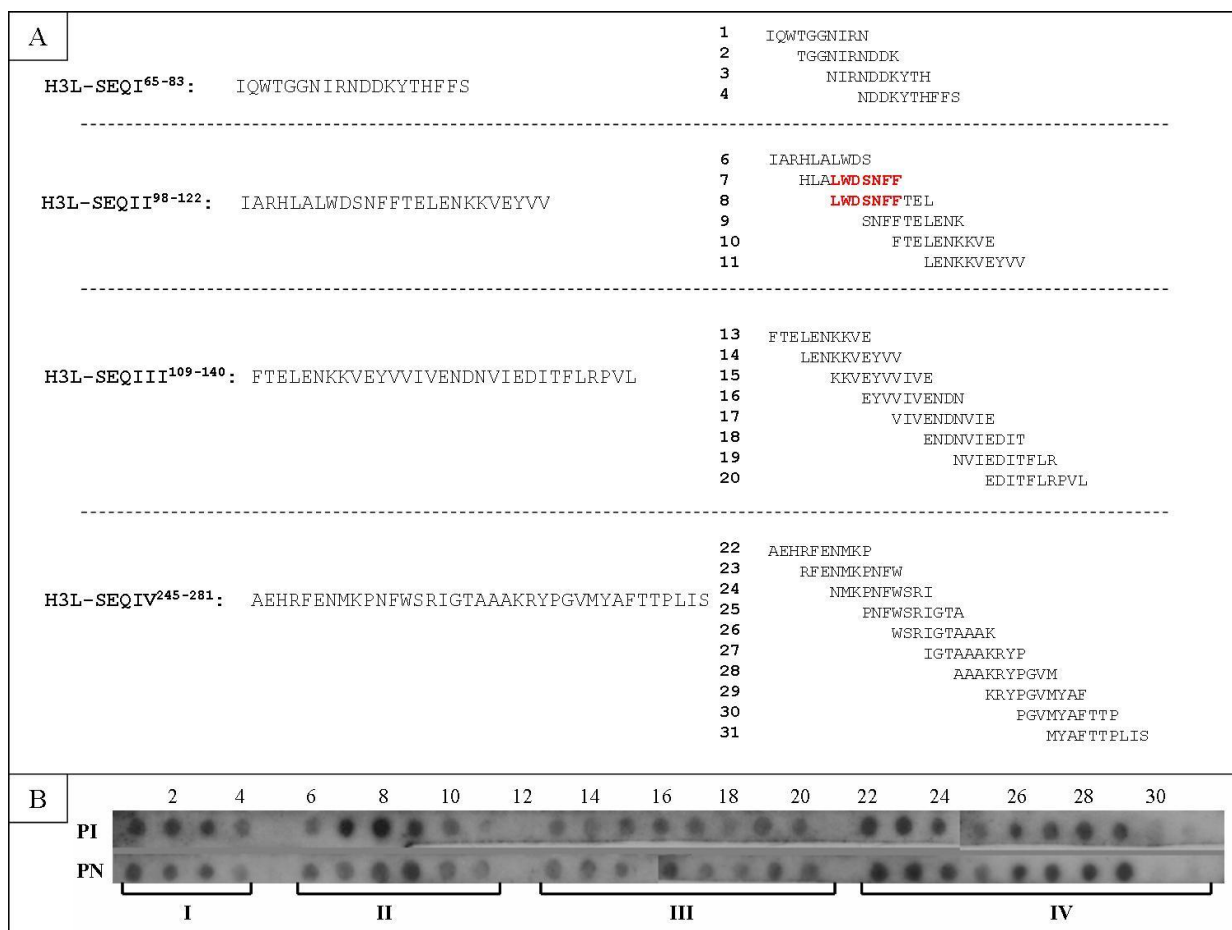


Figura 21. Refinamento dos epítomos da proteína H3L de VVAC usando sobreposição de 7 resíduos. **(A)** A biblioteca peptídica das regiões H3L-SEQI⁽⁶⁵⁻⁸³⁾, H3L-SEQII⁽⁹⁸⁻¹²²⁾, H3L-SEQIII⁽¹⁰⁹⁻¹⁴⁰⁾ e H3L-SEQIV⁽²⁴⁵⁻²⁸¹⁾ consistiu de um arranjo de oligopeptídeos de 10 resíduos com sobreposição de 7, sob a forma de 31 spots distribuídos em 1 linha. **(B)** Identificação dos epítomos por imunoblotting. **PI**, “pool” de soros de indivíduos infectados por VCTG e **PN**, “pool” de soros de indivíduos não vacinados para a varíola, diluídos 1:200. Todos os experimentos foram realizados duas vezes, com idênticos resultados. Controles positivos e negativos da síntese e revelação foram incluídos como descrito em materiais e métodos.

Na estratégia com sobreposição de 5 resíduos de aminoácidos, o peptídeo NDDKYTHFFS pertencente à seqüência H3L-SEQI⁽⁶⁵⁻⁸³⁾, e peptídeo ALWDSNFFTE pertencente à H3L-SEQII⁽⁹⁸⁻¹²²⁾ apresentaram alta reatividade ao “pool” de soros de indivíduos infectados, enquanto que as outras duas seqüências H3L-SEQIII⁽¹⁰⁹⁻¹⁴⁰⁾ e H3L-SEQIV⁽²⁴⁵⁻²⁸¹⁾ mantiveram o padrão de baixa reatividade à ambos os “pools” de soros humanos infectados e normais (Fig. 22B).

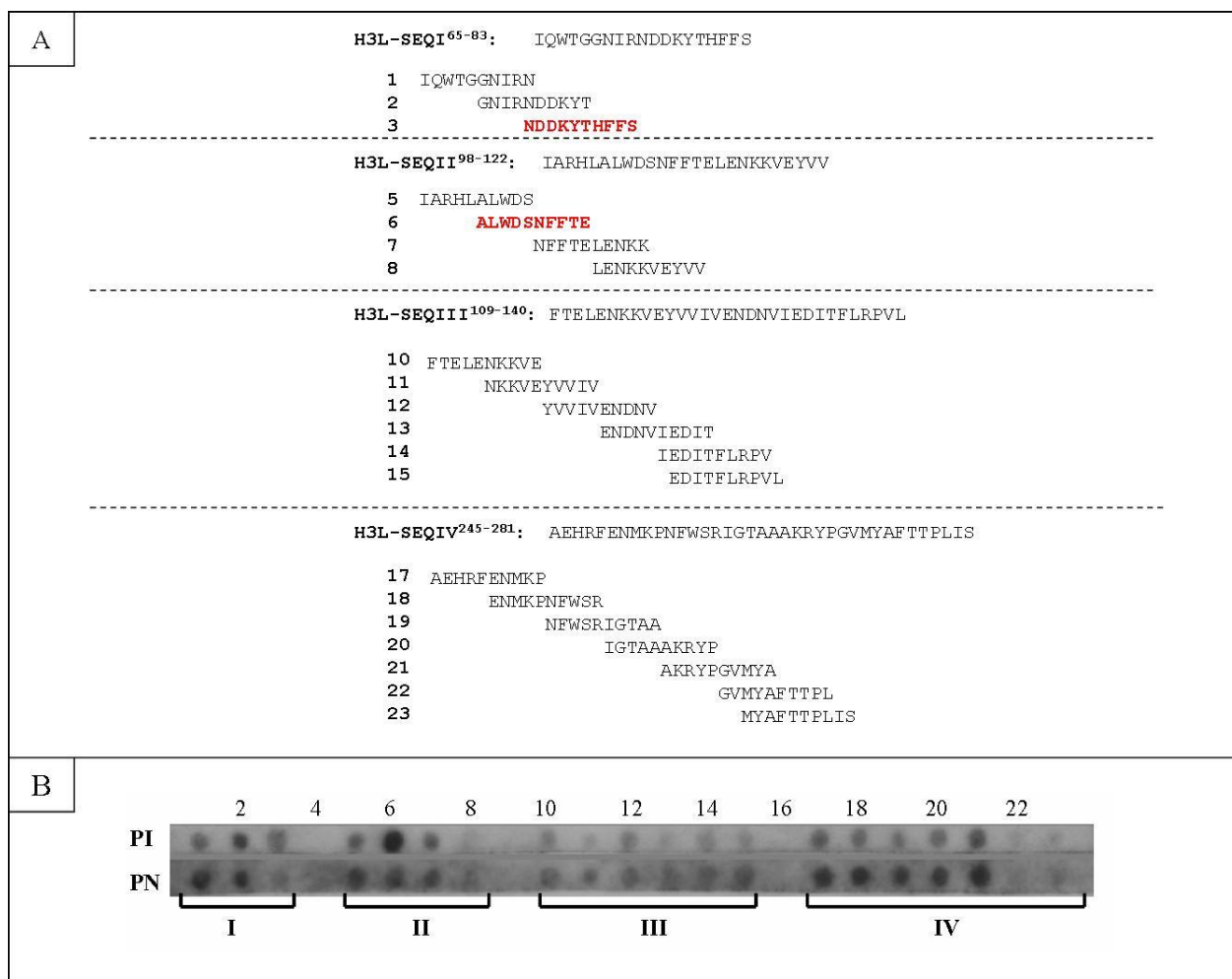


Figura 22. Refinamento dos epítomos da proteína H3L de VVAC usando sobreposição de 5 resíduos. **(A)** A biblioteca peptídica das regiões H3L-SEQI⁽⁶⁵⁻⁸³⁾, H3L-SEQII⁽⁹⁸⁻¹²²⁾, H3L-SEQIII⁽¹⁰⁹⁻¹⁴⁰⁾ e H3L-SEQIV⁽²⁴⁵⁻²⁸¹⁾ consistiu de um arranjo de oligopeptídeos de 10 resíduos com sobreposição de 5, sob a forma de 23 spots distribuídos em 1 linha. **(B)** Identificação dos epítomos por imunoblotting. **PI**, “pool” de soros de indivíduos infectados por VCTG e **PN**, “pool” de soros de indivíduos não vacinados para a varíola, diluídos 1:200. Todos os experimentos foram realizados duas vezes, com idênticos resultados. Controles positivos e negativos da síntese e revelação foram incluídos como descrito em materiais e métodos.

A partir dos experimentos apresentados nas Figs 21 e 22, peptídeos correspondentes aos epítomos lineares NDDKYTHFFS (H3L-EP1⁽⁷⁴⁻⁸³⁾) e ALWDSNFFTE (H3L-EP2⁽¹⁰³⁻¹⁰²⁾) foram sintetizados em membranas de SPOTs e revelados (Fig. 23). O epítomo H3L-EP1⁽⁷⁴⁻⁸³⁾ apresentou reação ligeiramente mais forte ao “pool” de soros de indivíduos infectados em relação ao “pool” de soros de indivíduos não vacinados (Fig. 23A), enquanto que o epítomo H3L-EP2⁽¹⁰³⁻¹¹²⁾ apresentou reatividade alta e específica ao “pool” de soro humano infectado (Fig. 23A).

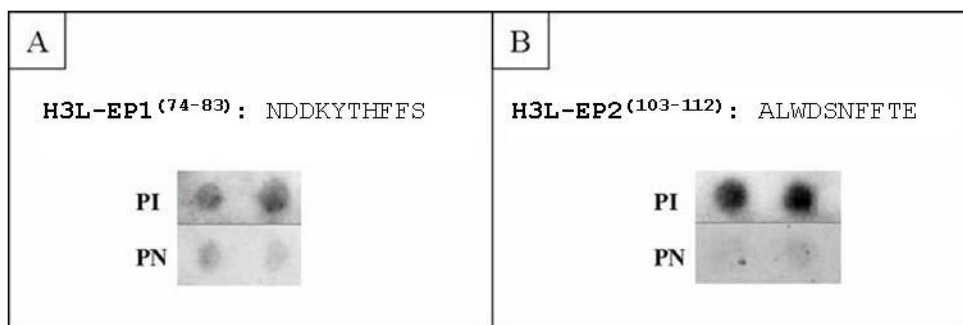


Figura 23. Confirmação da especificidade imunológica dos peptídeos H3L-EP1⁽⁷⁴⁻⁸³⁾ (**A**) e H3L-EP2⁽¹⁰³⁻¹⁰²⁾ (**B**) da proteína H3L ao VVAC. **PI**, “pool” de soros de indivíduos infectados pelo VCTG e **PN**, “pool” de soros humanos normais, diluídos 1:200. Todos os experimentos foram realizados duas vezes. Controles positivos e negativos da síntese e revelação foram incluídos como descrito em materiais e métodos.

As seqüências dos epítomos H3L-EP1⁽⁷⁴⁻⁸³⁾ e H3L-EP2⁽¹⁰³⁻¹¹²⁾ foram analisadas pelo programa BLASTP 2.2.2 para determinação do grau de identidade com seqüências ortólogas de outros *Orthopoxvirus*. Os epítomos H3L-EP1⁽⁷⁴⁻⁸³⁾ e H3L-EP2⁽¹⁰³⁻¹¹²⁾ revelaram 100% e 90% de identidade com o VVAR, respectivamente (Fig. 24A e B). Ambos apresentaram 100% de identidade com outros *Orthopoxvirus* como o buffalopox e horsepox vírus.

A	P20497_VVAC: 74	NDDKYTHFFS	83
		NDDKYTHFFS	
	P33059_VVAR: 75	NDDKYTHFFS	84
B	P20497_VVAC: 103	ALWDSNFFTE	112
		ALWDS FFTE	
	P33059_VVAR: 104	ALWDSKFFTE	113

Figura 24. Comparação das seqüências epitópicas de vírus vaccínia (P20497_VVAC) com suas homólogas em vírus variola (P33059_VVAR). As identidades dos epítomos H3L-EP1⁽⁷⁴⁻⁸³⁾ (**A**) e H3L-EP2⁽¹⁰³⁻¹¹²⁾ (**B**) foram de 100 e 90%, respectivamente, e determinadas pelo programa BLASTP 2.2.2.

A predição da estrutura tridimensional da proteína H3L por modelagem molecular não pode ser realizada devido a inexistência de uma seqüência homóloga que já tenha sua estrutura tridimensional modelada ou elucidada. Portanto, a localização molecular espacial dos epítomos identificados pela metodologia de SPOT não pode ser aplicada para esta proteína.

4.6.4 Mapeamento de epítomos da proteína L1R de VCTG

A biblioteca peptídica da proteína L1R consistiu em um arranjo de oligopeptídeos de 15 resíduos com sobreposição de 12 (Fig. 25A), sob a forma de 80 spots distribuídos em 4 linhas.

O “pool” de soros de indivíduos infectados reagiu mais intensamente com sete regiões, L1R-1⁽⁵⁻³¹⁾, L1R-2⁽⁵⁷⁻⁷⁶⁾, L1R-3⁽⁹²⁻¹¹⁵⁾, L1R-4⁽¹³⁷⁻¹⁵⁴⁾, L1R-5⁽¹⁶⁴⁻¹⁸¹⁾, L1R-6⁽²⁰⁰⁻²¹⁷⁾, L1R-7⁽²²⁴⁻²⁴⁷⁾, identificadas na Fig. 25A e B.

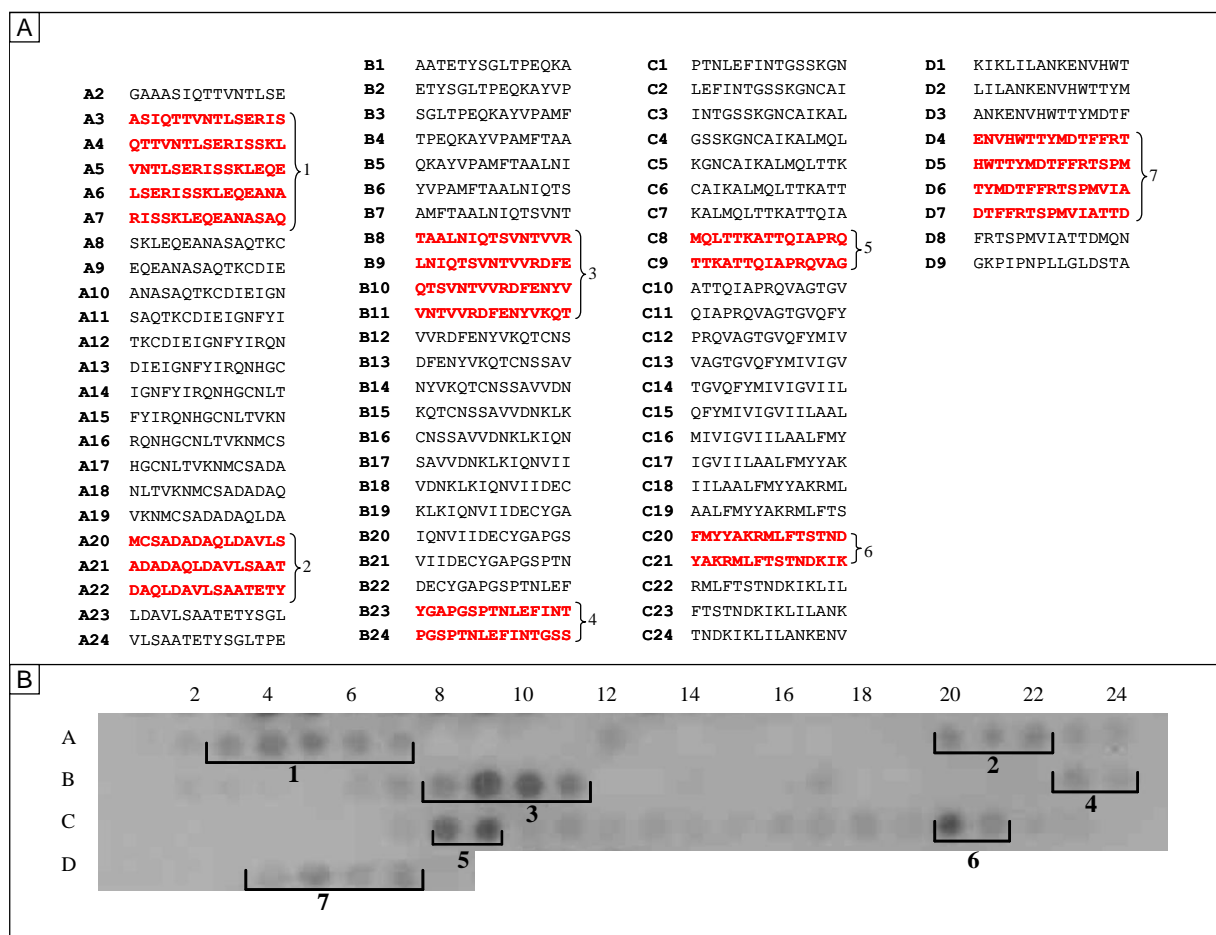


Figura 25. Caracterização dos epítomos da proteína L1R de VVAC. **(A)** A biblioteca peptídica consistiu de um arranjo de oligopeptídeos de 15 resíduos com sobreposição de 12, sob a forma de 80 spots distribuídos em 4 linhas. **(B)** Detecção de sete regiões imunodominantes utilizando “pool” de soros de indivíduos infectados por VCTG, diluído 1:200. Controles positivos e negativos da síntese e revelação foram incluídos como descrito em materiais e métodos.

Um estudo comparativo entre a predição de epítomos da proteína L1R por métodos computacionais e os dados experimentais obtidos estão apresentados na Tabela 5. Das 13 regiões antigênicas previstas, 6 foram confirmadas experimentalmente.

TABELA 5. Comparação da antigenicidade da proteína L1R predita pelo algoritmo de Jameson e Wolf com a identificação imunológica pelo método de SPOT.

Predição de regiões antigênicas	Regiões imunodominantes determinadas experimentalmente
14-29	5-31
30-39	-
45-50	-
57-65	57-76
79-85	-
104-118	92-115
120-128	-
140-146	137-154
150-158	-
174-180	-
212-217	200-217
220-226	224-247
247-250	-

A partir destes estudos, uma nova estratégia de síntese foi utilizada para refinamento dos resultados, ou seja, para a identificação da melhor seqüência que caracteriza os epítomos. Para tanto, foi feita outra síntese peptídica de seqüências contendo as regiões imunodominantes L1R-1⁽⁵⁻³¹⁾, L1R-3⁽⁹²⁻¹¹⁵⁾ e L1R-7⁽²²⁴⁻²⁴⁷⁾ que consistiu em um arranjo de oligopeptídeos de 10 resíduos com sobreposição de 5, sob a forma de 9 spots distribuídos em uma linha (Fig. 26A).

Dentre as seqüências sintetizadas, o peptídeo ERISKLEQE pertencente à L1R-SEQI⁽¹¹⁻²⁹⁾ teve alta reatividade ao “pool” de soros de indivíduos infectados, enquanto que os peptídeos WTTYMDTFFR e DTFFRTSPMV pertencentes à L1R-SEQIII⁽²²⁸⁻²⁴⁷⁾ apresentaram padrão similar de reatividade aos dois “pools”, sendo que os últimos compartilharam da seqüência de aminoácidos DTFFR. O padrão de reatividade de algumas regiões foi bem similar quando comparado ao “pool” de soros de indivíduos não vacinados (Fig. 26B). A seqüência L1R-SEQII⁽⁹³⁻¹¹¹⁾ foi pouco reatora aos “pools” de soros (Fig. 26B).

O peptídeo correspondente ao epítopo ERISKLEQE (L1R-EP1⁽¹⁶⁻²⁵⁾, Fig. 14C) foi sintetizado em membrana de SPOTs e teve sua especificidade confirmada ao soro humano infectado por VCTG (Fig. 26C).

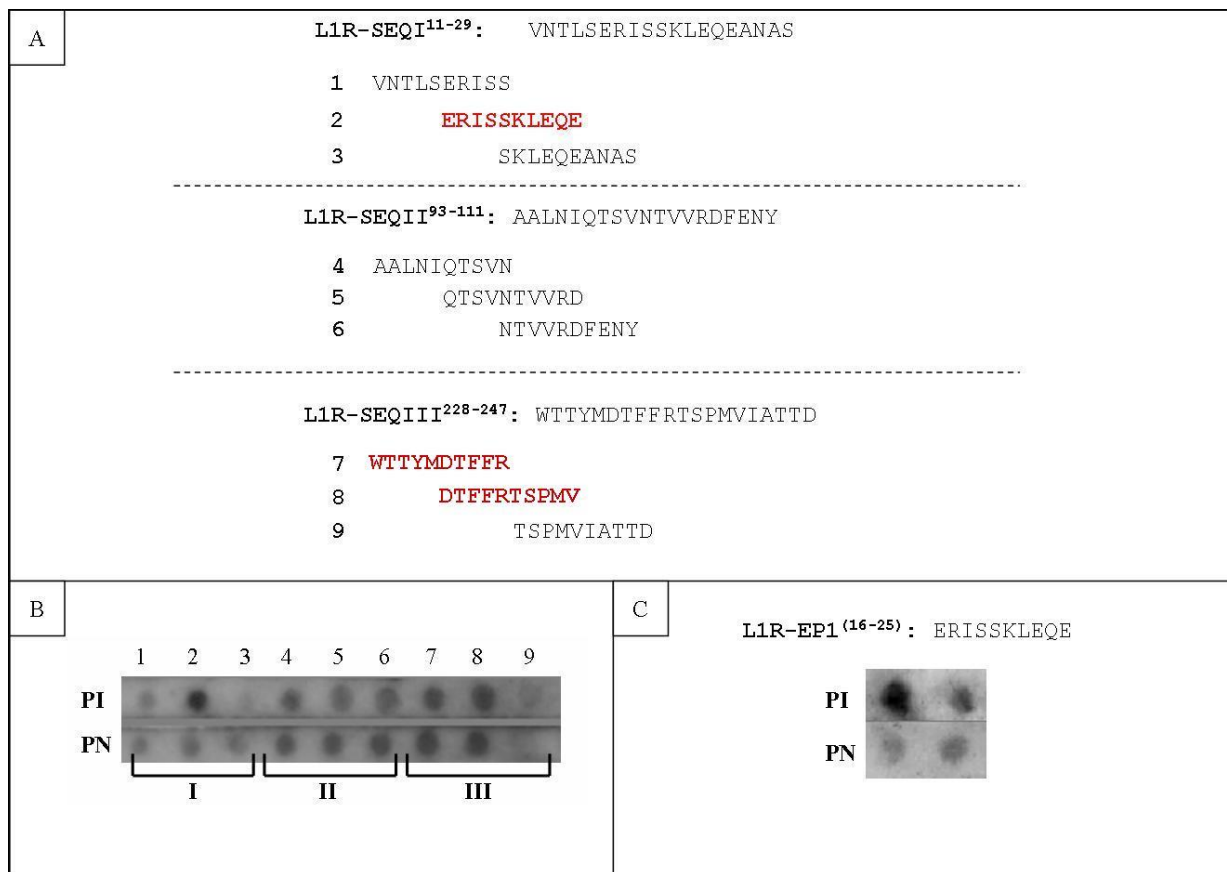


Figura 26. Refinamento das seqüências dos epítomos da proteína L1R de VVAC. **(A)** A biblioteca peptídica das seqüências L1R-SEQI⁽¹¹⁻²⁹⁾, L1R-SEQII⁽⁹³⁻¹¹¹⁾ e L1R-SEQIII⁽²²⁸⁻²⁴⁷⁾ da proteína L1R de VVAC consistiu em um arranjo de oligopeptídeos de 10 resíduos com sobreposição de 5, sob a forma de 9 spots distribuídos em 1 linha. **(B)** Identificação dos epítomos por imunoblotting. **(C)** Ensaio imunológico confirmando a especificidade do epítomo L1R-EP2⁽¹⁶⁻²⁵⁾ ao VCTG. **PI**, “pool” de soros de indivíduos infectados por VCTG e **PN**, “pool” de soros de indivíduos não vacinados para a varíola, diluídos 1:200. Todos os experimentos foram realizados duas vezes. Controles positivos e negativos da síntese e revelação foram incluídos como descrito em materiais e métodos.

As seqüências dos epítomos L1R-EP1⁽¹⁶⁻²⁵⁾ e L1R-EP2⁽²²⁸⁻²⁴²⁾ foram analisadas pelo programa BLASTP 2.2.2 para determinação do grau de identidade com seqüências ortólogas de outros *Orthopoxvirus*. Ambos revelaram 100% de identidade com o VVAR (Fig. 275A e B) e com outros *Orthopoxvirus* como camelpox, cowpox, taterapox, rabbitpox, monkeypox, ectromelia e horsepox vírus.

A				
P20540_VVAC:	16	ERISSKLEQE	25	
		ERISSKLEQE		
P33040_VVAR:	16	ERISSKLEQE	25	
B				
P20540_VVAC:	228	WTTYMDTFFRTSPMV	242	
		WTTYMDTFFRTSPMV		
P33040_VVAR:	228	WTTYMDTFFRTSPMV	242	

Figura 27. Comparação das seqüências epitópicas de vírus vaccínia (P20540_VVAC) com suas homólogas em vírus variola (P33040_VVAR). As Identidades dos epítomos L1R-EP1⁽¹⁶⁻²⁵⁾ (A) e L1R-EP2⁽²²⁸⁻²⁴²⁾ (B) foram de 100%, determinadas pelo programa BLASTP 2.2.2.

Para identificar a localização molecular dos epítomos L1R-EP1⁽¹⁶⁻²⁵⁾ e L1R-EP2⁽²²⁸⁻²⁴²⁾, a estrutura tridimensional da proteína L1R, elucidada por Su *et al.* (2005), foi utilizada. A estrutura quaternária da proteína foi representada em “ribbon” e visualizada pelo programa Swiss-PDB Viewer (Fig. 28A). Utilizando o mesmo programa, a superfície molecular da proteína foi mapeada pelo seu potencial eletrostático. As regiões representando os dois epítomos, L1R-EP1⁽¹⁶⁻²⁵⁾ e L1R-EP2⁽²²⁸⁻²⁴²⁾, apresentaram área de superfície acessíveis, ou seja, as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos apresentaram-se expostas na superfície da proteína, permitindo assim o acesso pelos anticorpos. Em relação ao L1R-EP1⁽¹⁶⁻²⁵⁾, os aminoácidos Glu⁽¹⁶⁾, Arg⁽¹⁷⁾, Ser⁽²⁰⁾ e Glu⁽²³⁾ podem ser destacados como sendo os mais acessíveis, portanto acreditamos que estes sejam os mais importantes para o reconhecimento pelos anticorpos (Fig. 28B).

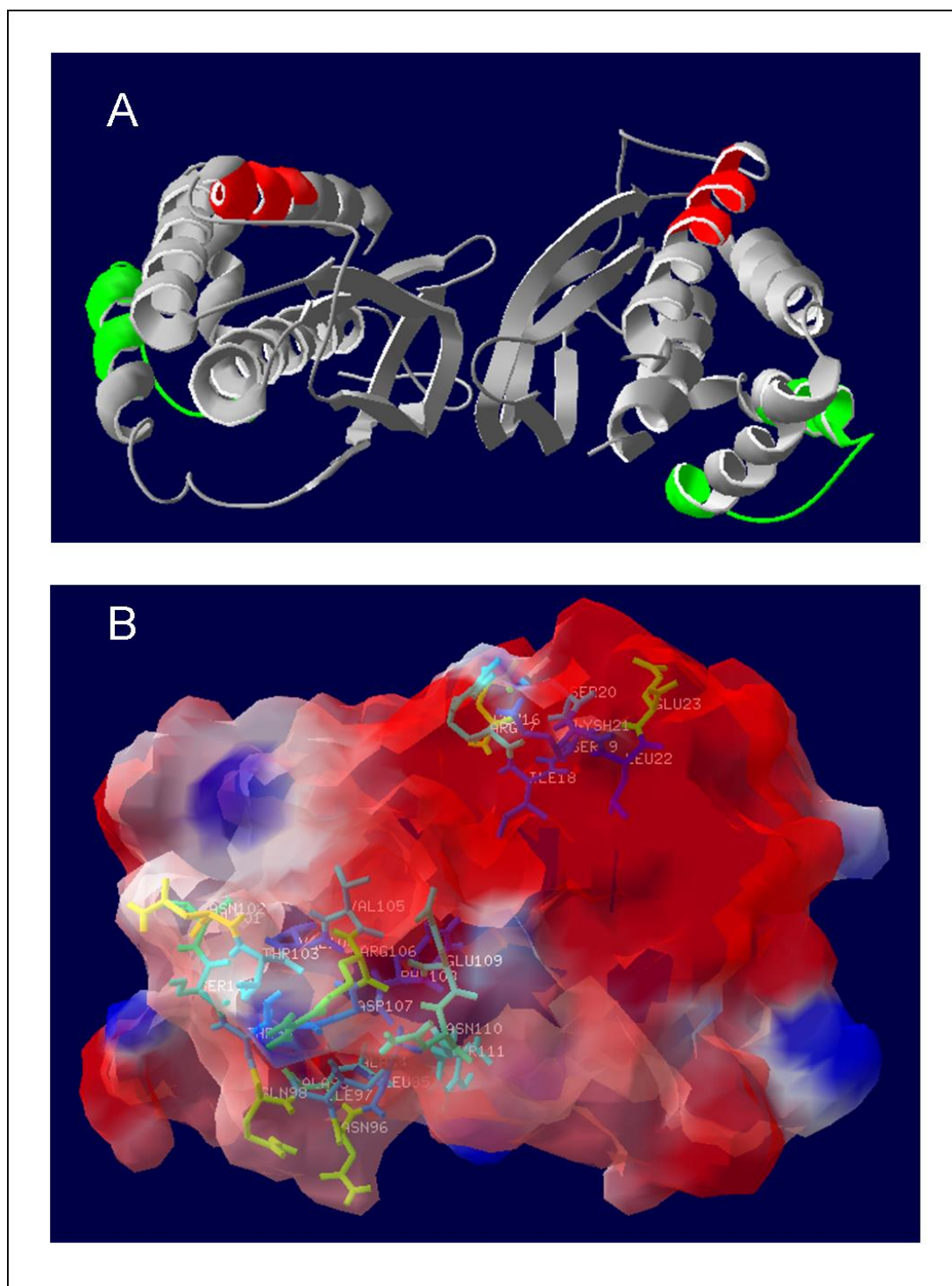


Figura 28. Localização espacial dos epítomos L1R-EP1⁽¹⁶⁻²⁵⁾ e L1R-EP2⁽²²⁸⁻²⁴²⁾ na estrutura tridimensional da proteína L1R de VVAC. **(A)** Estrutura tridimensional da proteína L1R representada em “ribbon” e visualizada pelo programa Swiss-PDB Viewer. Em vermelho está destacado o epítomo L1R-EP1⁽¹⁶⁻²⁵⁾, e em verde o epítomo L1R-EP2⁽²²⁸⁻²⁴²⁾. **(B)** Utilizando o mesmo programa, a superfície molecular da proteína foi mapeada quanto ao seu potencial eletrostático. Os aminoácidos dos epítomos identificados foram assinalados por cores quanto ao grau de acessibilidade ao solvente (quanto mais para o azul, menos acessível, enquanto que quanto mais para o vermelho, mais acessível).

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho mapeamos como epítomos lineares de células B um conjunto de peptídeos das principais proteínas (B5R, H3L, L1R e A33R) do vírus vaccínia, responsáveis pela imunidade protetora humoral conferida pela vacina à varíola. Acredita-se que os genes virais expressos durante a primeira fase da infecção por vaccínia sejam mais imunologicamente relevantes do que os que são expressos durante a fase final da infecção. Esta hipótese é apoiada pelo fato de que as proteínas produzidas durante a primeira fase da infecção podem ser processadas e apresentadas pelas células infectadas mais eficientemente do que aquelas produzidas durante a fase tardia. Esta importância imunológica diferencial de expressão foi bem caracterizada em citomegalovírus (Demkowicz *et al.*, 1992; Reddehase, 2000). Portanto, optamos em caracterizar inicialmente os epítomos das proteínas B5R, A33R, H3L e L1R expressas na fase inicial da doença pelos vírus vaccínia homólogos ao vírus varíola.

5.1 Identificação dos Epítomos e Especificidade pelo Método SPOTs

A proteína **B5R** é uma proteína de membrana encontrada no vírus vaccínia envelopado e indutora importante de anticorpos neutralizantes (Galmiche *et al.*, 1999; Law & Smith, 2001; Hooper *et al.*, 2003). Estudos anteriores com segmentos protéicos clonados aleatoriamente, sugeriram que a interseção SCR1⁽¹⁹⁻⁷⁴⁾-SCR2⁽⁷⁵⁻¹²⁶⁾ e o stalk⁽²⁴⁰⁻²⁷⁵⁾ constituem as principais regiões de ligação de anticorpos humorais (Aldaz-Carroll *et al.* 2005a). Os nossos resultados, empregando uma biblioteca peptídica cobrindo toda a extensão da proteína B5R, corroboram estes estudos e vão além identificando a estrutura primária correta das duas regiões imunogênicas SCR1⁽¹⁹⁻⁷⁴⁾ e SCR2⁽⁷⁵⁻¹²⁶⁾. Além disso, foram identificados cinco outros novos epítomos na proteína B5R reatores ao soro de pacientes infectados por VCTG.

Usando uma biblioteca de peptídeos de 15 aminoácidos de comprimento e sobreposição de 12 aminoácidos identificamos a seqüência **ETSFNNQKV** (epitopo **B5R-EP1**⁽³⁵⁻⁴⁴⁾) da proteína B5R como a região mínima que caracteriza o epitopo da região SCR1 e a seqüência **SELYNKPLYE** como o epitopo **B5R-EP2**⁽⁸³⁻⁹²⁾ da região SCR2 descrita por outros pesquisadores (Aldaz-Carroll *et al.* 2005a). Interessante é o fato de que o peptídeo **B5R-EP1**⁽³⁵⁻⁴⁴⁾ apresentou também uma alta reatividade com o “pool” de soro humano normal, enquanto que o segundo peptídeo **B5R-EP2**⁽⁸³⁻⁹²⁾ reagiu especificamente com soros de indivíduos infectados com VCTG.

Estudos de localização espacial dos epítomos na estrutura tridimensional do antígeno indicaram que ambos se encontram dispostos na superfície molecular da proteína, o que explica sua alta antigenicidade. O alinhamento das regiões correspondentes aos epítomos **B5R-EP1**⁽³⁵⁻⁴⁴⁾ e **B5R-EP2**⁽⁸³⁻⁹²⁾ do VVAC com suas homólogos do VVAR revelou uma identidade de 80% e 100%, respectivamente.

Semelhante a proteína B5R, a proteína **H3L** também esta localizada na superfície de VMIs e, dentre os alvos do VVAC, é o antígeno mais frequentemente reconhecido por soros de indivíduos vacinados (Da Fonseca *et al.*, 2000; Davies *et al.*, 2005b). No entanto, ainda não existem estudos publicados em mapeamento de epítomos B desta proteína.

Empregando a mesma estratégia de identificação de epítomos utilizada para a proteína **B5R**, pelo menos oito regiões imunogênicas (Fig. 19 e 20) foram identificadas. A construção de novas bibliotecas peptídicas com sobreposição de 7 e 5 aminoácidos revelou mais duas possíveis seqüências e as menores seqüências peptídicas que caracterizam estes epítomos (**H3L-R1**⁽⁵⁸⁻⁷²⁾, **H3L-R2**⁽⁷⁴⁻⁸¹⁾, **H3L-R3**⁽¹⁰³⁻¹⁰⁸⁾, **H3L-R4**⁽¹¹²⁻¹³²⁾, **H3L-R5**⁽¹²⁴⁻¹³⁸⁾, **H3L-R6**⁽¹⁷⁵⁻¹⁸³⁾, **H3L-R7**⁽²³²⁻²⁶⁴⁾, **H3L-R8**⁽²⁵⁹⁻²⁷⁴⁾, **H3L-R9**⁽²⁷⁴⁻²⁸⁸⁾). Destas, sete foram reatoras também com o “pool” de soros de indivíduos não vacinados contra a varíola (Fig. 19-22) e duas regiões, **NDDKYTHFFS**

(**H3L-EP1**⁷⁴⁻⁸³) e **ALWDSNFFTE** (**H3L-EP2**¹⁰³⁻¹¹²), altamente reatoras e específicas ao soro de pacientes infectados pelo VCTG (Fig. 23).

Nos experimentos apresentados na Fig. 21, a principal seqüência reatora foi à seqüência **LWDSNFF** e nos experimentos apresentados na Fig. 22 o único peptídeo reator apresentava a seqüência **ALWDSNFFTE**. Portanto, realizando a sobreposição das seqüências podemos concluir que a menor seqüência que caracteriza este epítipo (**H3L-EP2**⁽¹⁰⁴⁻¹¹⁰⁾) corresponde à seqüência **LWDSNFF**.

O alinhamento de ambas regiões epitópicas dentro da mesma classe protéica confirmou uma homologia de 100% para as seqüências ortólogas ao **H3L-EP1**⁽⁷⁵⁻⁸⁴⁾ em VVAR enquanto que 90% para epítipo **H3L-EP2**⁽¹⁰³⁻¹¹²⁾ (Fig. 7). A especificidade da reatividade detectada para o vírus VVAC em relação ao VVAR é devida a uma mutação do aminoácido Asn⁽¹⁰⁸⁾ por Lys⁽¹⁰⁸⁾, respectivamente. Esta substituição confere ao peptídeo de VVAR uma hidrofiliçidade maior e conseqüentemente uma maior acessibilidade ao solvente fazendo com que a cadeia polipeptídica se projete para o exterior da molécula tornando a estrutura mais acessível ao sistema imunológico e disposta a interagir com os anticorpos. As análises de modelagem molecular envolvendo a localização dos epítipos não puderam ser realizados devido a ausência de um homólogo depositado em banco de dados.

A proteína **L1R** possui 250 resíduos e está expressa na superfície do VMI. É uma proteína transmembranar miristilada no resíduo Gly da porção N-terminal e possui uma porção C-terminal hidrofóbica inserida na membrana viral. Esta proteína é essencial para sobrevivência do vírus porque a deleção deste gene acarreta a não maturação do vírus vaccínia (Ravanello & Hruy, 1994). Uma outra observação significativa é que anticorpos anti-L1R são capazes de bloquear a invasão celular das formas VMI dos vírus (Hopper *et al.*, 2004). Esta proteína tem sido usada tanto em vacinas de DNA (Hopper *et al.*, 2004) quanto numa vacina de multicomponentes protéicos (Fogg *et al.*, 2004) acarretando bloqueio significativo do desafio viral/infecção. Apesar deste fato, poucos são os estudos descritos envolvendo a caracterização de seus epítipos quer seja B ou T.

Usado a mesma estratégia anterior de identificação de epítipos, e sintetizando peptídeos de 15 resíduos com sobreposição de 12, pelo menos sete regiões imunogênicas (**L1R-1**⁽⁵⁻³¹⁾, **L1R-2**⁽⁵⁷⁻⁷⁶⁾, **L1R-3**⁽⁹²⁻¹¹⁵⁾, **L1R-4**⁽¹³⁷⁻¹⁵⁴⁾, **L1R-5**⁽¹⁶⁴⁻¹⁸¹⁾, **L1R-6**⁽²⁰⁰⁻²¹⁷⁾ e **L1R-7**⁽²²⁴⁻²⁴⁷⁾) foram identificadas.

A síntese de novas bibliotecas (Fig. 26) permitiu identificar as menores seqüências **ERISSKLEQE** (**L1R-EP1**⁽¹⁶⁻²⁵⁾) e **WTTYMDTFFRTSPMV** (**L1R-EP2**⁽²²⁸⁻²⁴²⁾) como epítipos. A primeira apresentou uma alta e específica reatividade ao soro de pacientes infectados pelo VCTG enquanto a segunda **L1R-EP2**⁽²²⁸⁻²⁴²⁾ reagiu tanto com o soro de pacientes infectados quanto com o soro humano normal.

Estudo de localização, destes dois epítipos, na estrutura tridimensional mostrou que ambos estão posicionados na superfície da proteína. O primeiro **L1R-EP1**⁽¹⁶⁻²⁵⁾ faz parte de uma estrutura em alfa hélice e o epítipo **L1R-EP2**⁽²²⁸⁻²⁴²⁾ é parte alfa hélice e parte uma estrutura em ombro (coil) (Fig. 28), fato que explica a alta antigenicidade e indução de anticorpos humorais. O alinhamento de ambas regiões epitópicas dentro da mesma classe protéica, confirmou uma homologia de 100% às seqüências ortólogas em VVAR, fato que sugere que o segmento é um indutor de imunidade cruzada entre os *Orthopoxvirus*. Como esta proteína também está expressa na superfície de VEEs (Ravanello e Hruby, 1994), a ligação de IgG nos sítios epitópicos identificados deve impedir a translocação membranar, conseqüentemente impedido algumas de suas funções vitais.

Os resultados obtidos para a proteína **A33R**, contrastam com os obtidos para as outras proteínas estudadas quanto à identificação de epítipos específicos. Empregando a mesma estratégia de síntese das

anteriores, isto é, a síntese de peptídeos contendo 15 aminoácidos de extensão e sobreposição de 12 aminoácidos, foram identificadas quatro regiões (A33R-1⁸⁰⁻⁹⁵, A33R-2⁹¹⁻¹⁰⁵, A33R-3¹⁴²⁻¹⁵⁴ e A33R-4¹⁶⁰⁻¹⁷⁴) reatoras tanto com os soros de indivíduos infectados com VCTG quanto com os soros de indivíduos normais (Fig. 18). Entretanto nenhuma região reatora específica com o soro de pacientes infectados com VCTG foi encontrada. Como a análise experimental de determinação de epítomos pela técnica de spot está de acordo com o predito por métodos computacionais (Tabela 2), isto é, todas as regiões identificadas experimentalmente correspondem a epítomos preditos, este fato é um forte indicativo de que esta proteína não apresenta epítomos específicos a VVAC/VVAR.

5.2 Soro “normal” e sua Reatividade

A reatividade do “pool” de soros de indivíduos normais, aos vários peptídeos analisadas neste estudo, abre uma nova discussão quanto ao que podemos considerar como “soro normal” ou “controle negativo de reatividade” no caso de infecções com *Orthopoxvirus* e possivelmente outros vírus.

Nenhuma reatividade contra as principais proteínas avaliadas neste estudo foi detectada nos experimentos de western blotting, empregando esse mesmo “pool” de soros” (Fig 3). Este fato nos leva a concluir que a sensibilidade da técnica do spot é muitas vezes maior que a do western blotting. Além disso, podemos sugerir que a reatividade observada com o “pool” de soros de indivíduos normais” de fato representa a reatividade de um somatório de anticorpos presentes nesses soros que tiveram origens em infecções passadas manifestadas ou não, pelos indivíduos, por diversos *Orthopoxvirus* e/ou outros vírus e agentes infecciosos que possuíam alguma similaridade estrutural as seqüências identificadas. Esta hipótese ainda é apoiada pelo fato de que um número maior de peptídeos sintetizados não foram reatores com nenhum dos dois soros em todos os testes, quer estes peptídeos estivessem em conformação beta, ou regiões hidrofóbicas das moléculas.

5.3 Correlação entre os Métodos Computacionais e os Resultados Experimentais

Cerca de 43 regiões epitópicas, englobando as quatro proteínas estudadas, foram preditas pelos métodos computacionais. Destas, 27 regiões foram confirmadas experimentalmente através da reação com soros humanos. Conseqüentemente os métodos computacionais são bons indicadores da antigenicidade de uma proteína, entretanto este tipo de análise possui suas limitações fato que pode ser aperfeiçoado e confirmado pelo método experimental usado em nossos estudos.

Sessenta e três por cento da predição teórica de regiões que correspondem a possíveis epítomos foram confirmados pelas análises experimentais empregando bibliotecas peptídicas. Isto é, de 43 regiões epitópicas preditas, 27 foram encontradas experimentalmente como epítomos. Uma outra diferença importante é que através dos métodos teóricos somente uma região razoavelmente grande pode ser predita, enquanto que pela síntese de bibliotecas peptídicas uma região mais curta correspondendo mais fielmente ao epítomo pode ser determinada.

5.4 Importância dos Epítomos

Nos últimos anos dois desafios emergiram para a comunidade científica em relação à resposta imune contra a varíola. O primeiro é entender melhor como e porque a resposta imune a este agente infeccioso é poderosa e a proteção vacinal (administrada há mais de 30 anos) uma das mais duradouras que se conhece (i.e. uma memória imunológica longa). O segundo desafio é desenvolver uma nova e segura geração de vacina para a varíola que reduza ou elimine os efeitos adversos associados com a administração da tradicional vacina Dryvax (Fulginiti *et al.*, 2003; Deswal *et al.*, 2005).

Possivelmente, tanto a imunidade celular quanto a humoral desempenham um papel importante no controle da amplificação do VVAC, uma vez que a reposta de linfócitos T citotóxicos reduz a mortalidade em modelos murinos (Wyatt *et al.*, 2004) e está preservada em indivíduos vacinados há mais de 75 anos (Demkowicz *et al.*, 1996; Hammariund *et al.*, 2003) e anticorpos neutralizantes estão presentes por décadas (Parham, 2001). É possível que uma vacina que contivesse múltiplos epítomos peptídicos pudesse conferir uma proteção contra o desafio letal, mas também maior contra o alastramento da doença. Infelizmente, até a presente data, existem somente um número limitado de epítomos T e B descritos (Parham, 2001; Deswal *et al.*, 2005). Portanto, é importante que mais epítomos B e T sejam caracterizados e neste trabalho aprofundamos o conhecimento sobre as estruturas protéicas responsáveis pela imunidade B ao vírus vaccínia. Embora tenhamos identificado vários epítomos das principais proteínas imunogênicas, aparentemente específicos para vaccínia-varíola, outros estudos imunológicos devem ser realizados para nos certificarmos da especificidade. Independente deste fato, as informações obtidas neste estudo poderão ser úteis para o desenvolvimento de futuras terapias mais efetivas, baseadas em anticorpos para infecções por *Orthopoxvirus*, para o desenvolvimento de vacinas peptídicas, mais seguras e com menos efeitos colaterais, e possivelmente para o desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para infecções por *Orthopoxvirus* e ou vaccínia-varíola.

6. CONCLUSÕES

1- Sete epítomos lineares foram identificados nas proteínas B5R da superfície de vírus envelopados (VEEs), sendo seis reatores também com soro de indivíduos normais e um, **B5R-EP2**⁽⁸²⁻⁹¹⁾, específico aos soros de indivíduos infectados com VCTG e 100% homólogo ao VVAR.

2- Dez epítomos lineares foram identificados na proteína H3L, sendo oito reatores também com soros de indivíduos normais e dois, **H3L-EP1**⁽⁷⁴⁻⁸³⁾ e **H3L-EP2**⁽¹⁰³⁻¹¹²⁾, reatores específicos aos soros de pacientes infectados com VCTG e 100% e 90% homólogos ao VVAR, respectivamente.

3- Sete epítomos lineares foram identificados na proteína L1R, sendo seis reatores também com o soro de indivíduos normais e um (**L1R-EP1**⁽¹⁶⁻²⁵⁾) reator específico aos soros de pacientes infectados com VCTG e 100% homólogo ao VVAR.

4- Quatro epítomos lineares foram identificados na proteína A33R, sendo todos reatores tanto com os soros de indivíduos normais quanto com os soros de pacientes infectados com VCTG.

5- Os estudos de modelagem molecular identificaram que três dos epítomos VVAC estão dispostos na superfície das moléculas e fazem parte de regiões não estruturadas (coil) e um em região estruturada (alfa hélice).

6- Sessenta e três por cento da predição teórica, por métodos computacionais, de regiões que correspondem a possíveis epítomos foram confirmados pelas análises experimentais empregando bibliotecas peptídicas.

7. REFERÊNCIAS

- Aldaz-Carroll L, Whitbeck JC, de Leon MP, Lou H, Hirao L, Isaacs SN *et al* (2005a). Epitope-mapping studies define two major neutralization sites on the vaccinia virus extracellular enveloped virus glycoprotein B5R. **J Virol**;79:6260-6271.
- Aldaz-Carroll L, Whitbeck JC, de Leon MP, Lou H, Pannell LK, Lebowitz J *et al* (2005b). Physical and immunological characterization of a recombinant secreted form of the membrane protein encoded by the vaccinia virus L1R gene. **Virology**;341:59-71.
- Alibek K (2004). Smallpox: a disease and a weapon. **Int J Infect Dis**; 8: S3–8.
- Barquet N, Domingo P (1997). Smallpox: the triumph over the most terrible of the ministers of death. *Ann Intern Med*;127:635-642. Erratum in: **Ann Intern Med** 128:787.
- Bell E, Shamim M, Whitbeck JC, Sfyroera G, Lambris JD, Isaacs SN (2004). Antibodies against the extracellular enveloped virus B5R protein are mainly responsible for the EEV neutralizing capacity of vaccinia immune globulin. **Virology** 325:425-431.
- Belongia EA, Naleway AL (2003). Smallpox vaccine: the good, the bad, and the ugly. **Clin Med Res** 1:87-92.
- Berche P (2001). The threat of smallpox and bioterrorism. **Trends Microbiol** 9:15-18.
- Blasco R, Cole NB, Moss B (1991). Sequence analysis, expression, and deletion of a vaccinia virus gene encoding a homolog of profilin, a eukaryotic actin-binding protein. **J Virol** 65:4598-4608.
- Blasco R, Moss B (1992). Role of cell-associated enveloped vaccinia virus in cell-to-cell spread. *J Virol* 66:4170-4179. Erratum in: **J Virol** 1992 Sep;66(9):5703-5704.
- Boulter EA, Appleyard G (1973). Differences between extracellular and intracellular forms of poxviruses and their implications. **Prog Med Virol** 1973; 16: 86–108.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. **Analyt Biochem** 72:248-254.
- Bray M, Wright ME (2003). Progressive vaccinia. **Clin Infect Dis** 36:766-774.
- Bray M, Buller M (2004). Looking back at Smallpox. **Clin Infect Dis** 38:882-889.
- Bray M, Roy CJ (2004). Antiviral prophylaxis of smallpox. **J Antimicrob Chemother** 54:1-5.
- Carter GC, Rodger G, Murphy BJ, Law M, Krauss O, Hollinshead M, Smith GL (2003). Vaccinia virus cores are transported on microtubules. **J Gen Virol** 84:2443-2458.
- Chen Z, Earl P, Americo J, Damon I, Smith SK, Zhou Y *et al* (2006). Chimpanzee/human mAbs to vaccinia virus B5 protein neutralize vaccinia and smallpox viruses and protect mice against vaccinia virus. **Proc Natl Acad Sci USA** 103:1882-1887.
- Cono J, Casey CG, Bell DM (2003). Smallpox vaccination and adverse reactions. Guidance for clinicians. **MMWR Recomm Rep** 52:1-28
- Cudmore S, Cossart P, Griffiths G, Way M (1995). Actin-based motility of vaccinia virus. **Nature** 378:636-638.
- Da Fonseca FG, Wolffe EJ, Weisberg A, Moss B (2000). Characterization of the vaccinia virus H3L envelope protein: topology and posttranslational membrane insertion via the C-terminal hydrophobic tail. **J Virol** 74:7508-7517.
- Damaso CR, Esposito JJ, Condit RC, Moussatche 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.

- Davies DH, Liang X, Hernandez JE, Randall A, Hirst S, Mu Y *et al* (2005a). Profiling the humoral immune response to infection by using proteome microarrays: high-throughput vaccine and diagnostic antigen discovery. **Proc Natl Acad Sci USA** 102:547-552.
- Davies DH, McCausland MM, Valdez C, Huynh D, Hernandez JE, Mu Y *et al* (2005b). Vaccinia virus H3L envelope protein is a major target of neutralizing antibodies in humans and elicits protection against lethal challenge in mice. **J Virol** 79:11724-33.
- Demkowicz WE, Maa JS, Esteban M (1992). Identification and characterization of vaccinia virus genes encoding proteins that are highly antigenic in animals and are immunodominant in vaccinated humans. **J Virol** 66: 386-398.
- Demkowicz WE, Littau RA, Wang J, Ennis FA (1996). Human cytotoxic T-cell memory: long-lived responses to vaccinia virus. **J Virol** 70:2627-2631.
- Deswal R, Singh R, Lynn AM, Frank R (2005). Identification of immunodominant regions of *Brassica juncea* glyoxalase I as potential antitumor immunomodulation targets. **Peptides** 26:395-404.
- Earl PL, Americo JL, Wyatt LS, Eller LA, Whitbeck JC, Cohen GH, *et al* (2004). Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox. **Nature** 428:182-185.
- Empig C, Kenner JR, Perret-Gentil M, Youree BE, Bell E, Chen A *et al* (2006). Highly attenuated smallpox vaccine protects rabbits and mice against pathogenic orthopoxvirus challenge. **Vaccine** 24:3686-3694.
- Engelstad M, Howard ST, Smith GL (1992). A constitutively expressed vaccinia gene encodes a 42-kDa glycoprotein related to complement control factors that forms part of the extracellular virus envelope. **Virology** 188:801.
- Engelstad M, Smith GL (1993). The vaccinia virus 42-kDa envelope protein is required for the envelopment and egress of extracellular virus and for virus virulence. **Virology** 194:627-637.
- Enserink M (2004). Smallpox Vaccines: Looking Beyond the Next Generation. **Science** 304:809.
- Fenner F, Henderson DA, Arita I, Jezek Z, Ladnyi ID (1988). **Smallpox and its eradication**. Geneva: Organização Mundial de Saúde, Switzerland
- Fenner F. Poxviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. **Fields Virology**. Philadelphia, Lippincott-Raven; 1996. p. 2673-2702.
- Fogg C, Lustig S, Whitbeck JC, Eisenberg RJ, Cohen GH, Moss B (2004). Protective immunity to vaccinia virus induced by vaccination with multiple recombinant outer membrane proteins of intracellular and extracellular virions. **J Virol** 78:10230-10237.
- Frank R, Overwin H (1996). SPOT Synthesis: epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. In: Morris GE, ed. **Methods in Molecular Biology**. Totowa, NJ: Humana Press, 66:149-169.
- Frank, R (2002). The SPOT-synthesis technique synthetic peptide arrays on membrane supports-principles and applications. **J Immunol Methods** 267: 13-26.
- Fulginiti VA, Kempe CH, Hathaway WE, *et al* (1968). Progressive vaccinia in Immunologically deficient individuals. **Birth Defects Original Article Series** 4:129-145.
- Fulginiti VA, Papier A, Lane JM, Neff JM, Henderson DA (2003). Smallpox vaccination: a review, part I. Background, vaccination technique, normal vaccination and revaccination, and expected normal reactions. **Clin Infect Dis** 37:241-250.
- Galmiche MC, Goenaga J, Wittek R, Rindisbacher L (1999). Neutralizing and protective antibodies directed against vaccinia virus envelope antigens. **Virology** 254:71-80.
- Geddes AM (2006). The history of smallpox. **Clin Dermatol** 24:152-157.

- Goldstein JA, Neff JM, Lane JM, Koplan JP (1975). Smallpox vaccination reactions, prophylaxis, and therapy of complications. **Pediatrics** 55:342-347.
- Greenberg RN, Kennedy JS, Clanton DJ, Plummer EA, Hague L, Cruz J *et al* (2005). Safety and immunogenicity of new cell-cultured smallpox vaccine compared with calf-lymph derived vaccine: a blind, single-centre, randomised controlled trial. **Lancet** 365: 398–409.
- Gubser C, Smith GL (2002). The sequence of camelpox virus shows it is most closely related to variola virus, the cause of smallpox. **J Gen Virol** 83:855-872.
- Gubser C, Hue S, Kellam P, Smith GL (2004). Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. **J Gen Virol** 85:105-117.
- Halsell JS, Riddle JR, Atwood JE, Gardner P, Shope R, Poland GA *et al* (2003). Myopericarditis following smallpox vaccination among vaccinia-naive US military personnel. **JAMA** 289:3283-3289.
- Hammarlund EM, Lewis W, Hansen SG, Strelow LI, Nelson JA, Sexton GJ, *et al* (2003). Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. **Nat Med** 9:1131–1137.
- Henderson DA (1998). Bioterrorism as a public health threat. **Emerg Infect Dis** 4:488-492.
- Henderson DA (1999). Smallpox: clinical and epidemiologic features. **Emerg Infect Dis** 5:537-539.
- Henderson DA, Borio LL, Lane JM (2004). Smallpox and vaccinia. In: Plotkin SA, Orenstein WA, eds. **Vaccines**, 4th.ed. Philadelphia: Saunders, p.123-153.
- Hollinshead M, Rodger G, Van Eijl H, Law M, Hollinshead R, Vaux DJ, *et al* (2001). Vaccinia virus utilizes microtubules for movement to the cell surface. **J Cell Biol** 154:389-402.
- Hooper JW, Custer DM, Schmaljohn CS, Schmaljohn AL (2000). DNA vaccination with vaccinia virus L1R and A33R genes protects mice against a lethal poxvirus challenge. **Virology** 266:329-339.
- Hooper JW, Custer DM, Thompson E (2003). Four-gene-combination DNA vaccine protects mice against a lethal vaccinia virus challenge and elicits appropriate antibody responses in nonhuman primates. **Virology** 306:181-195.
- Hooper JW, Thompson E, Wilhelmsen C, Zimmerman M, Ichou MA, Steffen SE *et al.* (2004). Smallpox DNA vaccine protects nonhuman primates against lethal monkeypox. **J Virol** 78:4433-4443.
- Hujer AM, Bethel CR, Bonomo RA (2004). Antibody mapping of the linear epitopes of CMY-2 and SHV-1 beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother** 48:3980-8.
- Ichihashi Y, Dales S (1971). Biogenesis of poxviruses: interrelationship between hemagglutinin production and polykaryocytosis. **Virology** 46:533-543.
- Ichihashi Y, Oie M (1996a). Neutralizing epitope on penetration protein of vaccinia virus. **Virology** 220:491-494.
- Ichihashi Y (1996b). Extracellular enveloped vaccinia virus escapes neutralization. **Virology** 217:478-485.
- Isaacs SN, Wolffe EJ, Payne LG, Moss B (1992). Characterization of a vaccinia virus-encoded 42-kilodalton class I membrane glycoprotein component of the extracellular virus envelope. **J Virol** 66:7217-7224.
- Kenner J, Cameron F, Empig C, Jobs DV, Gurwith M (2006). LC16m8: an attenuated smallpox vaccine. *Vaccine* 24:7009-7022.**

- Kolhapure RM, Deolankar RP, Tupe CD, Raut CG, Basu A, Dama BM et al (1997). Investigation of buffalopox outbreaks in Maharashtra State during 1992-1996. **Indian J Med Res** 106:441-446.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227:680-685.
- Law M, Smith GL (2001). Antibody neutralization of the extracellular enveloped form of vaccinia virus. **Virology** 280:132-142.
- Law M, Hollinshead R, Smith GL (2002). Antibody-sensitive and antibody-resistant cell-to-cell spread by vaccinia virus: role of the A33R protein in antibody-resistant spread. *J Gen Virol*; 83:209-222. Erratum in: **J Gen Virol** 2002; 83:1251.
- Likos AM, Sammons SA, Olson VA, Frace AM, Li Y, Olsen-Rasmussen M et al (2005). A tale of two clades: monkeypox viruses. **J Gen Virol** 86:2661-2672.
- Lin CL, Chung CS, Heine HG, Chang W (2000). Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo. **J Virol** 74:3353-3365.
- Lobato ZIP, Trindade GS, Frois MCM, Ribeiro EBT, Dias GRC, Teixeira BM *et al* (2005). Outbreak of exantemal disease caused by Vaccinia virus in human and cattle in Zona da Mata region, Minas Gerais. **Arq Bras Med Vet Zootec** 57:423-429.
- Massoudi MS, Barker L, Schwartz B (2003). Effectiveness of postexposure vaccination for the prevention of smallpox: results of a delphi analysis. **J Infect Dis** 188:973-976.
- Massung RF, Liu LI, Qi J, Knight JC, Yuran TE, Kerlavage AR et al.(1994) Analysis of the complete genome of smallpox variola major virus strain Bangladesh-1975. **Virology** 201:215-240.
- Meyer H, Sutter G, Mayr A (1991). Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. **J Gen Virol** 72:1031-1038.
- Moore ZS, Seward JF, Lane JM. Smallpox (2006). **Lancet**.367:425-35.
- Moss B, Rosenblum EN (1973). Protein cleavage and poxvirus morphogenesis: tryptic peptide analysis of core precursors accumulated by blocking assembly with rifampicin. **J Mol Biol** 81:267-269.
- Moss, B (2001). Poxviridae: the viruses and their replication. *In*: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick J, Monath TP, Roizman B, Straus SE, eds. **Virology**. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia; 2, 2849-2883.
- Nagasse-Sugahara TK, Kisielius JJ, Ueda-Ito M, Curti SP, Figueiredo CA, Cruz AS et al (2004). Human vaccinia-like virus outbreaks in Sao Paulo and Goias States, Brazil: virus detection, isolation and identification. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 46:315-322.
- Nitsche A, Ellerbrok H, Pauli G (2004). Detection of orthopoxvirus DNA by real-time PCR and identification of variola virus DNA by melting analysis. **J Clin Microbiol** 42:1207-1213.
- Oie M, Shida, H, Ichihashi Y (1990). The function of the vaccinia hemagglutinin in the proteolytic activation of infectivity. *Virology* 176:494-504.**
- Olson VA, Laue T, Laker MT, Babkin IV, Drosten C, Shchelkunov SN et al (2004). Real-time PCR system for detection of orthopoxviruses and simultaneous identification of smallpox virus. **J Clin Microbiol** 42:1940-1946.
- Otero M, Calarota SA, Dai A, De Groot AS, Boyer JD, Weiner DB (2006). Efficacy of novel plasmid DNA encoding vaccinia antigens in improving current smallpox vaccination strategy. **Vaccine** 24:4461-4470.

- Parham P (2001). **O Sistema Imune**. Porto Alegre: Artmed; p.372.
- Parrino J, McCurdy LH, Larkin BD, Gordon IJ, Rucker SE, Enama ME et al (2007). Safety, immunogenicity and efficacy of modified vaccinia Ankara (MVA) against Dryvax((R)) challenge in vaccinia-naive and vaccinia-immune individuals. **Vaccine** 25:1513-1525.
- Payne LG (1980). Significance of extracellular enveloped virus in the *in vitro* and *in vivo* dissemination of vaccinia. **J Gen Virol** 50:89-100.
- Poland GA (2005). Smallpox vaccines: from first to second to third generation. **Lancet** 365:362-363.
- Pu MM, Alberini I, Midgley CM, Manini I, Montomoli E, Smith GL (2005). Prevalence of antibodies to Vaccinia virus after smallpox vaccination in Italy. **J Gen Virol** 86:2955-2960.
- Quirino F, De Simone SG (2007). Characterization of B epitopes recognized by monoclonal antibody and polyclonal antibodies against the horse IgG immunoglobulin (in preparation).
- Ravanello MP, Hruby DE (1994). Conditional lethal expression of the vaccinia virus L1R myristylated protein reveals a role in virion assembly. **J Virol** 68:6401-6410.
- Reddehase MJ (2000). The immunogenicity of human and murine cytomegaloviruses **Curr Opin Immunol** 12:738-743.
- Rietdorf J, Ploubidou A, Reckmann I, Holmstrom A, Frischknecht F, Zettl M, et al. (2001) Kinesin-dependent movement on microtubules precedes actin-based motility of vaccinia virus. **Nat Cell Biol** 3:992-1000.
- Rodriguez JF, Smith GL (1990). IPTG-dependent vaccinia virus: identification of a virus protein enabling virion envelopment by Golgi membrane and egress. **Nucleic Acids Res** 18:5347-5351.
- Roizman B, Joklik W, Fields B, Moss B (1994). The destruction of smallpox virus stocks in national repositories: a grave mistake and a bad precedent. Infect Agents Dis 3:215-217.**
- Roos N, Cyrklaff M, Cudmore S, Blasco R, Krijnse-Locker J, Griffiths G (1996). A novel immunogold cryoelectron microscopic approach to investigate the structure of the intracellular and extracellular forms of vaccinia virus. **EMBO J** 15: 2343-2355.
- Roper RL, Payne LG, Moss B (1996). Extracellular vaccinia virus envelope glycoprotein encoded by the A33R gene. **J Virol** 70:3753-3762.
- Ropp SL, Jin Q, Knight JC, Massung RF, Esposito JJ (1995). PCR strategy for identification and differentiation of small pox and other orthopoxviruses. **J Clin Microbiol** 33:2069-2076.
- Rubins KH, Hensley LE, Jahrling PB, Whitney AR, Geisbert TW, Huggins JW et al (2004). The host response to smallpox: analysis of the gene expression program in peripheral blood cells in a nonhuman primate model. **Proc Natl Acad Sci USA** 101:15190-15195.
- Sale TA, Melski JW, Stratman EJ (2006). Monkeypox: An epidemiologic and clinical comparison of African and US disease. **J Am Acad Dermatol** 55:478-481.
- Sanderson CM, Frischknecht F, Way M, Hollinshead M, Smith GL (1998). Roles of vaccinia virus EEV-specific proteins in intracellular actin tail formation and low pH-induced cell-cell fusion. **J Gen Virol** 79:1415-1425.
- Sanderson CM, Hollinshead M, Smith GL (2000). The vaccinia virus A27L protein is needed for the microtubule-dependent transport of intracellular mature virus particles. **J Gen Virol** 81:47-58.
- Santona A, Carta F, Fragh P, Turrini F (2002). Mapping antigenic sites of an immunodominant surface lipoprotein of Mycoplasma agalactiae, AvgC, with the use of synthetic peptides. **Infect Immun** 70:171-176.

- Schatzmayr HG, Lemos ER, Mazur C, Schubach A, Majerowicz S, Rozentel T et al (2000). Detection of poxvirus in cattle associated with human cases in the State of Rio de Janeiro: preliminary report. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 95:625-627.
- Schmelz M, Sodeik B, Ericsson M, Wolffe E, Shida H, Hiller G *et al* (1994). Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. **J Virol** 68:130-147.
- Seet BT, Johnston JB, Brunetti CR, Barrett JW, Everett H, Cameron C et al (2003). Poxviruses and immune evasion. **Annu Rev Immunol** 21:377-423.
- Shchelkunov SN, Massung RF, Esposito JJ (1995). Comparison of the genome DNA sequences of Bangladesh-1975 and India-1967 variola viruses. **Virus Res** 36:107-118.
- Shchelkunov SN, Marennikova SS, Moyer RW (2005). **Orthopoxviruses pathogenic for humans**. New York, NY, Springer Verlag. p. 425.
- Slifka MK (2005). The Future of Smallpox Vaccination: is MVA the key? **Medical Immunology** 4:2.
- Smith GL (1999). Vaccinia virus immune evasion. **Immunol Lett** 65:55-62.
- Smith GL, Vanderplasschen A, Law M (2002). The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. **J Gen Virol** 83:2915-2931.
- Smith GL, Law M (2004). The exit of vaccinia virus from infected cells. **Virus Res** 106:189-197.
- Stokes GV (1976). High-voltage electron microscope study of the release of vaccinia virus from whole cells. **J Virol** 18:636-643.
- Su HP, Garman SC, Allison TJ, Fogg C, Moss B, Garboczi DN (2005). The 1.51-Angstrom structure of the poxvirus L1 protein, a target of potent neutralizing antibodies. **Proc Natl Acad Sci USA** 102:4240-4245.
- Tam JP (1995). Synthesis and applications of branched peptides in immunological methods and vaccines. In B. Gutte, ed. **Peptides: synthesis, structures & applications**. New York, NY: Academic Press, Inc p. 455-493.
- Tooze J, Hollinshead M, Reis B, Radsak K, Kern H (1993). Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. **Eur J Cell Biol** 60:163-178.
- Trindade GS, da Fonseca FG, Marques JT, Nogueira ML, Mendes LC, Borges AS et al (2003). Aracatuba virus: a vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle. **Emerg Infect Dis**. 9:155-160.
- Trindade GS, da Fonseca FG, Marques JT, Diniz S, Leite JA, Kroon EG *et al* (2004). Belo Horizonte virus: a vaccinia-like virus lacking the A-type inclusion body gene isolated from infected mice. **J Gen Virol** 85: 2015-2021.
- Turner GS, Squires EJ (1971). Inactivated smallpox vaccine: immunogenicity of inactivated intracellular and extracellular vaccinia virus. **J Gen Virol** 13:19-25.
- Upton C, Slack S, Hunter AL, Ehlers A, Roper RL (2003). Poxvirus orthologous clusters: toward defining the minimum essential poxvirus genome. **J Virol** 77: 7590-7600.
- van Eijl H, Hollinshead M, Smith GL (2000). The vaccinia virus A36R protein is a type Ib membrane protein present on intracellular but not extracellular enveloped virus particles. **Virology** 271:26-36.
- van Eijl H, Hollinshead M, Rodger G, Zhang WH, Smith GL (2002). The vaccinia virus F12L protein is associated with intracellular enveloped virus particles and is required for their egress to the cell surface. **J Gen Virol** 83:195-207.

Vanderplasschen A, Hollinshead M, Smith GL (1997). Antibodies against vaccinia virus do not neutralize extracellular enveloped virus but prevent virus release from infected cells and comet formation. **J Gen Virol** 78:2041-2048.

Vanderplasschen A, Hollinshead M, Smith GL (1998a). Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms. J Gen Virol 79:877-887.

Vanderplasschen A, Mathew E, Hollinshead M, Sim RB, Smith GL (1998b). Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope. **Proc Natl Acad Sci USA** 95:7544-7549.

Viner KM, Isaacs SN (2005). Activity of vaccinia virus neutralizing antibody in the sera of smallpox vaccinees. **Microbes Infect** 7:579-583.

Ward BM, Moss B (2001). Vaccinia virus intracellular movement is associated with microtubules and independent of actin tails. **J Virol** 75:11651-11663.

Wittek R (2006). Vaccinia immune globulin: current policies, preparedness, and product safety and efficacy. **Int J Infect Dis** 10:193-201.

Wolffe EJ, Isaacs SN, Moss B. Deletion of the vaccinia virus B5R gene encoding a 42-kilodalton membrane glycoprotein inhibits extracellular virus envelope formation and dissemination. **J Virol** 1993 Aug;67(8):4732-41. Erratum in: **J Virol** 1993 Sep;67(9):5709-5711.

Wolffe EJ, Vijaya S, Moss B. A myristylated membrane protein encoded by the vaccinia virus L1R open reading frame is the target of potent neutralizing monoclonal antibodies. **Virology** 1995 Aug 1;211(1):53-63.

Wyatt LS, Earl PL, Eller LA, Moss B (2004). Highly attenuated smallpox vaccine protects mice with and without immune deficiencies against pathogenic vaccinia virus challenge. **Proc Natl Acad Sci USA** 101:4590-4595.

Zanders JP (2004). Addressing the concerns about smallpox. **Int J Infect Dis** 8: S9-14.

Zwartouw HT, Westwood JCN, Appleyard G (1962). Purification of poxviruses by density gradient centrifugation. J Gen Microbiol 29:523-529.