

**CINÉTICA DE INFECÇÃO DO VÍRUS VACCINIA EM CÉLULAS VERO:
PERSPECTIVAS PARA UTILIZAÇÃO COMO MODELO EXPERIMENTAL NA
AVALIAÇÃO DE DROGAS ANTI-ORTHOPOXVÍRUS**

(*vaccinia virus kinetic infection on Vero cells: prospects as experimental models for anti-orthopoxvirus drugs evaluation*)

Inarei Jose Paulini Junior

Correspondência: inareip@yahoo.com.br

RESUMO: O vírus Vaccínia (VACV) é responsável por causar doença exantemática e vesicular em bovinos e também em seres humanos. As infecções causadas por estes vírus vêm sendo frequentemente relatadas nos últimos 10 anos no Brasil. O objetivo deste trabalho foi monitorar os intervalos de replicação e montagem do VACV-WR (Western Reserve) em células Vero, com a finalidade de expor os principais meios de bloqueio do ciclo replicativo que podem ser utilizados por drogas antivirais. Células Vero foram infectadas com m.o.i de 0,1 da cepa VACV-WR. Posteriormente, as células foram fixadas em intervalos de tempo de 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 horas pós – infecção, e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. A multiplicação de VACV-WR em monocamada de células Vero produziu efeito citopático (fusão de membranas, sincícios e vacúolos) em aproximadamente 90% das células. Análises das micrografias eletrônicas permitiram evidenciar detalhadamente o efeito citopático, a dinâmica dos distúrbios metabólicos 4celulares e o ciclo replicativo viral até a formação da partícula viral extracelular. Assim, este trabalho pôde mostrar possíveis alvos terapêuticos para inibição da replicação de VACV- WR e novas abordagens no uso de fármacos com ação antiviral.

Palavras-chave: cinética infecção, poxvírus, vaccinia vírus, antivirais.

ABSTRACT: Vaccinia virus (VACV) is responsible for vesicular illness in cattle and humans, and infections caused by these virus have been frequently reported in the last 10 years in Brazil. The aim of this study was to monitor the replication intervals and assembly of VACV - WR (Western Reserve) in Vero cells in order to expose the main means of blocking the replicative cycle. Vero cells were infected with 0.1 m.o.i . Subsequently, they were fixed at intervals of 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 hours post-infection and processed by transmission electron microscopy. The multiplication of VACV– WR in Vero cells produced cytopathic effect (fusion of membranes and vacuoles syncytia) in approximately 90% of the cells. Analysis of electron micrographs allowed us to display in detail the CPE, the dynamics of cellular metabolic disorders and viral replicative cycle until the formation of the extracellular viral particle. Thus, this study was able to demonstrate potential therapeutic targets for inhibit replication of VACV - WR and new approaches in antiviral drugs.

Key Words: Kinect infection, poxviruses, vaccinia virus, antivirals.

INTRODUÇÃO

Os vírus da família Poxviridae infectam tanto vertebrados como invertebrados sendo o gênero Orthopoxvirus o mais importante do ponto de vista da infecção em humanos. Além disso, estão entre os mais complexos vírus conhecidos, os quais replicam no citoplasma das células hospedeiras. Possuem genoma de DNA dupla fita que consiste em aproximadamente 270 kpb (Locker *et al.*, 2013, Schatzmayr *et al.*, 2009). Nos últimos anos, inúmeros casos de doença pústulo-vesicular vêm sendo notificados em alguns estados brasileiros. Essas infecções acometem bovinos leiteiros e pessoas, principalmente ordenhadores e seus familiares (Silva-Fernandes, *et al.*, 2004a, Silva-Fernandes, *et al.*, 2004b). Os surtos que ocorreram nos últimos anos na região sudeste causaram grandes prejuízos econômicos, principalmente no que diz respeito à produção de leite, uma vez que, em algumas propriedades, 100% dos bovinos foram acometidos, além de ter sido detectado no leite e também seus subprodutos, como o queijo (Oliveira *et al.*, 2010).

O interesse crescente na biologia dos poxvírus, em combinação com a necessidade de estratégias para tratar as infecções causadas por estes vírus em humanos e animais domésticos, levou à produção de uma vasta gama de compostos com potencial atividade antiviral (Kroon, *et al.*, 2011). A maioria destas drogas está nas fases iniciais de estudo *in vitro* e poucas estão em testes clínicos em humanos ou comercialmente disponíveis. No entanto, o mercado para a terapêutica anti-poxvírus vêm crescendo rapidamente e novos fármacos vêm sendo avaliados (Valadares *et al.*, 2009; Brandão *et al.*, 2010a; Brandão *et al.*, 2010b). Os principais objetivos a serem alcançados são a descoberta de novos compostos e

a padronização de novos esquemas de utilização de um ou mais destes fármacos para evitar resultados indesejáveis. Tais testes visam evitar a toxicidade e o surgimento de vírus resistentes aos medicamentos (Valadares *et al.*, 2009, Brandão *et al.*, 2010a; Brandão *et al.*, 2010b). Assim, é importante que a biologia viral e os mecanismos de replicação do VACV estejam bem elucidados a fim de facilitar o entendimento dos mecanismos de ação dessas drogas no hospedeiro.

Com isso, o objetivo deste trabalho foi determinar a cinética de replicação de VACV-WR em células Vero em até 48 horas pós-infecção. Neste sentido, visou-se elucidar os intervalos em que os eventos de replicação e montagem da partícula viral acontecem para confirmação deste modelo no estudo de possíveis alvos terapêuticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Monocamadas de células Vero foram infectadas com 0,1 m.o.i da cepa VACV-Western-Reserve (VACV-WR). A presença do efeito citopático foi avaliada após 48 horas em microscópio óptico invertido. Para análise por microscopia eletrônica de transmissão, as células foram fixadas em intervalos de tempos de 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 horas em solução contendo glutaraldeído 1%, paraformaldeído 4%, cloreto de cálcio 0,5mM e tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, com 5% de sacarose por 1 hora à temperatura ambiente (Karnovsky, 1965). Os procedimentos pós – fixação e inclusão em resina foram seguidos de acordo com os procedimentos já descritos (Forbes *et al.*, 1977). Cortes ultrafinos dos blocos parafinizados, com 50 a 80nm de espessura, foram recolhidos em grades de cobre e contrastados por 15 min com acetato de uranila 5% em água, lavados em água, e a seguir colocados em citrato de chumbo (Reynolds *et al.*, 1963), por 2 minutos,

sendo novamente lavados em água e observados ao Microscópio Eletrônico Magnani, a 80KV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, analisou-se a biossíntese do VACV-WR em culturas de células Vero, as quais têm sido amplamente utilizadas, por serem susceptíveis às espécies virais do gênero em questão. Estas linhagens contínuas têm sido frequentemente utilizadas no estudo das estratégias de replicação viral, na pesquisa da biologia celular e na produção de grandes massas de抗ígenos virais (Silva-Fernandes, et al., 2004). Após 48 horas de infecção pôde-se observar a formação de sincícios e vacuolização da monocamada. Além disso, houve formação de grumos de células aumentadas de tamanho, com aspecto arredondado, alongado, estrelado com refringência à luz (Figura 1B) conforme já descrito na literatura (Donatele et al., 2005). Os distúrbios causados pela inibição da síntese de proteínas são drásticos para a célula. A inicialização da replicação viral e montagem da partícula ainda estão sendo desvendados. A participação ativa do Aparelho de Golgi mostra que o arcabouço celular está direcionando a produção de partícula de VACV (Figura 2B) (Hollinshead et al., 1998). Em contrapartida, células não infectadas (controle) apresentam o Aparelho de Golgi pouco ativo (Figura 2J). Após 6 horas de infecção, o citoplasma da célula hospedeira já apresentava partículas densas agrupadas (Figura 2A), o que pode ser característico de início de produção de proteínas estruturais do vírus, na região denominada "viroplasma", que está envolvida por ribossomos e apresentando corpos de inclusão basofílicos (Figura 2C). Decorridas 30 horas pós-infecção evidencia-se a presença marcante de vírus intracelular

imaturo com nucleoproteína densa no seu interior (Figura 2E) (Hollinshead et al., 1998, Locker et al., 2013). No período de 36 horas depois da infecção, a célula hospedeira apresenta grandes vacúolos com estruturas membranosas e possui estrutura sugestiva de partícula viral madura em seu citoplasma (Figura 2F). No intervalo de 42 horas após a infecção, células Vero apresentam-se com maior quantidade de partículas virais maduras (IMV) já formadas e se direcionando ao meio extracelular (Figura 2G e 2H) e, 48 horas de infecção, há uma grande destruição do arcabouço celular e citoplasma encontra-se eletronlúsciente (Figura 2H).

A montagem da partícula viral inicia-se com a formação de áreas granulares, circunscritas e elétro-densas no citoplasma (Figura 2C). Vários grupos têm mostrado por micrografias a existência de uma membrana com bicamada sem continuidade com organelas celulares (Hollinshead et al., 1998, Locker et al., 2013). Não se sabe até então, como que essa membrana é formada. Uma possibilidade é que essa membrana seja resultante do processamento de embalagem de um compartimento intermediário localizado entre o retículo endoplasmático e o Aparelho de Golgi (Locker et al., 2013). Esse dado corrobora com o fato dessas organelas estarem mais ativas com 12 horas de infecção (Figura 2B). A presença de viroplasmas foi semelhante aos encontrados em células HeLa com 16 horas após a infecção (Hollinshead et al., 1998). Outros trabalhos mostraram que o envolvimento completo da nucleoproteína se dá em 8 horas após infecção em HeLa (Locker et al., 2013). O movimento da partícula intracelular matura (IMV) para fora da área de montagem (a periferia da célula) é dependente de microtúbulos, cauda de actina e requer uma proteína de membrana denominada A27L (Hollinshead et al., 1998). Nesse

contexto, o intenso rearranjo molecular dos microtúbulos pode explicar o imenso dano no citoplasma da célula hospedeira (Figura 2H). Até o momento, acredita-se que vários fatores possam levar a mudança de produção de proteínas celulares para produção de proteínas virais. Vários estudos têm sido desenvolvidos para explicar, em nível molecular, o mecanismo pelo qual a síntese de nucleotídeos e proteínas da célula hospedeira possa mudar a ponto que a presença de proteínas de VACV dirija a produção de novas moléculas (Locker *et al.*, 2013, Prichard *et al.*, 2012). Neste presente estudo, pôde-se estipular que o envolvimento da nucleoproteína pela membrana com bicamada está relacionado com a intensa produção de viroplasmas após 18 horas de infecção em células Vero. Este conhecimento poderia orientar a produção de novas drogas capazes de inibir o processo de replicação viral pelo bloqueio do desenvolvimento da membrana. A forma como ocorre à montagem da membrana de VACV ainda é controverso (Locker *et al.*, 2013, Prichard *et al.*, 2012). Neste sentido, os mecanismos de bloqueio da formação do arco da membrana ainda faltam ser desvendados.

Os compostos antivirais atuam nas mais variadas formas de inibição da replicação. O Cidofovir atua na inibição da duplicação do DNA. Os compostos ST-571, Gefitinib, ST-246 agem na inibição da liberação das partículas. No entanto, o mecanismo de ação de compostos vegetais ainda não são conhecidos (Kroon *et al.*, 2011).

Neste trabalho, o modelo de infecção de VACV-WR em Vero mostrou-se satisfatória, corroborando com estudos que utilizam essa linhagem nos ensaios *in vitro* para avaliação de extratos vegetais que possuem compostos com atividade anti-poxvírus (Kroon *et al.*, 2011, Brandão *et al.*, 2010a, Brandão *et al.*, 2010b). Além

disso, pôde-se concluir que as células Vero não infectadas continuaram razoavelmente estáveis mesmo sem troca de meio de cultura por 48 horas. A resistência da célula Vero à citotoxicidade demonstra que essa linhagem celular realmente é preferencial na conclusão do efetivo dano causado pela replicação viral.

CONCLUSÃO

Por fim, este trabalho colabora para apontar possíveis alvos terapêuticos capazes de inibir a replicação de VACV-WR em Vero. Além disso, indica novas abordagens/perspectivas para a formulação de fármacos com ação antiviral que poderiam atuar nas diversas etapas do ciclo replicativo.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Biologia Celular e Tecidual/UENF e ao Laboratório de Microscopia do CCS/UFRJ.

REFERÊNCIAS

BRANDAO G. C., KROON, E. G, DUARTE M.G. R, BRAGA, F. C., FILHO, J.D. S, OLIVEIRA, A.B. (2010a) Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of extracts and constituents from *Polygonum spectabile* Mart. *Phytomedicine* 17 (2010) 926–929. Disponível em: <http://www.deepdyve.com/lp/elsevier/antimicrobial-antiviral-and-cytotoxic-activity-of-extracts-and-rtvDbSqxHa>.

BRANDAO G. C., KROON, E. G, DUARTE M.G. R, BRAGA, F. C., FILHO, J.D. S, OLIVEIRA, A.B. (2010b). Antiviral activity of Bignoniacous species occurring in the State of Minas Gerais (Brazil): part 1. *Letters in Applied Microbiology* ISSN 0266-8254. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2010.02924.x/pdf>

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

- FORBES, M.S (1977) Cytochemical staining procedures selective for sarcotubular systems of muscle: Modifications and applications. *Journal of Ultrastructure Research* Volume 60, Issue 3, September 1977, Pages 306–327. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022532077800166>
- HOLLINSHEAD, M., VANDERPLASSCHEN, A. (1998) Vaccinia virus Intracellular Mature Virions Contain only one lipid membrane. *Journal of Virology* p. 1503-1517. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC103975/>.
- KARNOVSKY M.J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27: 137-8A, 1965.
- KROON E.G, MOTA, B.E.F, ABRAHAO, J.S., FONSECA, F. G., and TRINDADE, G. S. Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: From field to therapy. *Antiviral Research* 92 (2011) 150–163. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354211004190#>
- LOCKER, J.K, CHLANDA, P., SACHSENHEIMER, T. BRUGGER, B. (2013) Poxvirus membrane biogenesis: rupture not disruption. *Cellular Microbiology* (2013)15(2), 190–199. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cmi.12072/abstract>.
- OLIVEIRA,T.M.L REHFELD, I.S, SIQUEIRA J.M.F, ABRAHAO, J.S, CAMPOS, R.K, SANTOS, A.K, CERQUEIRA, M.M.O.P, KROON, E.G, LOBATO, Z.I.P. Vaccinia Virus Is Not Inactivated After Thermal Treatment and Cheese Production Using Experimentally Contaminated Milk. *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE*.Volume7,Number 12, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20707725>
- PRICHARD, M.N, KERN E.R. Orthopoxvirus targets for the development of new antiviral agents. *Antiviral Research* 94 (2012) 111–125. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22406470>
- REYNOLDS, E. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy (1963). *J Cell Biol.* 1963 Apr; 17:208-12. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13986422>
- SCHATZMAYR, H. G, CAMPOS COSTA, R.V , GONÇALVES , M.C.R, BARRETO, D.F, BATISTA, V.H, VIEIRA SILVA, M.E, Brust, L.A.C, BARTH, O.M (2009). Infecções humanas causadas por poxvirus relacionados ao Vaccinia vírus no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42(6): 672-676 nov-dez, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v42n6/12.pdf>.
- SILVA - FERNANDES, (2004): Isolamento e identificação por microscopia óptica e eletrônica de transmissão, de orthopoxvirus em gado bovino leiteiro e em humanos no Norte do Estado do Rio de Janeiro. Tese Mestrado UENF.
- SILVA FERNANDES, A.T, TRAVASSOS, C.E.P. F, FERREIRA, J.M. S, ABRAHAO, J.S, ROCHA E.S. O, FERREIRA, F.V., SANTOS J.R, BONJARDIM, C.A, FERREIRA, P.C. P, KROON, E.G. Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. *Journal of Clinical Virology* 44 (2009) 308–313. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653209000377>.

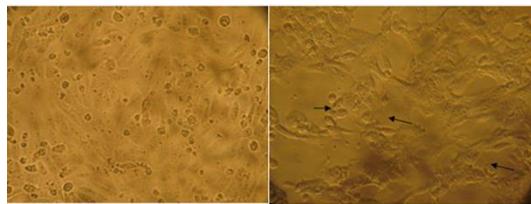


Figura 1 (A) Monocamada de células Vero não infectada. (B) Monocamada de células Vero infectada com VACV-WR. Após 48 de infecção pôde-se observar o efeito citopático com formação de vacúolos, fusão de membranas e células em formato estrelado e irregular (setas). Aumento 100X.

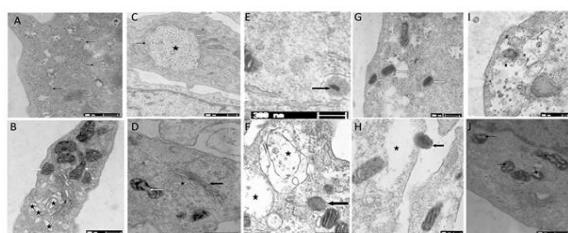


Figura 2: Células Vero cultivadas em garrafas de 25cm² e infectadas com 0,1 m.o.i. (A) Seis horas pós – infecção: houve aumento de partículas densas agrupadas (setas). (B) 12 horas após a infecção houve dilatação das cisternas do Golgi (estrelas); mitocôndrias com espaçamento diminuído entre as cristas (setas brancas); (C) 18 horas após a infecção observa-se a presença de viroplasmas (seta preta). (D) 24 horas após a infecção as células apresentam pouco dano degenerativo. (E) 30 horas pós – infecção: estrutura sugestiva de partícula viral imatura e nucleoproteína densa sendo envolvida por membrana viral (seta). (F) 36 horas após a infecção as partículas virais maduras já podem ser observadas no citoplasma (seta). (G) 42 horas pós-infecção: aumento na quantidade de partículas virais maduras no citoplasma (setas). (H) 48 horas pós-infecção: as células começam a apresentar citoplasma com grandes espaços vazios (estrela) sugerindo início de degeneração celular e observa-se partículas virais maduras sendo liberadas no meio extracelular (seta). (J) Controle negativo – células Vero não infectadas após 48 horas de cultivo (Bar =300nm).