

Matheus Villanueva Andrade

Avaliação de anticorpos neutralizantes contra o vírus monkeypox
em indivíduos imunizados com vacinas antivariólicas.



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

RIO DE JANEIRO

2023

Trabalho realizado no Departamento de Genética, do Instituto de Biologia, UFRJ, sob a orientação da Professora Luiza Mendonça Higa.

CIP - Catalogação na Publicação

A554a Andrade, Matheus Villanueva
Avaliação de anticorpos neutralizantes contra o vírus monkeypox em indivíduos imunizados com vacinas antivariólicas. / Matheus Villanueva Andrade. -- Rio de Janeiro, 2023.
42 f.

Orientadora: Luiza Mendonça Higa.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. Monkeypox. 2. vacina. 3. anticorpos neutralizantes. 4. PRNT. I. Higa, Luiza Mendonça, orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: Matheus Villanueva Andrade
 DRE: 119056132

BANCA EXAMINADORA: Profa. Irania Assunção Miranda (Presidente)
 Dr. Fábio Luís Lima Monteiro
 Dra. Isadora Alonso Corrêa
 Prof. Renata de Meirelles Santos Pereira (Suplente)

Título da Monografia: "Avaliação de anticorpos neutralizantes em indivíduos imunizados com vacinas antivariolísticas"

Local: sala I02 do IMPG / CCS / UFRJ

Data e hora de início: 03 de agosto de 2023 às 13:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,5 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 03 de Agosto de 2023.

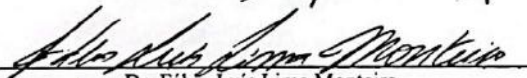
NOTA

9,5

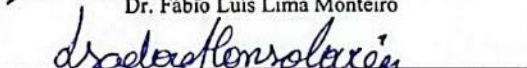
Banca Examinadora:


 Profa. Irania Assunção Miranda

9,5


 Dr. Fábio Luís Lima Monteiro

9,5


 Dra. Isadora Alonso Corrêa

Prof. Renata de Meirelles Santos Pereira

Aluno:


 Matheus Villanueva Andrade

Orientador:


 Dra. Luiza Mendonça Higa

Coordenador
 de TCC


 Profa. Marinella Silva Laport

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luciana e Andre, obrigado pelo amor incondicional, por priorizarem minha educação, por comemorarem as minhas conquistas e me apoiarem nos momentos difíceis. Aos meus tios Janaína e Arthur por todo o apoio. Meu irmão Lucas pelos momentos especiais que passamos juntos durante essa etapa e ao meu avô Maximino, que não pode ver a conclusão dessa etapa da minha vida, mas graças a você tudo foi possível.

À Wine, pela paciência que teve e amor que compartilha comigo. Fico muito grato pelo seu carinho e por ser meu lugar seguro.

À minha orientadora Luiza Higa, agradeço pelo acolhimento, pela paciência e por compartilhar seu conhecimento. Com todo o tempo de convivência que tivemos até aqui, nutri uma enorme admiração à profissional e à pessoa. Te tenho como uma inspiração.

Ao Leo, pelos seus ensinamentos de laboratório e de vida. Certamente levarei esses aprendizados comigo. Obrigado pelos momentos de sabedoria e amizade.

Aos membros do LVM, obrigado a todos pelo acolhimento, pelo auxílio e simpatia, são todas pessoas extraordinárias.

À Professora Clarissa Damaso por ceder as células e seu conhecimento sobre os poxvírus

Ao Professor Orlando pelo suporte no projeto e ao Professor Amilcar, chefe do laboratório e figura inspiradora.

À toda equipe do NEEDIER representada aqui pela Dra. Terezinha Marta Castiñeiras, pelo trabalho de excelência.

À toda equipe da sorologia representada pela MsC Liane Ribeiro pelo conhecimento compartilhado.

Aos membros do LMDV representados pela Dra. Diana Mariani e Dra. Cássia Alves.

À todos os responsáveis e usuários e na área NB3 do LVM pela ajuda e treinamento nesta área de biossegurança, em especial Marcelo Calado, que mostrou o caminho das pedras dos PRNTs.

À professora Iranáia Miranda, Doutora Isadora Corrêa e Doutor Fábio Monteiro, por terem aceitado o convite para compor a banca avaliadora e à Professora Renata Meirelles, por aceitar ser suplente da banca.

Aos pacientes e voluntários que cederam suas amostras e permitiram que este estudo fosse realizado.

RESUMO

Matheus Villanueva Andrade

Avaliação de anticorpos neutralizantes contra monkeypox em indivíduos imunizados com vacinas antivariólicas.

Orientadora: Luiza Mendonça Higa

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O vírus monkeypox (MPXV) é um membro da família *Poxviridae*, possuindo um genoma de dsDNA e pode levar a doença conhecida como mpox em indivíduos infectados. No ano de 2022, ocorreu um surto global da doença, atingindo todos os continentes e diversos países não originalmente endêmicos. Uma das formas de conter o avanço da doença foi a vacinação de pessoas expostas ao MPXV e pessoas com maior risco de exposição ao vírus. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os anticorpos neutralizantes em indivíduos que foram imunizados com vacinas antivariólicas, buscando aumentar a compreensão sobre a resposta imune humoral contra MPXV induzida pela vacinação. Para atingir esse propósito, soros de indivíduos imunizados com a vacina de terceira geração, baseada no vírus Vaccinia, o *Modified Virus Ankara* foram submetidos a ensaios de PRNT a fim de quantificar os anticorpos neutralizantes. Para isso, dividimos dois grupos de vacinados: indivíduos que se vacinaram antes de 1979, ano que cessou a vacinação contra a varíola no Brasil e que também se vacinaram em 2023 e indivíduos apenas vacinados em 2023. Os resultados indicaram que as pessoas vacinadas pré 1979 induziram uma baixa resposta humoral cruzada do que os indivíduos vacinados apenas em 2023. Esses indivíduos não apresentaram anticorpos neutralizantes em amostras coletadas 14 dias após a administração da segunda dose. Os resultados tem o potencial de prover novos conhecimentos para a resposta vacinal contra MPXV.

Palavras chave: Monkeypox, vacinas, anticorpos neutralizantes, PRNT

ABSTRACT**Matheus Villanueva Andrade****Avaliação de anticorpos neutralizantes contra monkeypox em indivíduos imunizados com vacinas antivariólicas.****Orientadora: Luiza Mendonça Higa**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The monkeypox virus (MPXV) is a member of the *Poxviridae* family, has a dsDNA genome and can lead to a disease known as mpox in infected individuals. In the year 2022, a global outbreak of the disease occurred, affecting all continents and various countries not originally endemic. One strategy to contain the spread of the disease was the vaccination of individuals exposed to monkeypox and individuals at higher risk of exposure. Therefore, the present study aimed to evaluate neutralizing antibodies in individuals who were immunized with anti-smallpox vaccines, seeking to increase the understanding of the humoral immune response against MPXV induced by vaccination. To achieve this purpose, sera from individuals immunized with the third-generation vaccine based on the Vaccinia virus, the MVA, were subjected to PRNT (Plaque Reduction Neutralization Test) to quantify neutralizing antibodies. For this, we divided two groups of vaccinated individuals: those who received the vaccine before 1979 when smallpox vaccination ceased in Brazil, and were vaccinated again in 2023 and those who were vaccinated in 2023. The results indicated that the pre-1979 vaccinated group induced a low cross-reactive humoral response, while individuals vaccinated solely in 2023 did not present neutralizing antibodies in samples collected 14 days after the administration of the second dose. The findings of our study have the potential to provide crucial insights into the vaccinal response against MPXV.

Key-words: Monkeypox, vaccine, neutralizing antibodies, PRNT

RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS

Matheus Villanueva Andrade

**Avaliação de anticorpos neutralizantes contra monkeypox em pessoas imunizadas
contra varíola.**

Orientadora: Luiza Mendonça Higa

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O vírus monkeypox, conhecido popularmente no Brasil como “vírus da varíola dos macacos”, ficou conhecido por causar uma doença que, apesar de pouco mortal, pode deixar sequelas graves. Esse vírus tem uma grande semelhança com o vírus da varíola, doença erradicada em 1980 com a vacinação. Assim, no ano de 2022, ocorreu um surto global da doença, atingindo todos os continentes e diversos países que nunca detectaram o vírus antes. Sendo assim, uma das formas de conter o avanço da doença foi a vacinação de pessoas com maior risco de exposição. Contudo, não há uma vacina específica contra o monkeypox, então foram utilizadas vacinas contra a varíola durante a ampanha de erradicação. Em relação ao seu funcionamento, uma vacina estimula as defesas do nosso corpo de muitas formas, uma delas é promovendo a formação de anticorpos neutralizantes, ou seja, anticorpos que se ligam a um invasor, impedindo ele de entrar em uma célula e causar uma doença. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a formação dos anticorpos neutralizantes em pessoas vacinadas contra a varíola e como essas vacinas podem nos proteger contra vírus monkeypox também. Para atingir esse objetivo, pegamos amostras de sangue de pessoas vacinadas e quantificamos os anticorpos neutralizantes com testes em laboratório. Para isso, dividimos dois grupos de vacinados: pessoas que se vacinaram antes de 1979, ano em que terminou a vacinação contra a varíola no Brasil, que também se vacinaram em 2023 e pessoas vacinadas só em 2023. Os testes indicaram que os vacinados antes de 1979 foram mais protegidos do que os vacinados apenas em 2023.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da partícula e do genoma de um poxvírus	3
Figura 2: Ciclo replicativo de poxvírus	7
Figura 3: Ciclo de transmissão do vírus MPXV	8
Figura 4: Distribuição geográfica de casos de mpox no mundo	10
Figura 5: Efeito citopático em células BSC-40 infectadas com isolados de pacientes	23
Figura 6: PRNT das amostras de vacinados	25

Índice

1. Introdução	1
1.1 Estrutura viral e genômica da família Poxviridae	1
1.2 Ciclo Replicativo da família Poxviridae	4
1.3 Transmissão e epidemiologia	8
1.4 Sintomas clínicos	10
1.5 Resposta imune	11
1.6 Vacinas contra poxvírus	13
1.6.1 Utilização de vacinas antivariólicas contra monkeypox	14
2. Justificativa	15
3. Objetivo geral	15
3.1. Objetivos específicos	16
4. Materiais e Métodos	16
4.1. Amostras de pacientes com mpox	16
4.2 Amostras de soro de indivíduos vacinados para avaliação de anticorpos neutralizantes	18
4.3 Cultura de células	19
4.4. Isolamento viral	19
4.5 Ensaio de plaque	20
4.6. Back titration	20
4.7 Teste de neutralização pela redução de placas de lise (PRNT)	21
5. Resultados	22
5.1. Isolamento de MPXV a partir de amostras de pacientes com mpox	22
5.2. Avaliação dos anticorpos neutralizantes nas amostras de indivíduos imunizados pela vacinação histórica e na vacinação em 2023	24
6. Discussão	26
7. Conclusão	27
8. Perspectivas futuras	28
9. Referências	28

1. Introdução

O vírus monkeypox (MPXV) pertence à família *Poxviridae*, gênero *Orthopoxvirus*. Esse vírus é caracterizado pela presença de genoma de DNA dupla fita linear e replicação inteiramente citoplasmática (Moss, 2013). Assim como o vírus da varíola (VARV), o MPXV causa uma infecção sistêmica pústulo-vesicular, porém com taxas de letalidade mais baixas que variam entre 1 a 10% (WHO, 2022). O MPXV é um vírus zoonótico, cujos reservatórios são pequenos roedores selvagens encontrados em florestas africanas (Parker e Buller, 2013). A infecção em humanos se dá após o *spillover* direto do vírus a partir de seus reservatórios ou indiretamente após a infecção de hospedeiros acidentais como alguns primatas não humanos. Normalmente, a transmissão está associada a regiões próximas às florestas tropicais, nas quais há um contato próximo entre animais silvestres e humanos, contudo há um perceptível aumento de notificações da infecção pelo monkeypox em ambientes urbanos (WHO, 2022).

O MPXV foi descoberto pela primeira vez em 1959 em Copenhague, na Dinamarca, por conta de um surto de uma doença semelhante a outros poxvírus em macacos *cynomolgus* no ano anterior (Magnus et al., 1959). Nos anos subsequentes, foram identificadas mais surtos em animais identificados em outros países, como os EUA e Países Baixos (Ladnyj, Ziegler e Kima, 1972). Em 1970 foi identificado o primeiro caso em humanos na atual República Democrática do Congo (na época, República do Congo). O vírus foi isolado de um menino de 9 meses de idade que apresentava sintomas parecidos com a varíola (Ladnyj, Ziegler e Kima, 1972). Até 2020, a infecção em humanos havia sido identificada em 15 países, na maior parte deles africanos, mas foram identificados casos em EUA, Reino Unido, Israel e Singapura, todos importados de regiões endêmicas (Alakunle et al., 2020).

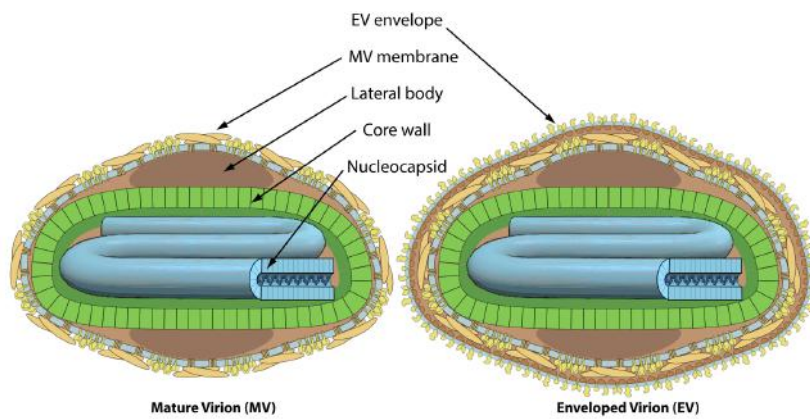
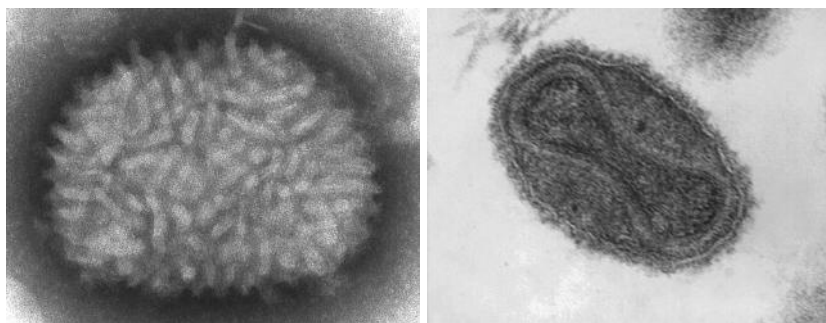
No ano de 2022 houve uma epidemia de monkeypox em diversos países fora do continente africano. O surto chamou a atenção para as características distintas presentes na cepa circulante. O vírus possuiu uma baixa mortalidade e uma atipicidade na forma de transmissão e sintomas. A via de transmissão principal, entre humanos foi observada sendo por contato sexual, circulando principalmente entre homens que se declararam gays, bissexuais e homens que fazem sexo com homens (HSH). Além disso, por conta do surto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) renomeou a doença causada pelo MPXV de “monkeypox humana”, ou “varíola dos macacos humana” para mpx. O período de transição é de um ano, aceitando ambos os nomes em publicações e em diagnósticos até novembro de 2023 (WHO, 2022).

1.1 Estrutura viral e genômica da família *Poxviridae*

A família dos Poxvírus compartilha a morfologia e maior parte das características genéticas dos outros vírus da mesma classificação (McFadden, 2005). Existem dois tipos de partículas virais infecciosas: o vírus maduro intracelular (MV) e o vírus envelopado extracelular (EEV). As principais diferenças morfológicas é o número de membranas na partícula, as glicoproteínas em suas superfícies (McFadden, 2005). O vírion possui um formato ovóide no caso do MV e de tijolo em sua forma EEV, com dimensões em torno de 200 x 250 nm. O MV compõe a maior parte da progênie viral, seu envelope é composto por apenas uma membrana. Posteriormente, alguns MVs podem ser novamente envelopados no citoplasma, tornando-se em uma partícula intracelular envelopada (IEV). Essas partículas se dirigem à membrana plasmática, se fusionando e liberando o EVV, possuindo, agora, duas membranas: membrana externa e membrana interna (Vanderplasschen, Hollinshead e Smith, 1998). Ambas as membranas externas de ambas as morfologias possuem diversas proteínas relacionadas à adesão do vírus às células hospedeiras, à entrada do vírus e à liberação da partícula. A membrana interna, comum às duas morfologias, é ligada a dois corpúsculos laterais e ao *core*, que possui uma forma complexa, côncava nas regiões proximais aos corpos laterais. O *core* é recoberto por duas camadas: a externa, que possui proteínas de ancoragem à camada interna da membrana lipídica e a camada interna que possui pequenos canais. O *core*, por sua vez, abriga o genoma viral de DNA dupla fita (Moss, 2013) (Figura 1 A).

O genoma dos poxvírus é muito bem conservado. Ele é constituído por um DNA de dupla fita (dsDNA), e o tamanho pode variar de 130 kbp, como ocorre dentro do gênero *Parapoxvirus* e 375 kbp, como no gênero *Avipoxvirus*. As espécies podem modificar, em média aproximadamente 200 *Open Reading Frames* (ORFs) (ICTV, 2023). De forma mais específica, o genoma do MPXV, tem um tamanho de 197kb com cerca de 190 ORFs codificadas (Kugelman et al., 2014). Nas extremidades de seu genoma, os poxvírus possuem repetições terminais invertidas (ITRs, do inglês, *inverted terminal repetitions*), que são estruturas idênticas nas suas extremidades, opostas e ricas em nucleotídeos adenina e timina (Baroudy, Venkatesan e Moss, 1982). Os componentes dessas estruturas consistem em: *hairpins*, *tandem repeats* (pequenas e sequenciais, contidas nas *hairpins*), sequências de mais de 100 nucleotídeos (importantes durante a replicação do DNA viral) e algumas ORFs nos locais. Dentro da espécie de MPXV, podem ser achadas pelo menos 4 ORFs em suas ITRs (Hendrickson et al., 2010). No contexto do vírus Vaccinia (VACV), genes descobertos em ITRs desses vírus estão fortemente envolvidos em processos essenciais à patogenicidade, como a imunomodulação do hospedeiro (Moss, 2013).

O genoma dos poxvírus são seccionados em duas principais regiões. As proteínas codificadas pela região central do genoma dos poxvírus estão envolvidas com a replicação e transcrição do DNA, montagem e liberação do vírion (Alakunle et al., 2020). Essa região é altamente conservada. Em geral, genes relacionados à funções essenciais como transcrição, genes estruturais, e genes relacionados à replicação são encontrados na porção central do genoma (Barrett e McFadden, 2008). A prevalência em genes relacionados à modulação do sistema imune do hospedeiro em regiões mais variáveis do genoma, ou seja, mais próximas nas regiões nas extremidades do genoma. Essas regiões são tão variáveis que não foram encontrados genes comuns a todas as espécies de poxvírus (Seet et al., 2003).

A**B**

C

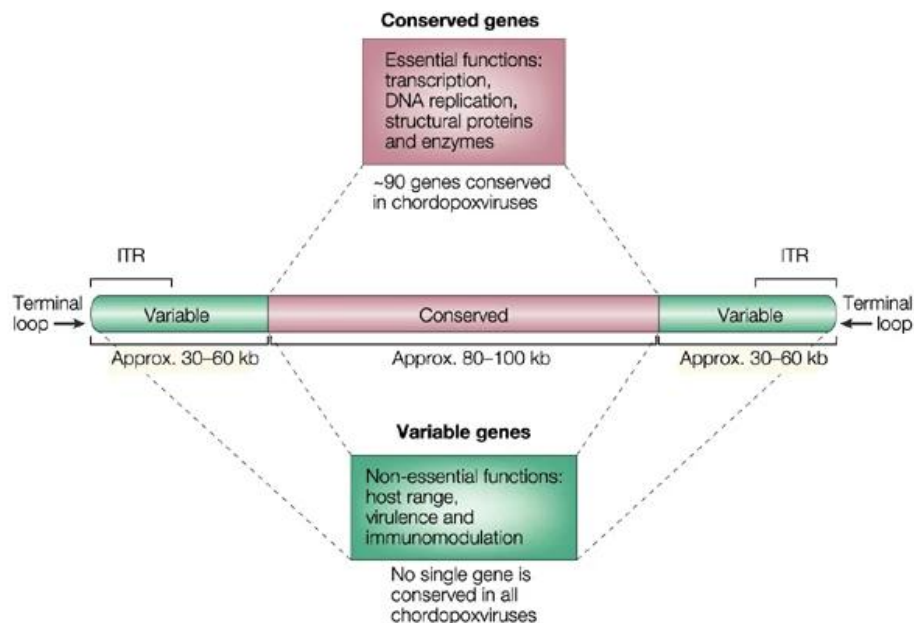


Figura 1: Estrutura da partícula e do genoma de um poxvírus. (A) Representação esquemática da estrutura da partícula de poxvírus, é possível distinguir as partículas MV e EEV. No MV, são observados a sua membrana, corpúsculos laterais e o *core*. No EEV, é representada a membrana externa. Fonte: Viral Zone - <https://viralzone.expasy.org/174> (B) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostrando partículas de VACV. Fonte: CDC/Cynthia Goldsmith - *Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library* (PHIL), número de identificação #2143 e CDC/Dr. Fred Murphy; Sylvia Whitfield - *Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library* (PHIL), número de identificação #1849. (C) Representação do genoma de poxvírus, em vermelho a região central conservada e em verde as regiões periféricas variáveis e as ITRs. Fonte: Smith & McFadeen, 2002.

1.2 Ciclo Replicativo da família *Poxviridae*

Diferentemente da maioria dos vírus de DNA, o ciclo de replicação da família *Poxviridae* ocorre inteiramente no citoplasma. Além disso, eles codificam diversas proteínas essenciais para a produção de novas partículas, refletindo um menor grau de dependência do hospedeiro quanto a utilização da maquinaria de replicação e de transcrição. O ciclo de replicação dos poxvírus ocorre em três fases: fase inicial, fase intermediária e fase tardia. Uma das formas de haver um controle do ciclo replicativo é a expressão de genes virais de uma fase, que determinam o início da fase seguinte. Para isso, as partículas virais possuem

uma variedade de componentes essenciais para a transcrição dos genes iniciais e processamento dos RNA mensageiros virais. Esses elementos incluem moléculas como a RNA polimerase dependente de DNA, uma enzima responsável pela metilação, e a poli-A polimerase (Moss, 2007).

Para realizar a entrada, as proteínas da superfície dos vírus maduros se ligam à glicosaminoglicanas para facilitar a adsorção. Para isso, é descrito que a proteína D8 liga-se à condroitina, A27 e H3 ligam-se ao heparan e A26 liga-se à laminina presentes na superfície celular. Por se tratar de um vírus envelopado, a entrada da partícula deve passar por uma fase de fusão com a membrana celular. Contudo, a família *Poxviridae* possui duas formas infecciosas MV e EEV. (Chung et al., 1998; Hsiao, Chung e Chang, 1999; Carter, et al., 2005). Os MVs, assim como os EEVs dependem da fusão na membrana de forma dependente de pH ácido em diferentes fases (Armstrong, Metz e Young, 1973; Chang e Metz, 1976; Gong e Esteban, M. 1990). Os EEVs precisam perder sua membrana externa, expondo o MV e, assim, se fundem na membrana. Esse processo da perda de membrana também é induzido pela acidificação do pH (Vanderplasschen, Hollinshead e Smith, 1998).

Após a entrada do vírus no citoplasma, ele é transportado por proteínas motoras através de microtúbulos ao sítio perinuclear da célula (Carter et al., 2003). Ao se dirigir à essa região, são formadas fábricas virais e ocorre a expressão de 118 genes iniciais por enzimas virais dentro do *core*. A expressão desses genes resulta na formação de mRNAs capeados e poliadenilados que são prontamente reconhecidos e traduzidos pela maquinaria de tradução celular (Condit e Niles, 2003). Alguns genes traduzidos nessa fase inicial estão relacionados à imunomodulação da resposta celular e as proteínas fundamentais para a replicação do genoma viral e da transcrição de mRNAs intermediários. A fase inicial de transcrição cessa após o desnudamento no genoma dando início à replicação do DNA (Damon, 2011).

Após a replicação do genoma viral, as fases posteriores são iniciadas, com a transcrição de genes intermediários e tardios. Esses genes levam à expressão de fatores de transcrição, proteínas e enzimas da fase tardia. A transcrição na fase intermediária está relacionada com proteínas de empacotamento do DNA, morfogênese e fatores de transcrição tardios, que persistem até o fim do ciclo (Yang *et al.*, 2011). Na fase tardia são codificadas proteínas estruturais e de todos os fatores enzimáticos presentes na partícula viral, o que permite que o ciclo recomece (Moss, 2013).

Com os produtos da expressão dos genes tardios da replicação, se inicia a morfogênese viral. Com o genoma replicado e a síntese de proteínas estruturais dentro das fábricas virais, inicia-se a formação de estruturas chamadas crescentes. O processo de

formação dessas estruturas lipídicas não é completamente elucidado então algumas hipóteses são aceitas. A primeira hipótese sugere a formação de uma única bicamada lipídica formada de forma *de novo*. A outra hipótese, sugere a formação de duas bicamadas lipídicas derivadas de outras organelas do hospedeiro. O fim da formação dos crescentes é que essa estrutura englobe às proteínas associadas ao DNA, formando o vírus imaturo (Garcia et al., 2000; Condit, Moussatche e Traktman, 2006). Para formar essa partícula, sete proteínas (A15, A30, D2, D3, F10, G7, and J1) formam um complexo multimérico que associa as crescentes com o viroplasma (Szajner et al., 2004; Condit, Moussatche e Traktman, 2006). Dessa forma, a morfogênese dá origem às MV, que representam cerca de 90% da progênie viral. A transição de partículas imaturas para maduras ocorre pela ação de proteínas codificadas pelo próprio vírus nas fases tardias de replicação (Condit, Moussatche e Traktman, 2006).

Para formar as partículas extracelulares (EEV) é incorporada uma camada lipídica adicional na partícula. Esse processo inicia com a migração do vírus através de microtúbulos para rede trans-Golgi, onde será incorporada a nova camada lipídica resultando na formação de *wrapped virus* (WV) que apresenta três membranas lipídicas (Schmelz et al., 1994; Ward, 2005). Essas partículas são dirigidas através de microtúbulos à membrana plasmática onde se fusionam, perdendo sua camada adicional. Poucas partículas são encontradas no meio extracelular livremente. A maior parte dessas partículas segue associada à célula hospedeira, sendo chamadas de vírus envelopados associados à célula (CEV).

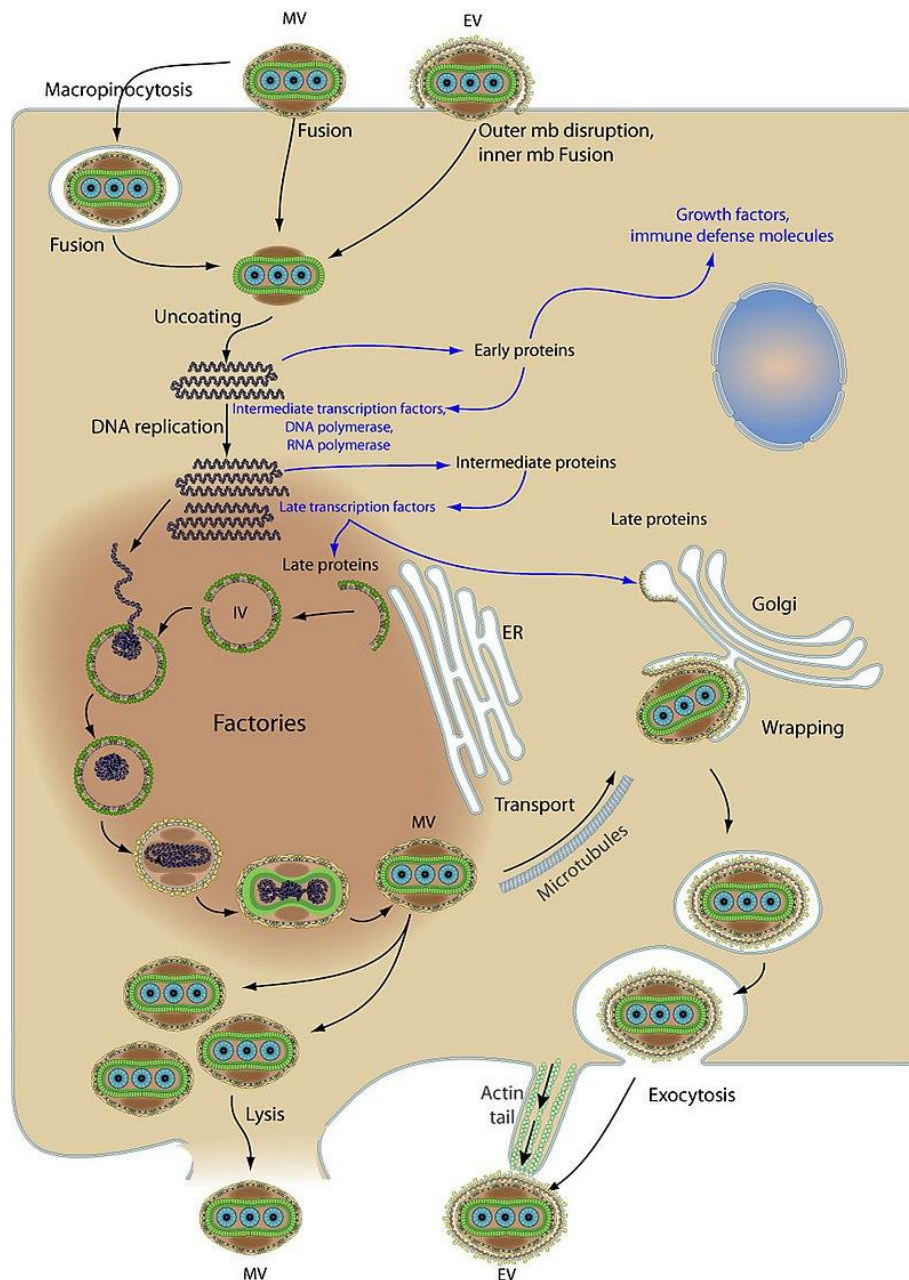


Figura 2: Ciclo replicativo de poxvírus: A figura representa o ciclo replicativo de poxvírus. Inicialmente, são representadas ambas as morfologias MV e EEV na adsorção e entrada da célula hospedeira. Tanto MV é internalizada por macropinocitose e se funde, expondo as estruturas internas. O DNA inicia sua replicação nas fábricas virais. Em seguida, se dá início a fase inicial do ciclo, com a tradução de fatores de crescimento e proteínas imunomoduladoras, além da DNA e RNA polimerase. Em seguida, se inicia a fase intermediária culminando na tradução de fatores de transcrição tardios. Esses fatores levam à transcrição de proteínas tardias. A seguir, é iniciada a morfogênese e são formadas as crescentes, que envolvem as proteínas associadas ao DNA formando o MV, que permanece na partícula até a lise da célula. Outras partículas se dirigem ao Golgi pelos microtúbulos, onde recebem mais uma camada, formando as WV. Essas partículas se dirigem à membrana e são liberadas por exocitose, ficando associadas à célula formando as CEV e posteriormente as EEVs. Fonte: Viral Zone - <https://viralzone.expasy.org>

1.3 Transmissão e epidemiologia

A transmissão do MPXV se dá de forma zoonótica, de animal para humano. A transmissão pode também ocorrer entre os humanos, causando surtos locais (Figura 3). Assim, as principais formas de transmissão de animal para humanos ocorre pelo contato direto através de sangue, fluidos corporais que entram em contato com lesões cutâneas ou de mucosas (WHO, 2022). Alguns animais portadores já são conhecidos, como algumas espécies de esquilos, o rato-gigante-africano, algumas espécies de macacos, entre outros mamíferos. Contudo, não foi identificado o reservatório natural do vírus (CDC, 2023). De forma semelhante, a transmissão entre humanos ocorre, principalmente, através de contato direto com secreções como sangue, suor, lágrimas, contato com mucosas, secreções respiratórias, leite materno, com lesões da pele causadas pela doença e por vias indiretas, através de fômites (WHO, 2022). Ainda, há relatos de transmissão vertical placentária, que se dá através da mãe ao feto. Em vista disso, há evidências de que a infecção perinatal pode levar à morte do feto em alguns casos (Mbala et al., 2017; Kisalu, e Mokili. 2017).

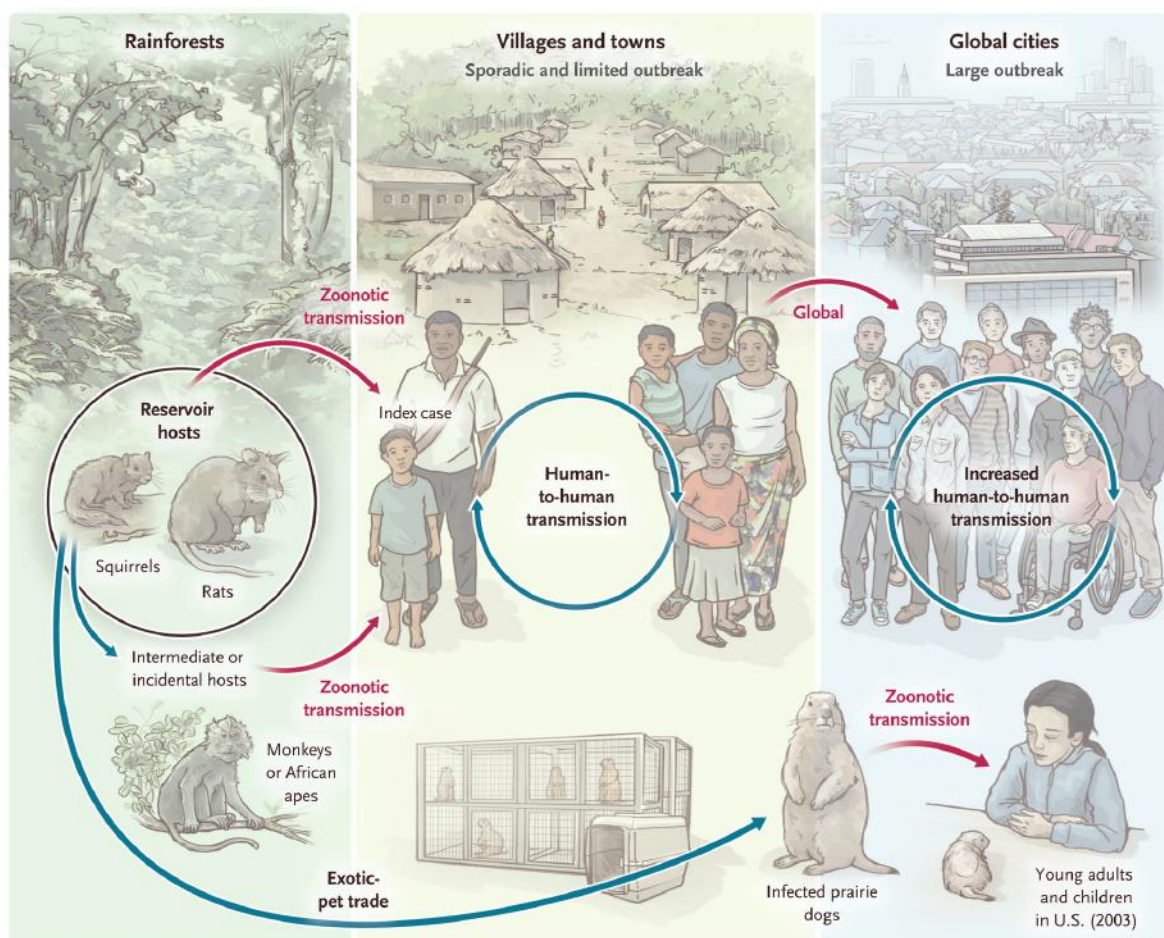


Figura 3: Ciclo de transmissão do vírus MPXV: MPXV causa infecções de origem zoonóticas ao ser humano, O início de seu ciclo se dá em meio silvestre, principalmente em mamíferos residentes de florestas tropicais, onde o vírus é transmitido entre essas espécies. O *spillover* aos humanos ocorre normalmente pelo contato direto em ambientes de vilarejos e cidades próximas às florestas, mas pode ocorrer por conta do tráfico de animais silvestres. Assim, o vírus inicia sua transmissão entre humanos e pode causar pequenos surtos locais e autolimitados. Posteriormente, o vírus pode se espalhar para grandes populações em cidades, por exemplo, causando um surto maior. Fonte: Gessain, Nakoune e Yazdanpanah, M.D, 2002

A primeira identificação de paciente infectado ocorreu em 1970 na atual República Democrática do Congo (RDC). A partir desse ano, a doença se espalhou principalmente pelo continente africano e até a década de 1990, foram identificados 400 infectados com a doença no continente (Huang e Wang, 2022). Em 1996, o MPXV causou um surto na RDC, sendo identificados 71 casos suspeitos. No ano de 1999, foram identificados 500 casos na RDC, mas a doença apenas chamou atenção mundial em um surto nos EUA, em 2003, que resultou em 47 pessoas infectadas. Nesse surto, os infectados tiveram contato com cães-da-pradaria, que, por sua vez, tiveram contato prévio com outros roedores já classificados como possíveis portadores de MPXV (CDC, 2022).

Em meados de 2022, foram identificados surtos da doença em diversas regiões do mundo, em países em que a doença não era endêmica. Os primeiros casos de infecção foram reportados no início de maio em países da Europa, EUA, Canadá e Austrália. Os pacientes não reportaram viagens para áreas endêmicas no continente africano, tendo ausência de vínculo epidemiológico. (Kraemer et al., 2022). Segundo dados da OMS, houve 88.288 casos positivos de mpox, em 112 países e territórios, dentre eles 149 mortes até julho de 2023 (WHO, 2023). No Brasil, o primeiro caso identificado ocorreu em São Paulo, no dia 09/06/2022. Até 31 de maio de 2023, 10.459 casos foram confirmados com 16 óbitos. Durante esse período, houve poucos dados em relação a transmissão vertical, mas em algumas amostras de placenta de pacientes o DNA viral foi detectado, sugerindo uma capacidade de passagem transplacentária do MPXV circulante no surto de 2022 (D'Antonio et al., 2022; Fahrni e Choudhary, 2022).

Distribuição geográfica do Mpox (2023)



Figura 4: Distribuição geográfica de casos de mpox em 2023: O surto recente se espalhou para uma 112 países e regiões (marcados em vermelho) em que a doença não era endêmica (marcado em preto). Dados disponíveis em: <https://www.cdc.gov/poxvirus/mpox/response/2022/world-map.html>; Imagem produzida na plataforma Infogram® .

1.4 Sintomas clínicos

Clinicamente, o mpox se manifesta após um período de incubação varia entre de 5 a 21 dias e, normalmente, segue mais duas fases: prodrômica e eruptiva. A segunda fase normalmente é mais curta, criando entre 1 a 3 dias, de manifestações prodrômicas (febre, mialgia, adinamia, dor de garganta e linfonodomegalias) que podem variar em intensidade. A fase seguinte é caracterizada pelo quadro mais distinto da doença, que é a formação de lesões na pele que evoluem da seguinte forma: mácula, pápula, vesícula, pústula e crosta. As lesões, normalmente, aparecem inicialmente no rosto, depois braços e pernas. Até o surto de 2022 era raro o surgimento de lesões na área genital ou oral (CDC, 2022). A infecção, normalmente, é autolimitada e de baixa mortalidade, mas sequelas como cicatrizes na pele são comuns e outras mais graves, podem levar a perda de visão por conta de dano ocular (Gessain, Nakoune e Yazdanpanah, 2023).

Em contrapartida, no surto recente, observou-se a prevalência de lesões na área anogenital, muitas vezes de forma quase exclusiva, ou associadas a lesões na orofaringe ou periorais (Patrocínio-Jesus e Peruzzo, 2022). Com isso, foi possível identificar três padrões distintos de apresentação clínica associados: uma apresentação clínica localizada, onde a doença ficaria mais restrita à área de inoculação e não apresentaria sintomas prévios; uma manifestação mais extensa no local de inoculação, com disseminação sistêmica limitada e o surgimento de sintomas secundários; e uma apresentação clínica com sintomas prévios e envolvimento sistêmico mais pronunciado.

A epidemia recente de mpox apresentou algumas características particulares não reportadas em surtos anteriores nos países endêmicos africanos. Além disso, os casos foram mais brandos, com manifestações sistêmicas discretas ou ausentes, e reduzido número de lesões. Também, houve uma baixa taxa de letalidade em relação ao registrado em áreas endêmicas, sendo observado uma taxa de 0,04% (WHO, 2023). Outra particularidade foi a grande quantidade de casos em homens que fazem sexo com homens. De acordo com o Relatório de Situação Externa 24 da epidemia de monkeypox em múltiplos países da OMS publicado no dia 14/07/2023, 84.1% dos casos que reportaram orientação sexual se identificaram como gays, bissexuais e outros homens que fazem sexo com homens (WHO, 2023). A atipicidade das manifestações clínicas pode estar relacionada com predominância de transmissão durante a relação sexual. Sendo assim, há diversas hipóteses que podem dar a explicação do fenômeno de atenuação da mortalidade do monkeypox. Uma das hipóteses mais fortes é a alteração genética da cepa circulante. Rearranjos e deleções na região terminal de poxvírus são estratégias comuns para a adaptação dos vírus em seus hospedeiros (Hatcher, Wang e Lefkowitz, 2015). Isso é corroborado na literatura, em que é descrito que o ganho, a perda ou o rearranjo de genes nas regiões terminais são importantes mecanismos de evolução dos poxvírus e adaptação ao hospedeiro (Legrand et al, 2004). Esse processo ocorre pois os genes localizados nessa região estão relacionados com a atenuação da resposta imunológica do hospedeiro e já foi descrito que alterações modulam marcadores como a resposta humoral ou de linfócitos. (Esteban e Hutchinson, 2011; Hughes e Friedman, 2005)

1.5 Resposta imune

A primeira linha de defesa contra um patógeno é a resposta imune inata. Contudo, em monkeypox, e em outros poxvírus, algumas células da defesa inata como monócitos e neutrófilos podem também servir como alvo da infecção (Jahrling et al., 2004; Song et al., 2013). Em infecções de VACV, há indícios de que macrófagos são permissivos ao vírus e

devem estar associados com a disseminação viral no organismo em humanos (Byrd et al., 2014). Contudo, outro estudo demonstrou que o infiltrado de neutrófilos, que acompanha a presença de monócitos/macrófagos têm um papel de reduzir o dano tecidual causado pela infecção. Também, foi descrito que essas células estavam associadas com a produção de interferon do tipo I e altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), que atuam como protetores no tecido (Fischer et al., 2011). Em relação às células *natural killers* (NK), também componentes da resposta imune inata, foi descrito que o MPXV tem a capacidade de depletar a secreção de interferon- γ e TNF- α , indicando a diminuição da função citotóxica da célula (Song et al., 2013).

Uma vez que o paciente desenvolveu mpox, dificilmente haverá uma reinfecção. Isso ocorre devido a indução de uma resposta de memória protetiva contra o patógeno (Adamo et al., 2023). O VACV induz uma resposta duradoura, como já demonstrado experimentalmente (Hammarlund et al., 2003), sendo detectados anticorpos para VACV 50 anos após a vacinação. Em relação à resposta adaptativa, as células T possuem um papel central em respostas ao vírus, posteriormente, induzindo à memória. Além disso, após uma infecção primária, a memória gerada pelas células T pode induzir reação cruzada a outros poxvírus. A reação cruzada se dá pelo genoma conservado dos poxvírus e a presença de proteínas ortólogas imunogênicas. Além da infecção natural por poxvírus, tal imunidade pode ser atingida pela vacinação, cujo objetivo é induzir uma resposta de memória. A resposta de células B e imunoglobulinas também é bem relevante no contexto de MPXV. Foi demonstrado que há reatividade cruzada pelas imunoglobulinas específicas de VACV (Edghill-Smith et al., 2005). Foram descritos quatorze proteínas alvo de imunoglobulinas no MPXV, mas 3 dessas (D8, H3 e A26), presentes na superfície são alvo de anticorpos neutralizantes induzidos por vacinas (Keasey et al., 2010).

Em contrapartida à resposta imune, há a evasão desse sistema, uma estratégia comum a patógenos sendo um fator de virulência. Muitos estudos sobre evasão da imunidade de poxvirus foram feitos baseados em VACV ou outros vírus do mesmo gênero, mas que possuem genes ortólogos em MPXV. Dessa forma, foi descrito que genes inibidores da atividades de interfero, importantes agentes antivirais. Por exemplo, o gene *E3L* que codifica a proteína p25, que possui um domínio que se liga ao dsRNA, e impedindo seu reconhecimento pelo sistema imune. (Watson et al., 1991, Chang, Watson e Jacobs, 1992; Brandt e Jacobs, 2001). Essa via, resulta na supressão de IFN do tipo I e do tipo II (Beattie, Paoletti e Tartaglia, 1995). A inibição das vias de IFN parecem uma estratégia importante em poxvírus, estando presente no *mouse-equivalent ectromelia virus* (ECTV) que codifica um antagonista de IFN

do tipo I α/β (Colamonici et al., 1995) e possui um ortólogo em MPXV (Hammarlund et al., 2006). Outro poxvírus, o myxomavírus, codifica o gene *BR-203* que é traduzido na proteína M-T4. Sua função está relacionada com a inibição de apoptose e da resposta inflamatória durante a infecção (Hnatiuk et al., 1999; Weaver, Isaacs, 2008). Outros genes têm a função de inibir a ativação do sistema complemento nos estágios iniciais. Essa estratégia específica está presente em MPXV através do complexo *monkeypox inhibitor of complement enzymes* (MOPICE) (Liszewski et al., 2006). Outros genes presentes em VACV com ortólogos em MPXV induzem a produção de glucocorticóides, um imunossupressor (Moore e Smith, 1992). Assim, alguns genes, como é o caso de *BR-05/BR-226* (receptor competitivo de TNF tipo II α e β), funcionam como supressor da resposta imune tanto como um fator que contribui para o funcionamento de proteínas virais (Hu, Smith e Pickup, 1994).

1.6 Vacinas contra poxvírus

A vacinação é uma das maneiras mais eficazes de controlar uma doença infecciosa em grandes populações e a história da descoberta desse processo é intrinsecamente ligado aos poxvírus. Historicamente, a primeira forma de imunização ativa que se tem conhecimento ocorreu na região do sudeste asiático, principalmente na China, por volta do ano 1000 DC com a chamada “variolação”. O método consistia na raspagem das pústulas de pessoas doentes e a insuflação intranasal ou inoculação dermal nos indivíduos a serem imunizados. O método se espalhou para outras regiões posteriormente, como na Europa e partes da América no século XVI e na África no século XIX (Fenner et al., 1988). Posteriormente, Edward Jenner observou que leiteiras (pessoas que trabalhavam ordenhando vacas) eram menos mais tolerantes à infecção por varíola. Jenner, então, relacionou que a *cowpox* (varíola das vacas, ou seu termo em latim: *Variolae vaccinae*) deveria conferir uma proteção contra a varíola humana (Jenner, 1798). Com essas observações, e já conhecendo a prática da variolação, Jenner utilizou o material retirado das lesões das leiteiras para imunizar outros indivíduos contra a varíola (Jenner, 1801). Esse experimento se mostrou bem sucedido e foi devido à reatividade cruzada conferida entre os orthopoxvirus. Dessa forma, a descoberta de Jenner resultou na primeira vacina (termo dado posteriormente, derivado do vírus *vaccinia*).

Anos mais tarde, as primeiras gerações de vacina foram criadas a partir de cepas de VACV, e eram cultivadas principalmente, no epitélio de gado, os quais eram sacrificados e a vacina era processada a partir da pele retirada (Fenner et al., 1988). As cepas cultivadas, Lister/Elstree, New York City Board of Health (NYCBH), EM-63 e Tian-Tan foram preferencialmente utilizadas durante a campanha de erradicação da varíola. Essas vacinas

utilizaram o vírus atenuado, pois, dessa forma, apresentaria uma maior segurança em comparação a outras cepas como Copenhagen ou Bern. Contudo essas cepas ainda eram competentes quanto a replicação viral. A segunda geração de vacinas utilizou as mesmas cepas para serem produzidas, mas tinham o objetivo de serem mais seguras e eficazes (Paran e Sutter, 2009).

No Brasil, a vacinação remonta ao início do século XIX, mas a produção nacional apenas iniciou no fim do mesmo século, em 1887. A obrigatoriedade da vacina anti-variolica foi decretada pelo governo federal em outubro de 1904, o que levou à conhecida Revolta da Vacina, em 13 de novembro do mesmo ano, episódio que levou o governo a suspender o decreto (Roteli-Martins e Teixeira, 2021; Hochman, 2009). A vacina voltou a fazer parte do esquema vacinal na segunda metade do século, sendo recomendado pela Norma do Programa de Vacinação da Secretaria da Saúde Pública (1968). A vacina foi aplicada aos 8 meses e aos 5 anos de idade com reforços a cada cinco anos. Nesse caso, a cepa era originária do Lister Institute (Elstru, Hertz, Inglaterra) sendo produzida pelo Instituto Vacinogênico no Brasil. Com esforços de campanhas vacinais da Campanha de Erradicação da Varíola (1966-1973) e esforços de vigilância epidemiológica, a varíola foi declarada erradicada em território nacional em 1973. No ano de 1979, a vacinação deixou de ser obrigatória no território brasileiro no primeiro ano de vida. No ano seguinte, em maio de 1980, a Assembléia Mundial de Saúde certificou a erradicação global da doença, extinguindo a recomendação de vacinação obrigatória (de Carvalho Filho et al., 1970).

Durante os últimos anos da campanha de erradicação mundial, novas vacinas continuavam a ser desenvolvidas, mas que não chegaram a ser usadas em larga escala. A terceira geração de vacinas foi desenvolvida através de passagens seriadas em tecido de fibroblastos de galinhas. Essa vacina, a princípio, foi desenvolvida para ser mais segura que as utilizadas na época. Dessa forma, a cepa originária foi propagada no epitélio de bezeros em Ankara, Turquia, por isso foi dado o nome de *Modified Vaccinia virus Ankara* (MVA) (Volz e Sutter, 2017). Essa cepa ainda utilizava o vírus atenuado, mas deficiente na formação de proteínas e na replicação (Paran e Sutter, 2009). A primeira autorização que a MVA recebeu para uso comercial ocorreu na Alemanha em 1977, mas foi sendo utilizada de forma restrita e em baixas quantidades até a erradicação global da doença em 1980 (Mahnel e Mayr 1994).

1.6.1 Utilização de vacinas antivariólicas contra monkeypox

Com a emergência de doenças causadas por poxvírus como o monkeypox, ressurgiu o interesse da pesquisa de vacinas contra essa família de vírus. Alguns estudos do início dos anos 2000 demonstraram que as vacinas antivariólicas baseadas em vírus vaccinia induziam uma resposta cruzada com monkeypox (Hammarlund et al., 2005; Karem et al., 2007). Ainda assim, outros estudos indicaram que a vacina MVA induz a produção de anticorpos neutralizantes protetivos contra o monkeypox e protege contra a mortalidade da doença (Earl et al., 2004; Edghill-Smith et al., 2005).

Por conta disso, algumas vacinas anti-VACV foram liberadas para uso contra monkeypox em diversos países. Nos EUA, a *Food and Drug Administration* são liberadas o uso de vacinas de segunda e terceira geração para o uso contra o MPXV (FDA, 2022). Os principais grupos aptos a se vacinar são trabalhadores da saúde de linha de frente, pesquisadores que trabalham direta ou indiretamente com poxvírus e populações de risco. Durante o recente surto do 2022, as vacinas anti-VACV foram empregadas para tais grupos.

2. Justificativa

A recente epidemia de monkeypox levou à distribuição de uma doença, antes endêmica em poucos países, a diversas regiões não endêmicas. Além disso, a doença é conhecida pelas sequelas aos que evoluem a sintomas graves, além do potencial de evoluir a óbito. As sequelas causadas por mpox podem variar de cicatrizes cutâneas, deformações e cegueira. A vacinação é posta como uma das maneiras mais eficazes de controlar a doença na população.

Não se sabe exatamente quais os eventos que levaram à emergência da doença em tantos países não endêmicos. Especula-se que os fatores incluem o avanço da invasão humana no ambiente silvático, mudanças no genoma do vírus, mas, principalmente, a interrupção da vacinação antivariólica obrigatória. Assim, com o fim da vacinação obrigatória contra a varíola, pode ser observado aumento não só em monkeypox, mas em outras infecções por orthopoxvirus como, cowpox (Damaso, 2022).

Embora alguns estudos indiquem, experimentalmente, a reação cruzada da vacina MVA contra mpox, poucos estudos mostram, de forma quantitativa, a indução da resposta humoral de anticorpos neutralizantes induzida pela vacinação. Além disso, há uma escassa literatura em relação a resposta humoral cruzada de VACV e MPXV e muito menor para o recente surto. Então, compreender esses aspectos é importante para entender a real eficácia da

resposta humoral cruzada. Esses conhecimentos são fundamentais para traçar estratégias contra novos surtos de mpox e pode ser estendido a outros orthopoxvirus (OPV). Com tais resultados, podemos aumentar nosso conhecimento sobre a resposta imune em indivíduos vacinados, que é particularmente relevante para a organização e a administração de vacinas anti-OPV em grandes populações.

3. Objetivo geral

Avaliar a resposta imune cruzada para MPXV na imunização com vacinas antivariólicas, baseadas em VACV, através da quantificação de anticorpos neutralizantes contra MPXV.

3.1. Objetivos específicos

- Isolar MPXV a partir de amostras clínicas de pacientes com mpox em cultura de células;
- Quantificar as partículas virais infecciosas dos estoques de isolados virais através do ensaio de plaque;
- Quantificação do título de anticorpos neutralizantes anti-MPXV em amostras de soro de voluntários que se vacinaram na campanha de vacinação de 2023 através do teste de neutralização por redução de placas em dois grupos: indivíduos imunizados previamente (até 1979) que também foram imunizados em 2023 e indivíduos vacinados apenas em 2023.

4. Materiais e Métodos

4.1. Isolamento das amostras de pacientes com mpox

Para o isolamento viral, foram usadas amostras clínicas de lesões de pacientes com diagnóstico confirmado de MPXV por PCR tanto de Orthopoxvirus quanto de MPXV. As amostras (Tabela 1) foram submetidas ao isolamento viral.

Tabela 1 - Amostras de pacientes com mpox selecionadas para isolamento viral								
Amostra	Sexo	Instituição	Data de nascimento	Data da coleta	Espécime	PCR (valor de Ct)		Região de coleta
						Orthopox	Monkeypox	
MKP180.1	Masculino	LACEN-RJ	22/1/1972	18/07/2022	Swab fragmento	19.88	18.24	Não há informação
MKP272.2	Masculino	LACEN-RJ	25/10/1986	22/7/2022	Swab de secreção	17.51	15.64	Não há informação
MKP283.1	Masculino	NEEDIER	23/02/1986	25/07/2022	Swab seco com crosta	15.51	12.67	Não há informação
MKP451	Masculino	NEEDIER	19/04/1984	01/08/2022	Não há informação	17.51	18.87	Não há informação
MKP1232	Masculino	LACEN RJ	Não há informação	09/08/2022	Swab crosta e secreção de lesão	18.9	18.19	Lesão no pênis
MKP1347	Masculino	LACEN RJ	06/09/2000	12/08/2022	Swab fragmento + swab secreção	13.17	12.9	Não há informação
MKP1477.1	Masculino	LACEN RJ	07/03/1997	11/08/2022	Swab de secreção de lesão	13.92	12.57	Não há informação
MKP1477.2	Masculino	LACEN RJ	07/03/1997	11/08/2022	Swab de secreção de lesão	13.92	12.57	Não há informação
MKP1512	Masculino	LACEN RJ	16/03/1988	15/08/2022	Fragmento	15.2	13.84	Não há informação

As amostras clínicas foram cedidas pelo Laboratório Molecular de Diagnóstico em Virologia (LMDV) da UFRJ, que funcionou como centro de diagnóstico durante o surto de mpox de 2022-23.

4.2 Amostras de soro de indivíduos vacinados para avaliação de anticorpos neutralizantes

As amostras de soro de indivíduos (profissionais da saúde com alto risco de exposição ao MPXV) imunizados com a vacina JYNNEOS® (empresa Bavarian Nordic A/S) foram coletadas pelo Núcleo de Enfrentamento e Estudos de Doenças Infecciosas Emergentes e Reemergentes (NEEDIER). O esquema vacinal consistiu de duas doses administradas via subcutânea com intervalo de cerca de 45 dias.

Amostras de soro foram coletadas em diferentes períodos após a administração da primeira e da segunda dose. O calendário consistiu na aplicação da primeira dose e a coleta no mesmo dia (D0). O NEEDIER também solicitou aos voluntários que se apresentassem para coleta após 7, 14 e 30 dias da primeira dose e da segunda dose.

Neste trabalho, foram avaliadas amostras coletadas no dia da administração da primeira dose (D0) e também amostras coletadas 14 dias após a segunda dose. Nos indivíduos avaliados, a aplicação da segunda dose ocorreu de 42 a 49 dias após a primeira dose (média \pm desvio padrão = $44,73 \pm 3,22$ dias). Desta forma, as amostras coletadas após 14 dias da segunda dose foram coletadas entre 54 a 63 dias após a administração da primeira dose (D54-D63). As demais amostras serão avaliadas posteriormente.

Todos os indivíduos analisados foram imunizados na campanha de vacinação para mpox de 2023. Os indivíduos avaliados foram categorizados em dois grupos: 8 indivíduos que nasceram até 1979 e portanto foram previamente imunizados com vacinas antes de 1979 e novamente em 2023 (grupo vacinação histórica) e 8 indivíduos que foram vacinados apenas em 2023 (grupo vacinação de 2023) (Tabela 2).

Tabela 2 - Descrição dos grupos analisados

Grupo	Número de indivíduos	Sexo (M/F)	Idade (média + *SD)	Dias após a vacinação
Vacinação histórica (pré 1979)	8	4/4	58+/-5.50	D0 (n=8), D56 (n=2)
Vacinação de 2023	8	5/3	28.25 +/- 2.96	D0 (n=7), D54-63 (n=8)

*SD - desvio padrão

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob o número de protocolo CAAE 62281722.5.0000.5257.

4.3 Cultura de células

Foram utilizadas células da linhagem transformada de BSC-40 gentilmente cedidas pela prof. Clarissa Damaso (IBCCF, UFRJ), provenientes do epitélio de rim de macaco verde africano. As células foram mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) glucose 4,5g/L (Gibco), suplementado com 7% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), e mantidas em estufas a 37°C com 5% de CO₂.

4.4. Isolamento viral

Os vírus foram isolados a partir de amostras de pacientes com mpox com diagnóstico confirmado por PCR (Tabela 1). O protocolo de isolamento consistiu na inoculação de 60 ul de amostras de cada paciente diluídas com a solução salina Puck (60 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.7 mM Glucose, 2 mM NaHCO₃, 7 µM Phenol Red, 7 mM MgCl₂, pH 7,2) em volume final de 200 ul. As amostras foram vortexadas por 5 segundos, homogeneizadas e inoculadas em células BSC-40 semeadas em placas de 6 poços (Corning) com 70-90% de confluência da monocamada celular. As células foram incubadas por 2h para adsorção viral (com agitação a cada 15 min). Após isso, o inóculo foi removido, o poço foi lavado com 0.5 ml de PBS e foi adicionado 2 ml de meio DMEM com 7% de SFB, 1% penicilina e estreptomicina (Sigma) e 1% anfotericina B (Sigma). As células foram monitoradas diariamente para avaliação de efeito citopático (CPE). Após o aparecimento de CPE, o meio de cultura foi descartado, foram adicionados 500ul de PBS gelado e as células foram coletadas com auxílio de *cell scraper*

(Corning). As amostras foram centrifugadas a 500 x g por 10 min a 4° C. Em seguida, as amostras foram congeladas a -80°C e descongeladas 3 vezes para promover a lise celular para a obtenção dos vírus maduros intracelulares. Os isolados foram armazenados a -80°C.

4.5 Ensaios de plaque

Para a quantificação das partículas virais infecciosas dos isolados de MPXV, o ensaio de plaque viral foi utilizado. Para isso, células BSC-40 foram cultivadas em monocamada em placas de cultivo celular de 12 poços (Corning). O ensaio requer uma monocamada de cerca de 70-80% de confluência. Para o início do ensaio, foi feita uma diluição seriada com a razão de 1:10 dos vírus utilizados, inoculando 50 ul do estoque viral em um tubo com 450 ul de solução *Puck* e diluindo até 1:10⁷. Após feita as diluições seriadas, o meio de cultura foi removido da placa e foi adicionado 200 µL das diluições em cada poço em duplicata. Após isso, a placa foi incubada por 2 horas a 37°C, agitando a cada 15 min. Passado o tempo de adsorção, foi adicionado 1 ml de meio DMEM suplementado com 7% de SFB e foi novamente incubada na estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 3 dias. Ao fim da etapa de infecção, as placas foram removidas da estufas e fixadas com 10% formaldeído (Sigma-Aldrich) por 1 hora. Após a fixação, o formaldeído foi removido e as placas foram coradas com cristal violeta para visualização dos plaques virais. Para o cálculo das partículas virais, foi utilizada a seguinte fórmula: título viral em PFU/ml = contagem de plaques no poço × fator de diluição/volume de inóculo (ml). Ao fim do ensaio, tivemos a contabilização das unidades formadoras de plaque por mL (PFU/mL) que representam a quantificação das partículas infecciosas do estoque viral.

4.6. *Back titration*

Para confirmar os títulos dos estoques virais, realizamos o ensaio de *back titration*. Foram utilizadas células BSC-40, cultivadas em placas de 6 poços (Corning) em uma confluência de 70-80%. O ensaio consiste na inoculação de quantidades determinadas de vírus calculadas a partir do título viral estabelecido pelo ensaio de plaque. No nosso ensaio, inoculamos 25, 50 ou 100 PFU em cada poço em duplicata. O inóculo viral foi diluído em 200ul de solução de *Puck* por 2 horas a 37°C, agitando a cada 15 minutos. Após isso, o inóculo foi descartado e foram adicionados 2 ml de meio DMEM com 3% de SFB e foi novamente incubada na estufa por 3 dias. Após esse tempo, as placas foram fixadas e coradas com cristal violeta para a observação da quantidade de plaques formadas. Caso a quantidade

de plaques não seja condizente com a titulação previamente realizada, é possível calcular um fator de correção dos títulos virais a partir da razão entre a contagem de plaques virais obtida experimentalmente e a contagem de plaques estimada pelo título viral obtido pelo ensaio de plaque.

4.7 Teste de neutralização pela redução de placas de lise (PRNT)

O teste de neutralização pela redução de placas de lise (PRNT, do inglês *Plaque Reduction Neutralization Test*) tem o objetivo de quantificar os níveis de anticorpos neutralizantes presentes nas amostras. É comumente utilizado para avaliar a resposta imune de uma pessoas vacinadas ou pacientes curados de infecções prévias. Para esses experimentos, células BSC-40 foram semeadas em placas de 12 poços (Corning). O soro utilizado do paciente foi inativado com a incubação da amostra a 60°C por 60 minutos. O soro inativado foi diluído de forma seriada com fator de diluição 2 em uma razão de 1:10 até 1:2560. Para a diluição seriada, foi utilizada uma placa de 96 poços onde cada linha corresponde a diluição de uma amostra de soro. Na primeira diluição de soro, foi adicionado 200 µl de solução de *Puck* e 50 µl do soro ao poço, fazendo uma diluição inicial de 1:5. Nos outros 9 poços foram adicionados 125 µl de solução de *Puck* e 125 µl da diluição anterior, fazendo a segunda diluição de 1:10 seguindo até a diluição de 1:2560.

Após isso, foram preparadas soluções do soro diluído com o estoque viral. Para isso, o estoque viral foi diluído obtendo-se uma solução de MPXV a 1000 PFU/ml de forma que fossem inoculadas 100 PFU para cada poço. A seguir, adicionou-se 125 µl do meio com o vírus 1000 PFU/ml em 125 µl das amostras de soro diluídas de forma seriada. Adicionalmente, foram preparados poços controle apenas com solução de *Puck* (controle negativo) e um poço contendo apenas 125 µl da solução de MPXV (1000 PFU/ml) em 125 µl da solução de *Puck* (controle positivo). A placa foi incubada por 1h em 37°C em estufa. Após esse tempo, foram inoculados 200 µl da mistura vírus-soro e dos controles nos poços das placas de 12 poços contendo as células BSC-40. As placas foram incubadas a 37°C por 2h na estufa. Após esse tempo, o inóculo foi removido e foi adicionado 1 ml de meio DMEM suplementado com 5% de SFB nas placas e, então, incubadas na estufa a 37°C por 3 dias a fim de permitir o desenvolvimento de plaques.

Após o período de incubação, as placas foram submetidas à fixação e coloração. Para fixar as células, foram adicionados 1 ml de formaldeído 10% (Sigma) em cada poço e incubadas à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionado a solução de cristal violeta para realizar a coloração e permitir a contabilização

das placas. Para determinar a maior diluição que resultou em redução acima de 50% da neutralização (PRNT₅₀), a contagem de plaques do poço com as amostras foram comparados os plaques do controle positivo do vírus. O poço sem a inoculação do vírus permite a avaliação da integridade da monocamada de células. Os títulos de PRNT foram expressos como o valor recíproco da diluição de soro mais alta para a qual a formação de plaques é reduzida em $\geq 50\%$ (PRNT₅₀) em comparação com a contagem de plaques do controle do vírus (na ausência de soro). Amostras com títulos de PRNT₅₀ < 20 foram considerados negativas para presença de anticorpos neutralizantes e amostras com PRNT₅₀ ≥ 20 foram consideradas positivas.

5. Resultados

5.1. Observação do efeito citopático de MPXV a partir do isolamento de amostras de pacientes com mpox

Para o isolamento viral, 9 amostras de 8 pacientes diagnosticados com mpox foram inoculadas em culturas de células BSC-40. Todas as amostras apresentaram extenso efeito citopático em até 72h de infecção (Figura 5).

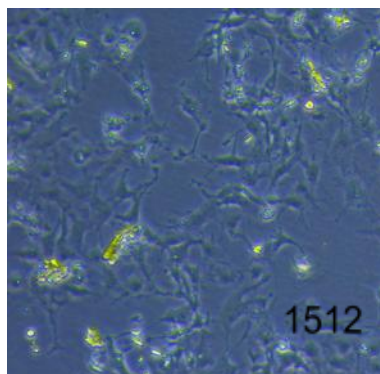
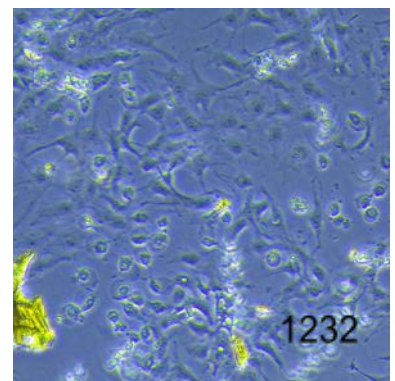
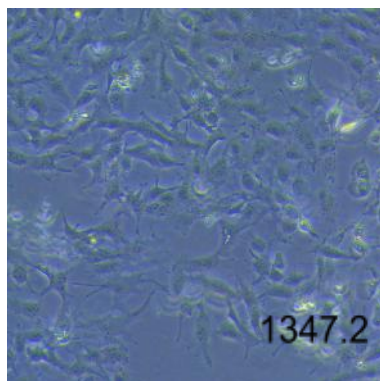
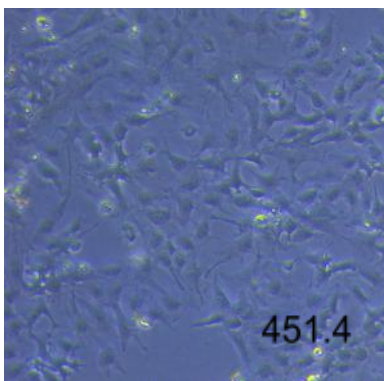
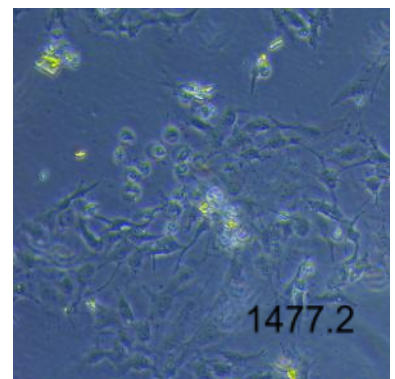
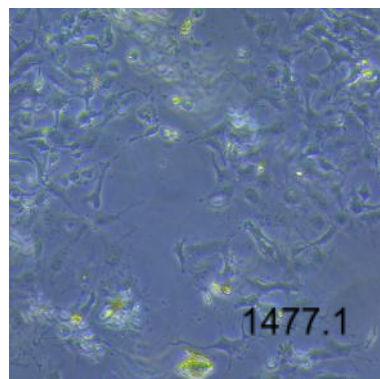
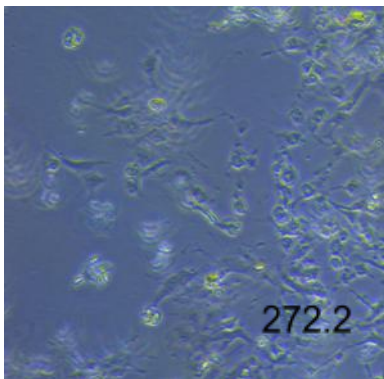
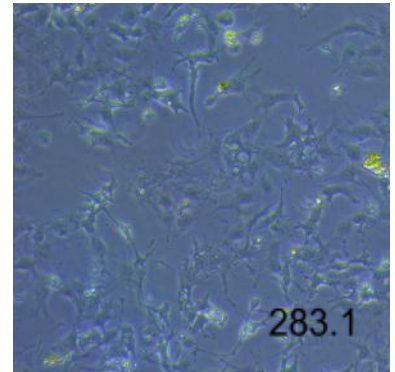
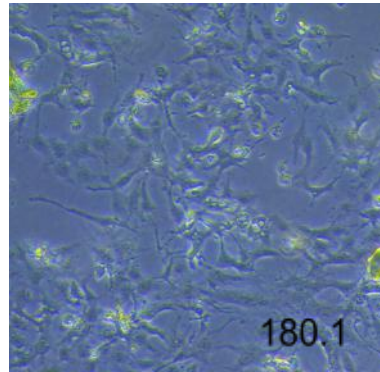
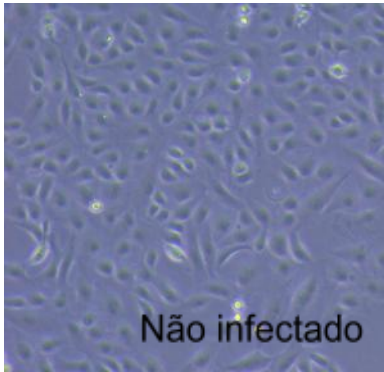


Figura 5: Efeito citopático em células BSC-40 infectadas com isolados de pacientes: As amostras clínicas foram diluídas em solução de *Puck* e inoculadas em células BSC-40 à temperatura ambiente sob agitação por 2h. As imagens foram obtidas a partir do microscópio invertido Leica DMIL LED. No canto inferior direito da imagem estão os números de identificação das amostras. São 9 amostras de 8, as amostras 1477.1 e 1477.2 são originárias do mesmo paciente.

Os estoques virais obtidos a partir do ensaio de isolamento viral foram analisados pelo ensaio de plaque para quantificação de partículas virais infecciosas. Foi possível quantificar a formação de plaques de 5 amostras após a primeira passagem da propagação (Tabela 1). Não observamos formação de plaques virais nos estoques obtidos das amostras 451.4, 1232 e 1347.2. Nota-se que na amostra 180.1 houve uma quantidade de partículas infecciosas elevadas em comparação às outras amostras. Por conta disso, essa amostra foi selecionada para ser propagada para utilização nos ensaios de PRNT.

Tabela 3 - Quantificação de partículas dos isolados	
Nº da amostra	PFU/ml
180.1	$1,6 \times 10^5$
283.1	6×10^4
272.2	$1,6 \times 10^4$
1477.1	$3,25 \times 10^4$
1447.2	$3,1 \times 10^4$
451.4	-
1347.2	-
1232	-
1512	-

5.2. Avaliação dos anticorpos neutralizantes nas amostras de indivíduos imunizados pela vacinação histórica e na vacinação em 2023

A análise dos anticorpos neutralizantes foi realizada através do PRNT. Foram avaliados dois grupos de pessoas imunizadas na campanha de 2023: indivíduos que foram previamente imunizados na campanha de vacinação antivariólica realizada até 1979 (vacinação histórica) e indivíduos vacinados apenas após o surto de 2022 (vacinação de 2023). A coleta no D0 foi realizada antes da administração da primeira dose da vacina e a coleta D56 foi feita 14 dias após a segunda dose da vacina.

A avaliação do PRNT₅₀ das amostras da vacinação histórica no D0 demonstrou que todos os indivíduos vacinados antes de 1979 apresentaram títulos abaixo de 10 indicando ausência de anticorpos neutralizantes. Dois indivíduos avaliados no D56 (56 dias após a administração da primeira dose e 16 dias após a administração da segunda dose) da vacinação de 2023 apresentaram aumento no título de anticorpos neutralizantes contra MPXV com títulos de PRNT₅₀=20 (Fig. 6A), demonstrando a presença de anticorpos neutralizantes embora em baixos títulos.

Em relação aos indivíduos que se vacinaram apenas em 2023, todas as amostras do D0 tiveram títulos de anticorpos neutralizantes anti-MPXV <10 no D0. Após a segunda dose (D54-63), seis indivíduos mantiveram títulos <10 e dois indivíduos apresentaram título PRNT₅₀=10 (Fig. 6B). Dessa forma, não foi detectada a presença de anticorpos neutralizantes anti-MPXV nas amostras analisadas (tanto em D0 quanto em D54-63) de indivíduos vacinados apenas em 2023.

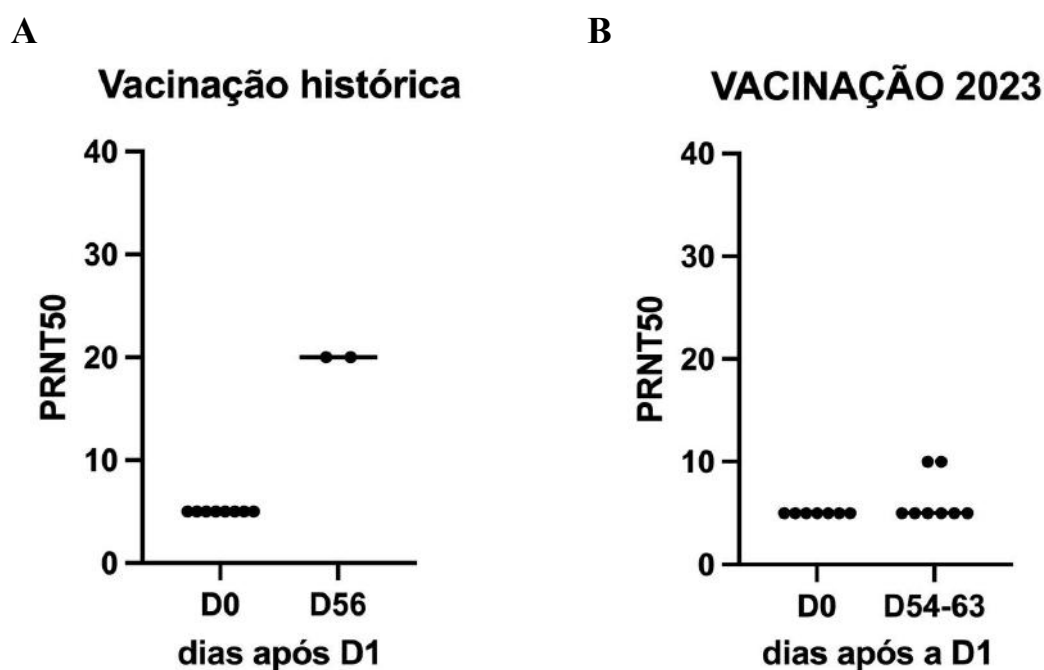


Figura 6: PRNT das amostras dos grupo vacinados: (A) Amostras dos indivíduos vacinados antes de 1979 e em 2023. A coleta do soro foi realizada antes (D0) da primeira dose (D1) e após 56 dias (D56), ou seja 14 dias após a segunda dose (B) Amostras de indivíduos vacinados apenas em 2023. A coleta foi realizada antes de D1 (D0) e entre 54 e 63 (D54-63) dias após a primeira dose.

Nossos resultados preliminares sugerem níveis mais altos de anticorpos neutralizantes anti-MPXV em indivíduos que foram previamente imunizados em 1979, sugerindo que uma ou mais doses adicionais podem conferir maiores títulos de anticorpos neutralizantes.

6. Discussão

Nossos resultados preliminares sugerem que há uma reação cruzada com a vacina de MVA (JYNNEOS) administrada no ano de 2023. Assim como a vacinação histórica, a vacina administrada em 2023 é baseada no vírus vaccinia que é membro do gênero *Orthopoxvirus* e da família *Poxviridae*. O uso destas vacinas baseia-se na reatividade cruzada da resposta imune aos membros do gênero *Orthopoxvirus*.

Considerando um título de PRNT50 acima de 20 como positivo para *monkeypox*, os indivíduos que se vacinaram apenas em 2023, não apresentaram anticorpos neutralizantes para MPXV após 14 dias da segunda dose. Além disso, indivíduos vacinados na vacinação histórica, pré-1979, demonstraram um aumento maior no título de anticorpos neutralizantes anti-MPXV do que pessoas que se vacinaram apenas em 2023. Esses resultados corroboram o estudo realizado por Zaeck e colaboradores em 2023 com vacinados historicamente nos países baixos. Nesse mesmo estudo, indivíduos historicamente vacinados já apresentavam anticorpos com reação cruzada e a vacinação aumentou os títulos. Do mesmo modo, indivíduos que não se vacinaram em 1974 não apresentaram títulos iniciais de anticorpos, mas foram induzidos pela vacinação (Zaeck et al., 2023).

Estudos referentes à indução da imunidade celular conferida pela vacina, demonstraram que pessoas expostas ao MPXV apresentaram um *boost* de células T reativas à MPXV com a presença de células T CD4+ e T CD8 + conferidas pela vacinação histórica. Nesse estudo, três de um total de oito pacientes previamente vacinados, não desenvolveram mpxo enquanto o restante dos 20 indivíduos (vacinados ou não) desenvolveram sintomas (Hammarlund et al., 2005). Esse achado está de acordo com o que já foi investigado anteriormente pelo mesmo grupo, que demonstrou a presença de células T, assim como de anticorpos contra VACV, até 75 anos após a vacinação histórica (Hammarlund et al., 2003). O mesmo não encontra correlação entre os títulos dos anticorpos desses indivíduos com a presença de células T, indicando que ambas as respostas são reguladas de forma independente. Outros estudos indicam a presença de células T CD4+ reativas à MPXV em indivíduos nascidos antes do fim da vacinação obrigatória, mostrando a reação cruzada não só a MPXV, mas a outros orthopoxvírus. A presença de células T CD8+ também se mantêm, mas em baixos níveis e mantendo a reação cruzada. Assim, esse estudo demonstra que as

células de memória perduram por muitas décadas após a vacinação, ou à exposição a outros poxvírus (Adamo et al., 2023).

O estudo de Zaeck *et al.* apontou a presença de anticorpos neutralizantes em indivíduos vacinados historicamente e vacinados com MVA nos Países Baixos, onde a vacinação obrigatória cessou em 1974. Nesse estudo, foi demonstrado a presença de anticorpos neutralizantes, mesmo após décadas da vacinação histórica e que possuíam reação cruzada com MPXV. Contudo, ao analisar os anticorpos de recém vacinados com MVA, o título da reação cruzada se demonstrou baixo, em relação à proteção conferida contra o VACV. Além disso, o grupo utilizou diferentes regimes de vacinação para medir o surgimento de anticorpos neutralizantes. Assim, verificou-se que apenas após 2 meses da segunda dose da vacinação havia uma resposta significativa de anticorpos. O baixo nível de anticorpos neutralizantes não indica a ineficácia da vacina, pois isso está relacionado com outros fatores como a própria indução da imunidade celular e de memória imunológica.

A resposta de células B, no contexto da infecção por monkeypox, se demonstrou crucial para a proteção cruzada em macacos rhesus (Edghill-Smith et al., 2005). No contexto da vacinação em humanos, a proteção contra varíola perdurou por mais de 50 anos. Contudo, apenas 50% desses indivíduos apresentaram um título maior que 1:32 após 20 anos, sendo esse um indicador de proteção sugerido para conferir imunidade protetora contra a varíola (Mack et al., 1972). Por outro lado, um estudo de um caso de infecção natural de mpxv reportou um título de PRNT₅₀ de 35 após 6 dias do início dos sintomas (Huang et al, 2022). Isso sugere que uma infecção natural pelo vírus induza uma resposta humoral maior a curto prazi que a vacinação com vacinas anti-VACV.

Nesse contexto, nosso trabalho, quando finalizado, contribuirá para a compreensão da resposta imune humoral contra o MPXV em indivíduos vacinados e pode trazer informações úteis para a saúde pública como a recomendação de uma dose adicional no esquema vacinal.

7. Conclusão

- Obtivemos 9 isolados clínicos que produziram efeito citopático em células BSC-40;
- Dos 9 isolados clínicos, cinco foram quantificados e apresentaram títulos virais entre 1.6×10^4 e 1.6×10^5 PFU/ml. Não observamos plaques em quatro isolados virais (451.4, 1347.2, 1232, 1512);

- Não foram observados anticorpos neutralizantes anti-MPXV no dia da administração da primeira dose da vacina nos dois grupos analisados (vacinação histórica e vacinação em 2023);
- Observamos a presença de anticorpos neutralizantes com títulos de $PRNT_{50}=20$ em dois indivíduos de grupo de vacinação histórica nas amostras D54-63 (coletadas após 14 dias da segunda dose). Esse dado sugere que a vacinação de indivíduos previamente vacinados (vacinados historicamente) conferiram uma maior resposta cruzada de anticorpos neutralizantes contra o MPXV após a vacinação de 2023;
- Não observamos anticorpos neutralizantes nas amostras de indivíduos vacinados apenas em 2023 tanto no dia da administração da primeira dose quanto 14 dias após a segunda dose.

8. Perspectivas futuras

Mais amostras serão testadas futuramente tanto para aumentar o número amostral quanto para avaliar outros intervalos após a segunda dose para corroborar e complementar esses achados.

9. Referências

Adamo, S., Gao, Y., Sekine, T., Mily, A., Wu, J., Storgård, E., ... & Buggert, M. (2023). Memory profiles distinguish cross-reactive and virus-specific T cell immunity to mpox. *Cell Host & Microbe*.

Alakunle, E., Moens, U., Nchinda, G., & Okeke, M. I. (2020). Monkeypox virus in Nigeria: infection biology, epidemiology, and evolution. *Viruses*, 12(11), 1257.

Armstrong, J. A., Metz, D. H., & Young, M. R. (1973). The mode of entry of vaccinia virus into L cells. *Journal of General Virology*, 21(3), 533-537.

Baroudy, B. M., Venkatesan, S., & Moss, B. (1982). Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain. *Cell*, 28(2), 315-324.

Barrett, J. W., & McFadden, G. (2008). Origin and evolution of poxviruses. In *Origin and Evolution of Viruses* (pp. 431-446). Academic Press.

Beattie, E., Paoletti, E., & Tartaglia, J. (1995). Distinct patterns of IFN sensitivity observed in cells infected with vaccinia K3L-and E3L-mutant viruses. *Virology*, 210(2), 254-263.

Brandt, T. A., & Jacobs, B. L. (2001). Both carboxy-and amino-terminal domains of the vaccinia virus interferon resistance gene, E3L, are required for pathogenesis in a mouse model. *Journal of virology*, 75(2), 850-856.

- Byrd, D., Shepherd, N., Lan, J., Hu, N., Amet, T., Yang, K., ... & Yu, Q. (2014). Primary human macrophages serve as vehicles for vaccinia virus replication and dissemination. *Journal of virology*, 88(12), 6819-6831.
- Carter, G. C., Law, M., Hollinshead, M., & Smith, G. L. (2005). Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. *Journal of General Virology*, 86(5), 1279-1290.
- Carter, G. C., Rodger, G., Murphy, B. J., Law, M., Krauss, O., Hollinshead, M., & Smith, G. L. (2003). Vaccinia virus cores are transported on microtubules. *Journal of General Virology*, 84(9), 2443-2458.
- CDC, Monkeypox in the U.S., Centers for Disease Control and Prevention, disponível em: <<https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/clinicians/clinical-recognition.html>>. acesso em: 7 jul. 2022.
- CDC (2022) Centers of Disease Control and Prevotions. Past U.S. Cases and Outbreaks. 6 de junho de 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/poxvirus/mpox/outbreak/us-outbreaks.html>
- CDC (2023) Centers of Disease Control and Prevotions. mpox in animals. 4 de janeiro de 2023. Disponível em: <https://www.cdc.gov/poxvirus/mpox/veterinarian/mpox-in-animals.html#:~:text=Mpox%20virus%20can%20infect%20a,of%20animals%20can%20get%20mpox.>
- Chang, A., & Metz, D. H. (1976). Further investigations on the mode of entry of vaccinia virus into cells. *Journal of General Virology*, 32(2), 275-282.
- Chang, H. W., Watson, J. C., & Jacobs, B. L. (1992). The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(11), 4825-4829.
- Chung, C. S.; Hsiao, J. C.; Chang, Y. S.; Chang, W. (1998). A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *Journal of Virology*, 72(2), 1577-1585.
- Colamonici, O. R., Domanski, P., Sweitzer, S. M., Larner, A., & Buller, R. M. L. (1995). Vaccinia virus B18R gene encodes a type I interferon-binding protein that blocks interferon α transmembrane signaling (*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(27), 15974-15978.
- Condit, R. C., Moussatche, N., & Traktman, P. (2006). In A Nutshell: Structure and Assembly of the Vaccinia Virion. *Advances in Virus Research*, 31-124. doi:10.1016/s0065-3527(06)66002-8
- Condit, R.; Niles, E. (2003) Regulation of viral transcription elongation and termination during vaccinia virus infection. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1577, 325-336.
- D'Antonio, F., Pagani, G., Buca, D., & Khalil, A. (2022). Monkeypox infection in pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *American journal of obstetrics & gynecology MFM*, 100747.
- Damaso, C. R. (2022). The 2022 monkeypox outbreak alert: Who is carrying the burden of emerging infectious disease outbreaks?. *The Lancet Regional Health—Americas*, 13.
- Damon, I. K. (2011). Poxviruses. *Manual of Clinical Microbiology*, 1647-1658.
- de Carvalho Filho, E. S., Morris, L., de Lemos, A. L., de Leon, J. P., Escobar, A., & de Silva, O. J. (1970). Smallpox eradication in Brazil, 1967-69. *Bulletin of the World Health Organization*, 43(6), 797.
- Earl, P. L., Americo, J. L., Wyatt, L. S., Eller, L. A., Whitbeck, J. C., Cohen, G. H., ... & Moss, B. (2004). Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox. *Nature*, 428(6979), 182-185.
- Edghill-Smith, Y., Golding, H., Manischewitz, J., King, L. R., Scott, D., Bray, M., ... & Franchini, G. (2005). Smallpox vaccine-induced antibodies are necessary and sufficient for protection against monkeypox virus. *Nature medicine*, 11(7), 740-747.

- Esteban, D. J., & Hutchinson, A. P. (2011). Genes in the terminal regions of orthopoxvirus genomes experience adaptive molecular evolution. *BMC genomics*, 12, 1-12.
- Fahrni, M. L., & Choudhary, O. P. (2022). Possibility of vertical transmission of the human monkeypox virus. *International Journal of Surgery (London, England)*, 105, 106832.
- FDA (2022) Food and Drug Administration. Monkeypox Update: FDA Authorizes Emergency Use of JYNNEOS Vaccine to Increase Vaccine Supply. 09 de agosto de 2022 Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/monkeypox-update-fda-authorizes-emergency-use-jynneos-vaccine-increase-vaccine-supply>
- Fenner, F., Henderson, D. A., Arita, I., Jezek, Z., & Ladnyi, I. D. (1988). *Smallpox and its eradication* (Vol. 6, pp. 1-1421). Geneva: World Health Organization.
- Fischer, M. A., Davies, M. L., Reider, I. E., Heipertz, E. L., Epler, M. R., Sei, J. J., ... & Norbury, C. C. (2011). CD11b+, Ly6G+ cells produce type I interferon and exhibit tissue-protective properties following peripheral virus infection. *PLoS pathogens*, 7(11), e1002374.
- Garcia, A. D., Aravind, L., Koonin, E. V., and Moss, B. (2000). Bacterial-type DNA holliday junction resolvases in eukaryotic viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8926–8931
- Gessain, A., Nakoune, E., & Yazdanpanah, Y. (2023). Monkeypox. Reply. *The New England Journal of Medicine*, 388(7), 671-671.
- Gong, S., Lai, C., & Esteban, M. (1990). Vaccinia virus induces cell fusion at acid pH and this activity is mediated by the N-terminus of the 14-kDa virus envelope protein. *Virology*, 178(1), 81-91.
- Gubser, C., Hué, S., Kellam, P., & Smith, G. L. (2004). Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *Journal of General Virology*, 85(1), 105-117.
- Hammarlund, E., Lewis, M. W., Carter, S. V., Amanna, I., Hansen, S. G., Strelow, L. I., ... & Slifka, M. K. (2005). Multiple diagnostic techniques identify previously vaccinated individuals with protective immunity against monkeypox. *Nature medicine*, 11(9), 1005-1011.
- Hammarlund, E., Lewis, M. W., Hansen, S. G., Strelow, L. I., Nelson, J. A., Sexton, G. J., ... & Slifka, M. K. (2003). Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nature medicine*, 9(9), 1131-1137.
- Hatcher, E. L., Wang, C., & Lefkowitz, E. J. (2015). Genome variability and gene content in chordopoxviruses: dependence on microsatellites. *Viruses*, 7(4), 2126-2146.
- Hendrickson, R. C., Wang, C., Hatcher, E. L., & Lefkowitz, E. J. (2010). Orthopoxvirus Genome Evolution: The Role of Gene Loss. *Viruses*, 2(9), 1933–1967.
- Hnatiuk, S., Barry, M., Zeng, W., Liu, L., Lucas, A., Percy, D., & McFadden, G. (1999). Role of the C-terminal RDEL motif of the myxoma virus M-T4 protein in terms of apoptosis regulation and viral pathogenesis. *Virology*, 263(2), 290-306.
- Hochman, G. (2009). Priority, invisibility and eradication: the history of smallpox and the Brazilian public health agenda. *Medical History*, 53(2), 229-252.
- Hsiao, J. C., Chung, C. S., & Chang, W. (1999). Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *Journal of virology*, 73(10), 8750-8761.
- Hu, F. Q., Smith, C. A., & Pickup, D. J. (1994). Cowpox virus contains two copies of an early gene encoding a soluble secreted form of the type II TNF receptor. *Virology*, 204(1), 343-356.

- Huang, B., Zhao, H., Song, J., Zhao, L., Deng, Y., Wang, W., ... & Tan, W. (2022). Isolation and Characterization of Monkeypox Virus from the First Case of Monkeypox—Chongqing Municipality, China, 2022. *China CDC weekly*, 4(46), 1019.
- Huang, Y., Mu, L., & Wang, W. (2022). Monkeypox: epidemiology, pathogenesis, treatment and prevention. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 1-22.
- Hughes, A. L., & Friedman, R. (2005). Poxvirus genome evolution by gene gain and loss. *Molecular phylogenetics and evolution*, 35(1), 186-195.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES – ICTV. Disponível em: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id= Acesso em 08 de maio de 2023.
- Jahrling, P. B., Hensley, L. E., Martinez, M. J., LeDuc, J. W., Rubins, K. H., Relman, D. A., & Huggins, J. W. (2004). Exploring the potential of variola virus infection of cynomolgus macaques as a model for human smallpox. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(42), 15196-15200.
- Jenner, E. (1798) An inquiry into the causes and fleets of the variolae vaccinae, a disease discovered in some of the western counties of England, particularb Gloucestershire, and known by the name of the cowpox, London. Reprinted in : Camac C.N.B., ed. (1 959) *Classics of medicine and surgery*, New York, Dover, pp. 213-240.
- Jenner, E. (1801) *The origin of the vaccine inoculation*, London, Shury.
- Joklik, W. K. (1966). The poxviruses. *Bacteriological Reviews*, 30(1), 33-66.
- Karem, K. L., Reynolds, M., Hughes, C., Braden, Z., Nigam, P., Crotty, S., ... & Damon, I. K. (2007). Monkeypox-induced immunity and failure of childhood smallpox vaccination to provide complete protection. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(10), 1318-1327.
- Keasey, S., Pugh, C., Tikhonov, A., Chen, G., Schweitzer, B., Nalca, A., & Ulrich, R. G. (2010). Proteomic basis of the antibody response to monkeypox virus infection examined in cynomolgus macaques and a comparison to human smallpox vaccination. *PLoS One*, 5(12), e15547.
- Kisalu, N. K., & Mokili, J. L. (2017). Toward understanding the outcomes of monkeypox infection in human pregnancy. *The Journal of infectious diseases*, 216(7), 795-797.
- Kraemer, M. U., Tegally, H., Pigott, D. M., Dasgupta, A., Sheldon, J., Wilkinson, E., ... & Brownstein, J. S. (2022). Tracking the 2022 monkeypox outbreak with epidemiological data in real-time. *The Lancet Infectious Diseases*, 22(7), 941-942.
- Kugelman, J. R., Johnston, S. C., Mulembakani, P. M., Kisalu, N., Lee, M. S., Koroleva, G. & Rimoin, A. W. (2014). Genomic variability of monkeypox virus among humans, Democratic Republic of the Congo. *Emerging infectious diseases*, 20(2), 232.
- Ladnyj, I. D., Ziegler, P., & Kima, E. (1972). A human infection caused by monkeypox virus in Basankusu Territory, Democratic Republic of the Congo. *Bulletin of the World Health Organization*, 46(5), 593.
- Legrand, F. A., Verardi, P. H., Jones, L. A., Chan, K. S., Peng, Y., & Yilma, T. D. (2004). Induction of potent humoral and cell-mediated immune responses by attenuated vaccinia virus vectors with deleted serpin genes. *Journal of virology*, 78(6), 2770-2779.
- Liszewski, M. K., Leung, M. K., Hauhart, R., Buller, R. M. L., Bertram, P., Wang, X., ... & Atkinson, J. P. (2006). Structure and regulatory profile of the monkeypox inhibitor of complement: comparison to homologs in vaccinia and variola and evidence for dimer formation. *The Journal of Immunology*, 176(6), 3725-3734.
- Mack, T. M., Noble Jr, J., & Thomas, D. B. (1972). A prospective study of serum antibody and protection against smallpox. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 21(2), 214-18.

- Magnus, P. V., Andersen, E. K., Petersen, K. B., & Birch-Andersen, A. (1959). A pox-like disease in cynomolgus monkeys. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 46(2), 156-176.
- Mahnel, H., & Mayr, A. (1994). Experiences with immunization against orthopox viruses of humans and animals using vaccine strain MVA. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 107(8), 253-256.
- Mbala, P. K., Huggins, J. W., Riu-Rovira, T., Ahuka, S. M., Mulembakani, P., Rimoin, A. W., ... & Muyembe, J. J. T. (2017). Maternal and fetal outcomes among pregnant women with human monkeypox infection in the Democratic Republic of Congo. *The Journal of infectious diseases*, 216(7), 824-828.
- McFadden, Grant. Poxvirus tropism. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 3, p. 201-213, 2005.
- Moore, Jeffrey B.; SMITH, Geoffrey L. Steroid hormone synthesis by a vaccinia enzyme: a new type of virus virulence factor. *The EMBO journal*, v. 11, n. 5, p. 1973-1980, 1992.
- Moss, B. Poxviridae. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds) *Fields Virology*. 6. ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. cap. 66, p 2129–2159.
- MS (2003) Ministério da saúde e Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Imunizações 30 anos. 2003. Brasília - DF disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/livro_30_anos_pni.pdf
- Paran, N., & Sutter, G. (2009). Smallpox vaccines: New formulations and revised strategies for vaccination. *Human vaccines*, 5(12), 824-831.
- Parker, S., & Buller, R. M. (2013). A review of experimental and natural infections of animals with monkeypox virus between 1958 and 2012. *Future virology*, 8(2), 129-157.
- Patrocinio-Jesus, R., & Peruzzu, F. (2022). Monkeypox genital lesions. *New England Journal of Medicine*, 387(1), 66-66.
- Roteli-Martins, C. M., & Teixeira, J. C. (2021). Compulsory vaccination: The limit between public and private. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 42, 785-786.
- Schmelz, M.; Sodeik, B.; Ericsson, M.; Wolffe, E. J.; Shida, H.; Hiller, G.; Griffiths, G. (1994). Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. *Journal of Virology*, 68(1), 130–147.
- Seet, B. T., Johnston, J. B., Brunetti, C. R., Barrett, J. W., Everett, H., Cameron, C., ... & McFadden, G. (2003). Poxviruses and immune evasion. *Annual review of immunology*, 21(1), 377-423.
- Smith, G. L., & McFadden, G. (2002). Smallpox: anything to declare?. *Nature Reviews Immunology*, 2(7), 521-527.
- Song, H., Janosko, K., Johnson, R. F., Qin, J., Josleyn, N., Jett, C., ... & Jahrling, P. B. (2013). Poxvirus antigen staining of immune cells as a biomarker to predict disease outcome in monkeypox and cowpox virus infection in non-human primates. *PLoS One*, 8(4), e60533.
- Song, H., Josleyn, N., Janosko, K., Skinner, J., Reeves, R. K., Cohen, M., ... & Jahrling, P. B. (2013). Monkeypox virus infection of rhesus macaques induces massive expansion of natural killer cells but suppresses natural killer cell functions. *PloS one*, 8(10), e77804.
- Spriggs, M. K., Hraby, D. E., Maliszewski, C. R., Pickup, D. J., Sims, J. E., Buller, R. M. L., & VanSlyke, J. (1992). Vaccinia and cowpox viruses encode a novel secreted interleukin-1-binding protein. *Cell*, 71(1), 145-152.

- Szajner, P., Jaffe, H., Weisberg, A. S., & Moss, B. (2004). A complex of seven vaccinia virus proteins conserved in all chordopoxviruses is required for the association of membranes and viroplasm to form immature virions. *Virology*, 330(2), 447-459.
- Vanderplasschen, A., Hollinshead, M., & Smith, G. L. (1998). Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms. *Journal of General Virology*, 79(4), 877-887.
- Volz, A., & Sutter, G. (2017). Modified vaccinia virus Ankara: history, value in basic research, and current perspectives for vaccine development. *Advances in virus research*, 97, 187-243.
- Ward, B. M. (2005). Visualization and characterization of the intracellular movement of vaccinia virus intracellular mature virions. *Journal of Virology*, 79(8), 4755–4763.
- Watson, Julia C.; Chang, Hwai-Wen; Jacobs, Bertram L. Characterization of a vaccinia virus-encoded double-stranded RNA-binding protein that may be involved in inhibition of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Virology*, v. 185, n. 1, p. 206-216, 1991.
- Weaver, Jessica R.; Isaacs, Stuart N. Monkeypox virus and insights into its immunomodulatory proteins. *Immunological reviews*, v. 225, n. 1, p. 96-113, 2008.
- WHO (2022) World Health Organization. WHO recommends new name for monkeypox disease. 28 de novembro de 2022. Genebra. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/28-11-2022-who-recommends-new-name-for-monkeypox-disease>
- World Health Organization (WHO). Multi-country outbreak of mpox - External Situation Report 26. Genebra: WHO, 2023.
- Yang, Z.; Reynolds, S. E.; Martens, C. A.; Bruno, D. P.; Porcella, S. F.; Moss, B. (2011). Expression profiling of the intermediate and late stages of poxvirus replication. *Journal of Virology*, 85(19), 9899–9908.
- Zaeck, L. M., Lamers, M. M., Verstrepen, B. E., Bestebroer, T. M., van Royen, M. E., Götz, H., ... & de Vries, R. D. (2023). Low levels of monkeypox virus-neutralizing antibodies after MVA-BN vaccination in healthy individuals. *Nature medicine*, 29(1), 270-278.