

Investigação de Poxvírus em amostras de roedores pertencentes ao bioma amazônico provenientes da região de Carajás, Pará

Investigation of Poxvirus in samples of rodents belonging to the amazon biome from the region of Carajás, Pará

DOI:10.34119/bjhrv6n2-264

Recebimento dos originais: 17/03/2023

Aceitação para publicação: 20/04/2023

Taynah Cohen de Melo

Mestra em Virologia pelo Instituto Evandro Chagas, Programa de Pós-Graduação em Virologia do Instituto Evandro Chagas (PPGV-IEC)

Instituição: Instituto Evandro Chagas (IEC)

Endereço: Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 470, Jardim América, São Paulo - SP, CEP: 05403-000

E-mail: taynahcohen@gmail.com

Luana da Silva Soares Farias

Doutora em Doenças Tropicais pela Universidade Federal do Pará

Instituição: Universidade Federal do Pará

Endereço: Rodovia BR-316, km 7, S/N, Levilândia - PA, CEP: 67030-000

E-mail: luanasoares@iec.gov.br

Sylvia de Fátima dos Santos Guerra

Doutora em Doenças Tropicais pelo Núcleo de Medicina Tropical pela Universidade Federal do Pará

Instituição: Universidade Federal do Pará

Endereço: Av. Visc. de Souza Franco, 72, Reduto, Belém - PA, CEP: 66053-000

E-mail: sylviawar@gmail.com

Jones Anderson Monteiro Siqueira

Doutor em Virologia pelo Instituto Evandro Chagas (IEC)

Instituição: Instituto Evandro Chagas (IEC)

Endereço: Av. Alcindo Cacela, 287, Umarizal, Belém - PA, CEP: 66060-902

E-mail: jones_siqueira@ymail.com

Lívia Medeiros Neves Casseb

Doutora em Doenças Tropicais pela Universidade Federal do Pará

Instituição: Universidade Federal do Pará

Endereço: Rodovia BR-316, km 7, S/N, Levilândia - PA, CEP: 67030-000

E-mail: liviacasseb@iec.gov.br

Ana Cecilia Ribeiro Cruz

Doutora em Biologia Parasitária pela Fundação Oswaldo Cruz

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz

Endereço: Rodovia BR-316, km 7, S/N, Levilândia - PA, CEP: 67030-000

E-mail: anacecilia@iec.gov.br

Adriana Freitas Moraes

Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Virologia, Programa de Pós-Graduação em Virologia do Instituto Evandro Chagas (PPGV-IEC)
Instituição: Instituto Evandro Chagas (IEC)
Endereço: Rodovia BR-316, km 7, S/N, Levilândia, PA, CEP: 67030-000
E-mail: adrianamoraes@iec.gov.br

Ana Lucia Monteiro Wanzeller

Doutora em Virologia pelo Instituto Evandro Chagas (IEC)
Instituição: Instituto Evandro Chagas (IEC)
Endereço: Rodovia BR-316, km 7, S/N, Levilândia, PA, CEP: 67030-000
E-mail: anawanzeller@iec.gov.br

RESUMO

Introdução: Embora as medidas de controle e tratamento das doenças infecciosas tenham avançado nas últimas décadas, patógenos emergentes e reemergentes ainda compreendem a principal pauta de saúde pública no Brasil. Uma das maiores pandemias já registrada, foi ocasionada pelo vírus da Varíola (VARV). Que pertence ao gênero mais importante dentro da família *Poxviridae*, do ponto de vista da infecção em humanos, o *Orthopoxvirus*, neste estão os vírus, *Vaccinia*, *Monkeypox* e *Cowpox*. Dessa forma, apesar do vírus da varíola ter sido erradicado do Brasil desde 1980, outros poxvírus podem ocasionar doenças em humanos e animais. **Objetivo:** Investigar a existência de poxvírus em amostras de pequenos roedores pertencentes ao bioma amazônico, provenientes da região de Carajás no Estado do Pará. **Material e métodos:** Foram selecionadas 75 amostras de roedores, sendo 42 amostras de fígado e 33 de sangue, oriundas dos municípios de Canaã dos Carajás e Curionópolis, tais amostras fazem parte do acervo de materiais biológicos da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas. Apenas as amostras de fígado foram maceradas e levadas ao aparelho tissuelyser e posteriormente armazenadas em freezer -70°C. Em seguida, foram inoculadas em cultivo de células de neuroblastoma humano (IMR-32) na tentativa de obter o isolamento viral. As células infectadas com as suspensões de fígado e sangue foram observadas por 7 dias para a detecção de possível efeito citopático viral e ao final deste período foi realizada a técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI) visando confirmar ou não a positividade da amostra. **Resultados e Conclusão:** Até o presente momento foram inoculadas 67 amostras, sendo possível observar alterações na monocamada celular de 36. O presente trabalho demonstrou a importância da vigilância visando o controle e prevenção de casos zoonóticos de poxvírus, na região Norte do país, sobretudo no estado do Pará, o qual apresenta densas áreas florestais com inúmeras espécies de animais que podem vir a ser reservatórios de tais agentes. A linhagem celular utilizada apesar de demonstrar alterações na monocamada celular pós-infecção, demonstrou uma menor eficiência quando comparada a estudos prévios com outras linhagens celulares. Além disso, as reações de IFI obtidas foram evidenciadas com reduzida reação fluorescente, demonstrando que talvez essa linhagem celular não seja o modelo ideal para a replicação do poxvírus.

Palavras-chave: poxvírus, roedores, linhagem celular, bioma amazônico,

ABSTRACT

Introduction: Although measures to control and treat infectious diseases have advanced in recent decades, emerging and reemerging pathogens still comprise the main public health agenda in Brazil. One of the biggest pandemics ever recorded was caused by the smallpox virus (VARV). Which belongs to the most important genus within the *Poxviridae* family, from the

point of view of infection in humans, the Orthopoxvirus, in which are the viruses, Vaccinia, Monkeypox and Cowpox. Thus, although the smallpox virus has been eradicated from Brazil since 1980, other poxviruses can cause diseases in humans and animals. Objective: To investigate the existence of poxviruses in samples of small rodents belonging to the Amazon biome, from the region of Carajás in the State of Pará. Material and methods: 75 rodent samples were selected, 42 liver samples and 33 blood samples, from the municipalities of Canaã dos Carajás and Curionópolis. Material. Only the liver samples were macerated and taken to the tissuelyser apparatus and subsequently stored in a -70°C freezer. Then, they were inoculated into cultured human neuroblastoma cells (IMR-32) in an attempt to obtain viral isolation. Cells infected with liver and blood suspensions were observed for 7 days to detect a possible viral cytopathic effect, and at the end of this period, the Indirect Immunofluorescence (IIF) technique was performed to confirm or not the sample's positivity. Results and Conclusion: To date, 67 samples have been inoculated, and it is possible to observe alterations in the cell monolayer of 36. The present work demonstrated the importance of surveillance aiming at the control and prevention of zoonotic cases of poxvirus, in the North region of the country, especially in the state of Pará, which has dense forest areas with numerous species of animals that may become reservoirs of such agents. The cell line used, despite demonstrating alterations in the post-infection cell monolayer, showed lower efficiency when compared to previous studies with other cell lines. In addition, the IFI reactions obtained were evidenced with reduced fluorescent reaction, demonstrating that perhaps this cell line is not the ideal model for poxvirus replication.

Keywords: poxvirus, rodents, cell lineage, amazon biome.

1 INTRODUÇÃO

O comportamento de doenças infecciosas tem mudado em todo o mundo. Isso pode ser atribuído às mutações de vírus e de outros microrganismos ou como resultado de evoluções ocorridas nos patógenos. Contribuindo para o surgimento de doenças. Deve-se levar em consideração o grau de contato entre o reservatório, o vetor e os patógenos, pois isto contribui para a determinação da prevalência da infecção. Praticamente, todos os patógenos vistos como novos existiram previamente na natureza (PIGNATTI, Marta G., 2004).

A experiência com a síndrome respiratória aguda (SARS) tanto atual quanto anteriores à COVID, ilustrou que novos membros de famílias de vírus podem infectar humanos a partir de reservatórios inusitados, sendo necessário avanços rápidos na compreensão da dinâmica desses vírus (MCFADDEN, Grant. 2005).

Uma das maiores pandemias já registrada, foi ocasionada pelo Vírus da Varíola, considerado o poxvírus que mais dizimou membros da população humana até o momento, erradicado oficialmente no ano de 1980. Atualmente, o foco das pesquisas sobre o vírus da varíola está voltado para antivirais e vacinas (MCFADDEN, Grant. 2005; BARBOSA & BARRAL-NETO, 2013; JUNIOR, Magno, 2021).

A família *Poxviridae*, consiste em duas subfamílias, denominadas *Chordopoxvirinae* e *Entomopoxvirinae*, totalizando cerca de 22 gêneros e 83 espécies. Os poxvírus são capazes de infectar tanto vertebrados quanto invertebrados. O gênero mais importante do ponto de vista da infecção em humanos é o *Orthopoxvirus*, neste incluem os vírus *Variola*, *Vaccinia*, *Monkeypox* e o *Cowpox*, este último circula em roedores na Europa e Oriente Médio, infectam felinos e consequentemente humanos (SCHATZMAYR, HERMANN G. et al., 2009; WANZELLER, ANA LUCIA MONTEIRO. et al., 2021).

Os poxvírus medem cerca de 200-430 nm de diâmetro, seu material genético consiste em um DNA linear de dupla fita não segmentado com tamanho que varia entre 140 a 300 kb, as partículas virais possuem um núcleo bicôncavo e rodeado por um ou mais envelopes, seu processo de replicação ocorre no citoplasma tendo início a partir do mecanismo de fusão à célula (WANZELLER, ANA LUCIA MONTEIRO. et al., 2021; MCFADDEN, Grant. 2005).

O sucesso da erradicação da varíola no mundo está vinculado, dentre outras situações, ao fato de não ter sido encontrado nenhum reservatório animal do vírus, visto que muitos poxvírus são capazes de infectar o homem zoonoticamente (MCFADDEN, Grant. 2005).

Na maioria dos casos, os poxvírus possuem especificidade de espécies que variam de estreitas à amplas, e pouco se sabe acerca dos mecanismos que medeiam individualmente seu tropismo no hospedeiro. Em vista disso, mesmo que o vírus da varíola nunca mais infecte seres humanos, outros poxvírus podem causar doenças humanas graves (MCFADDEN, Grant. 2005).

Um dos principais fatores atuais que podem dar origem a este problema está relacionado às mudanças ambientais devido ações antrópicas de forma desordenada, propiciando um contato maior entre humanos e animais que antes não existia, favorecendo a transmissão de infecções por roedores e outros animais silvestres (WANZELLER, ANA LUCIA MONTEIRO. et al., 2021).

No Brasil há dois principais casos de isolamento de poxvírus, um ocorreu em 1963, isolado nas florestas tropicais ao redor de Belém do Pará sendo este originalmente denominado BeAn 58058. O segundo poxvírus foi denominado Cotia (*Oryzopoxvirus*), isolado de camundongos sentinela e mosquitos, nas florestas do município de Cotia em São Paulo (FONSECA, F. G. et al., 1998).

A escassez de informações acerca da circulação viral de poxvírus na região, torna incontestável a importância de um monitoramento das cepas que circulam em roedores da região de Carajás, que está localizada no estado do Pará, apresentando extensa biodiversidade, sendo também considerada a maior produtora do minério de ferro do estado. Este estudo compreenderá dois municípios da região, Canaã dos Carajás e Curionópolis.

Em vista disso, pesquisas que buscam amostras positivas para poxvírus, são de extrema relevância para a comunidade acadêmica e para a saúde e segurança da humanidade, tendo como principal alvo de estudos os roedores.

2 METODOLOGIA

2.1 AMOSTRAS

O estudo utilizou 75 amostras, sendo 42 fígados e 33 sangues de pequenos roedores que fazem parte do acervo de materiais biológicos da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas (SAARB-IEC), tais amostras foram obtidas nos municípios de Canaã dos Carajás e Curionópolis. Após a separação das amostras e preparo de suspensão de fígado, estas foram inoculadas em cultivo celular na tentativa de obter um isolamento viral. Esse trabalho obteve aprovação do CEUA/IEC sob o registro nº 13-2021, certificado nº 21_2021.

2.2 MACERAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de fígado foram previamente maceradas, em solução de PBS (Solução de Tampão Fosfato Salino) contendo penicilina e estreptomicina (1,5mL), levadas ao tissulaser na frequência de 3.000 rpm por 2 minutos. Após esse processo foram armazenadas em -70 °C, para posterior inoculação.

2.3 CULTIVO CELULAR

A linhagem IMR-32, advinda de neuroblastoma humano foi cedida pelo Laboratório de Isolamento Viral da SAARB-IEC. A metodologia de cultivo utilizada foi baseada nas técnicas de PERES, Carmem Maldonado. et al, 2005, com algumas modificações.

As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com glutamina (2mM), bicarbonato de sódio (3 mM), penicilina/estreptomicina (10 4 UI/mL), fungizona (2,5 mg/mL) e 10% de soro fetal bovino (SFB) para o crescimento celular, sendo utilizado apenas 5% para a manutenção.

O repique celular foi realizado a cada 7 dias, a partir do uso de tripsina/EDTA, que foi adicionada à garrafa de cultivo celular, após o meio ser desprezado e a monocamada lavada duas vezes com PBS. A manutenção das células com meio acrescido de 5% de SBF ocorreu a cada dois dias. As garrafas foram mantidas a 37°C sob atmosfera úmida de 95% de H₂O e 5% de CO₂.

2.4 INOCULAÇÃO

A inoculação foi realizada em tubos de poliestireno 16 x 125mm estéreis com tampa em rosca, contendo células da linhagem IMR-32. E outras em placas de 24 orifícios, utilizando-se da mesma metodologia para o preparo das concentrações celulares para os modelos experimentais.

Para o preparo de tubos e placas foi realizada a contagem de células a fim de obter $1,5 \times 10^5$ de celular/mL.

3 RESULTADOS

3.1 CONCENTRAÇÃO CELULAR DE IMR-32 PARA EXPERIMENTOS

Algumas concentrações celulares foram testadas através da metodologia descrita no item 3.4, na qual foram avaliadas o grau de confluência e a morfologia celular. Dentre as concentrações testadas a $1,5 \times 10^5$ células/mL foi a que demonstrou melhores resultados.

Para a realização dos experimentos foi utilizada a monocamada formada após o período de 72 horas, por demonstrar confluência, próxima a 85%.

Figura 01: Células linhagem IMR-32 em diferentes períodos.



Figura A IMR-32 após 24 horas, B após 48 horas e C após 72 horas. Fonte: Autor, 2022.

3.2 INOCULAÇÃO CELULAR

Realizou-se a inoculação das 75 amostras de pequenos roedores pré-selecionadas, sendo 33 oriundas de sangue e 32 de fígado.

Dentre as amostras inoculadas, 23 apresentaram alteração na morfologia da monocamada celular (Gráfico 01) como demonstrado na figura 2 B e C, sendo que 11 amostras apresentaram alteração em IMR-32 no terceiro dia pós-inoculação (dpi) e 12 no quarto dpi. As amostras sugestivas de infecção por poxvírus foram encaminhadas ao ensaio de Imunofluorescência Indireta (IFI).

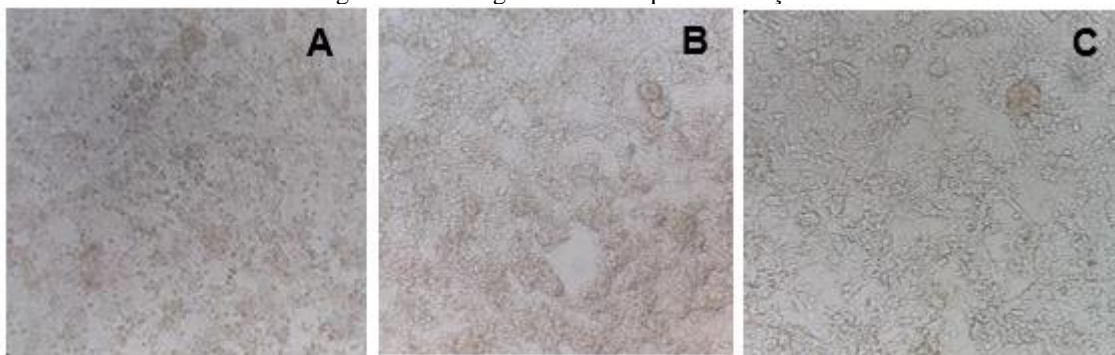
No controle positivo (B) foi possível visualizar além de grumos celulares, vacúolos na monocamada e o descolamento celular em algumas áreas.

Gráfico 01: Relação das inoculações.



Em azul escuro o total de amostras inoculadas e em azul claro somente aquelas que quando inoculadas apresentaram alterações na morfologia da linhagem celular. **Fonte:** Autor, 2022.

Figura 02: Linhagem IMR-32 após inoculação.



Controle negativo (A), controle positivo (B) e amostra com ECP (C) na linhagem IMR-32. Fonte: Autor, 2022.

4 DISCUSSÃO

Os roedores desempenham um papel importante nos ecossistemas onde estão inseridos e podem trazer benefícios a população humana por contribuírem com a dispersão de sementes ou arejamento dos solos, favorecendo a agricultura. Entretanto, também são assunto relevante em termos de saúde pública por constituírem reservatórios assintomáticos, tornando-os vetores primordiais de doenças infecciosas (NÚNCIO et al., 2019). Com base nesta realidade, o presente trabalho adotou a utilização de amostras advinda apenas de roedores na tentativa de isolamento viral, assim como os trabalhos de PEREIRA (2014) e CHAU (2017) os quais selecionaram roedores na tentativa de isolar outras espécies virais como *Hantavírus*.

Os membros da família *Poxviridae* tem causado doenças humanas ao longo do tempo. Normalmente circulam em animais silvestres como roedores e macacos, sendo de fundamental importância a vigilância epidemiológica para evitar que doenças por esses agentes tomem grandes proporções, atingindo inclusive o homem (SRINIVASAN., 2022).

Em 2022, surgiram casos em países que não eram considerados endêmicos para a varicela, doença causada por poxvírus, mais especificamente o *Monkeypox virus* (SRINIVASAN, Kritika., 2022; DE MENEZES FILHO, 2022b). O primeiro caso importado no Brasil foi confirmado em 9 de junho de 2022, e em pouco mais de um mês já havia 813 casos confirmados e transmissão comunitária registrada no país (BOING et al., 2022). O atual surto de *Monkeypox virus* em regiões não endêmica ilustra a vulnerabilidade humana, talvez devido ao enfraquecimento da imunidade de proteção cruzada derivada da varíola e vacinação em uma era pós-erradicação (SRINIVASAN., 2022).

Além disso, também demonstra a fácil transmissibilidade de humano para humano pelo contato direto com lesões (GUARNER et al., 2022). Casos como esse enfatizam a importância da realização de tentativas de isolamento e identificação viral para a vigilância epidemiológica.

Em vista disso, compreender o comportamento e epidemiologia desses agentes em animais silvestres, sendo macacos ou roedores, é de grande valia, pois essas informações podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias robustas para gerenciar essas doenças virais e prevenir futuros surtos (SRINIVASAN, Kritika., 2022).

As linhagens comumente utilizadas para isolamento viral são C6/36 (*Aedes albopictus*) e VERO (*Chlorocercus sabaues*) (Ribeiro et al., 2018). Porém, se faz necessário a tentativa de isolamento em outras linhagens a fim de ampliar o número de modelos experimentais e auxiliar no diagnóstico. Em um trabalho realizado por Yura et al (1986) utilizando-se a linhagem IMR-32 para o isolamento do vírus herpes simplex tipo 2 (HSV-2), verificou-se que a melhor concentração celular para atingir a confluência no período de 48 horas foi de 4×10^5 células/mL, o que diverge do resultado obtido no presente trabalho uma vez que após a testagem de diferentes concentrações observou-se a concentração $1,5 \times 10^5$ células/mL como a mais promissora para estudos experimentais.

Outros trabalhos como o de LEE et al (2001) e de MOEHLENKAMP et al (1999) que utilizaram as concentrações $2,5 \times 10^4$ células/mL e $2,5 \times 10^6$ células/mL, respectivamente; demonstrando uma divergência também entre trabalhos anteriores. Isto pode ser explicado devido a cinética celular, que pode mudar de acordo com as condições as quais são submetidas como quantidade de CO₂, manutenção da temperatura e quantidade de repiques celulares realizados.

DE SOUZA et al (2021), utilizou a linhagem celular VERO para isolar um poxvírus, demonstrando resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho, no que diz respeito as características observadas a partir da microscopia óptica, ou seja, a cultura celular apresentou, após a infecção, alterações morfológicas como células arredondadas, vacúolos de formação na

monocamada, além do descolamento em alguns casos, a maioria ocorrendo após o período de 2 dias de infecção. Na linhagem IMR-32 algumas amostras apresentaram estas características após 3 dias de infecção e outras somente após o quarto dia, embora o título viral em ambas as linhagens tenha sido o mesmo utilizado.

O comportamento viral em diferentes linhagens diverge devido as características particulares de cada uma. A linhagem VERO, é altamente susceptível à infecção viral, devido à ausência ou alteração no gene do interferon, gerando altas cargas virais (EMENY., 1979), fato que pode explicar a diferença de dpi entre ambas as linhagens.

Partindo do pressuposto de uma infecção por poxvírus, realizou-se um teste de IFI para confirmar tal infecção, para isto utilizou-se um anticorpo policlonal, previamente testado em outros trabalhos (DE SOUZA., 2021). Entretanto, as reações de IFI se apresentaram padrão fraco de fluorescência.

A mesma metodologia já fora empregada em diferentes linhagens nas mesmas condições utilizadas no atual estudo. Como no trabalho de DE SOUZA et al (2021), que realizou a IFI em células VERO e neuronal primária para confirmar a presença de antígenos contra o BEAN 58058, o que diverge dos resultados obtidos no atual trabalho. Portanto, sugere-se que a linhagem IMR-32 não seja o modelo ideal para o isolamento de poxvírus.

Ainda que no presente trabalho não houve a confirmação de infecção de roedores por poxvírus. Enfatiza-se a importância da vigilância epidemiológica de tais agentes na região amazônica, uma vez que os dois poxvírus isolados em território brasileiro sucederam de roedores, sendo eles o vírus Cotia e BeAn 58058 ((FONSECA, F. G. et al., 1998).

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou a importância da vigilância visando o controle e prevenção de casos zoonóticos de poxvírus, na região Norte do país, sobretudo no estado no Pará, o qual apresenta densas áreas florestais com inúmeras espécies de animais que podem vir a ser reservatórios de tais agentes.

No contexto mundial, o acompanhamento e identificação de poxvírus que podem desencadear novos surtos ou agravar o surto atual, é de grande relevância, uma vez que está claro o potencial de transmissão desse vírus.

A linhagem celular utilizada apesar de demonstrar ECP, a eficiência foi menor quando comparada a estudos prévios com outra linhagem celular. Condizente com o padrão obtido nas reações de IFI, demonstrando que talvez essa linhagem celular não seja o modelo ideal para a replicação do poxvírus.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, Theolis; BARRAL-NETTO, Manoel. Challenges in the research and development of new human vaccines. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, p. 103-108, 2013.
- BOING, Alexandra Crispim et al. Monkeypox: o que estamos esperando para agir?, **Revista Brasileira de Epidemiologia**. 2022; 25: e220020.
- CHAU, Ramalho Maximiano et al. **Evidência sorológica e molecular de Hantavírus em Pacientes com Síndrome Febril Agudo atendido no Centro de Saúde Polana Caniço durante o período de 2012-2014**. 2017. Tese de Doutorado.
- DOMINGOS, Iago José da Silva; OLIVEIRA, Jaqueline Silva et al. "Twenty Years after Bovine Vaccinia in Brazil: Where We Are and Where Are We Going?" **Pathogens** 10, no. 4: 406. <https://doi.org/10.3390/pathogens10040406>, 2021.
- EMENY, Jean M.; MORGAN, Michael J. Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. **Journal of General Virology**, v. 43, n. 1, p. 247-252, 1979.
- FONSECA, F. G. et al. Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. **Archives of virology**, v. 143, n. 6, p. 1171-1186, 1998.
- GUARNER, Jeannette; DEL RIO, Carlos; MALANI, Preeti N. Monkeypox in 2022-what clinicians need to know. **Jama**, v. 328, n. 2, p. 139-140, 2022.
- JUNIOR, Magno Rogério Silva Correia; DA SILVA, Blianni Ribeiro; TREVISAN, Márcio. Importância das vacinas da produção a vacinação como garantia no cuidado a saúde Importance of vaccines from production to vaccination as guarantee int health care. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 6, p. 24952-24968, 2021.
- LEE, Jong-Min et al. Phosphatidylinositol 3-kinase, not extracellular signal-regulated kinase, regulates activation of the antioxidant-responsive element in IMR-32 human neuroblastoma cells. **Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 23, p. 20011-20016, 2001.
- MCFADDEN, Grant. Poxvirus tropism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 201-213, 2005.
- MENEZES FILHO, A. C. P. de, VENTURA, M. V. A., ALVES, I., & Taques, A. S. (2022a). Monkeypox: World health emergency in 2022. *Brazilian Journal of Science*, 1(10), 5–11. <https://doi.org/10.14295/bjs.v1i10.180>.
- DE MENEZES FILHO, Antonio Carlos Pereira et al. Monkeypox cases in Brazil, a possible pandemic? **Brazilian Journal of Science**, v. 1, n. 10, p. 1-4, 2022b.
- MOEHLENKAMP, Jeffrey D.; JOHNSON, Jeffrey A. Activation of antioxidant/electrophile-responsive elements in IMR-32 human neuroblastoma cells. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 363, n. 1, p. 98-106, 1999.

NÚNCIO, Maria Sofia; ALVES, Maria João. Doenças associadas a artrópodes vetores e roedores. **Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2019.**

PEREIRA, Liana Strecht et al. **Avaliação da infecção por Hantavirus em amostras humanas e de roedores silvestres e sinantrópicos no Estado do Rio de Janeiro.** 2014. Tese de Doutorado.

PERES, Carmem Maldonado; CURI, Rui. Como cultivar células. In: **Como cultivar células.** 2005. p. 283-283.

PERES, Marina G. et al. Vaccinia virus in feces and urine of wild rodents from São Paulo State, Brazil. **Viruses**, v. 10, n. 2, p. 51, 2018.

PIGNATTI, Marta G. Saúde e ambiente: as doenças emergentes no Brasil. **Ambiente & sociedade**, v. 7, p. 133-147, 2004.

RIBEIRO, A. C. D. S., CARVALHO, C. A. M. D., CASSEB, S. M. M., RODRIGUES, S. G., VASCONCELOS, P. F. D. C., & CARVALHO, V. L. (2018). Perfis de infecção do vírus Mayaro e do vírus Chikungunya em linhagens de células de mamíferos e mosquitos. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, 9(4), 25-35.

SCHATZMAYR, Hermann G. et al. Infecções humanas causadas por poxvirus relacionados ao vírus vaccinia no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 672-676, 2009.

SRINIVASAN, Rajsri K, RAO, M. Poxvirus-driven human diseases and emerging therapeutics. **Ther Adv Infect Dis.** 2022 Nov 14; 9: 20499361221136751. doi: 10.1177/20499361221136751. PMID: 36406813; PMCID: PMC9666863.

WANZELLER, Ana Lucia Monteiro et al. Estudo Morfológico, Antigênico e Molecular do Poxvírus BeAn 58058 Isolado da Floresta de Utinga na Amazônia Brasileira. MIRANDA, A.M.M. In: **Pesquisa em saúde & ambiente na Amazônia: perspectivas para sustentabilidade humana e ambiental na região.** 332p, 2021.

YURA, Y. et al. A latent infection of herpes simplex virus type 2 in a human neuroblastoma cell line IMR-32. **Archives of virology**, v. 90, n. 3, p. 249-260, 1986.