

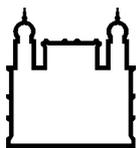
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Estudo histopatológico e molecular de embriões de
Gallus gallus domesticus (Linnaeus, 1758)
infectados com o vírus da Febre Amarela 17DD.**

PEDRO PAULO DE ABREU MANSO

Rio de Janeiro
Dezembro de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Pedro Paulo de Abreu Manso

Estudo histopatológico e molecular de embriões de *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus, 1758) infectados com o vírus da Febre Amarela 17DD.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado

RIO DE JANEIRO

Dezembro - 2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M289 Manso, Pedro Paulo de Abreu

Estudo histopatológico e molecular de embriões de *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus, 1758) infectados com o vírus da Febre Amarela 17DD / Pedro Paulo de Abreu Manso. – Rio de Janeiro, 2014.

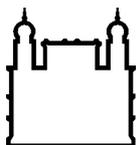
xii, 139 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2014.

Bibliografia: f. 118-127

1. Febre amarela. 2. Vírus 17DD. 3. Patologia. 4. Embrião de galinha. 5. Vacina. 6. *Gallus gallus*. I. Título.

CDD 616.91854



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Pedro Paulo de Abreu Manso

Estudo histopatológico e molecular de embriões de *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus, 1758) infectados com o vírus da Febre Amarela 17DD.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Myrna Cristina Bonaldo–Presidente (IOC - Fiocruz)

Prof. Dra. Ana Maria Bispo de Filippis (IOC - Fiocruz)

Prof. Dra. Samia Demachki (Faculdade de Medicina – UFPA)

Prof. Dra. Patricia Carvalho de Sequeira (IOC - Fiocruz)

Prof. Dr. Davis Fernandes Ferreira (UFRJ)

Rio de Janeiro, 19 de Dezembro de 2014

Dedico este trabalho à minha mãe querida, Rosângela de Abreu, que com muito carinho e sabedoria me conduziu até aqui.

AGRADECIMENTOS

Concluo mais essa etapa de minha vida acadêmica com a certeza de que “Até aqui me sustentou o Senhor”, por isso sou grato a Deus que me deu a vida e tudo o que tenho. Mas não caminhei sozinho, muitos me ajudaram nessa trajetória... Sou profundamente grato a muitas pessoas, sei que as palavras que discorrerei a seguir certamente não dão conta desse sentimento, mas guardo em mim a gratidão e a certeza de que sem vocês eu não chegaria até aqui.

Agradeço à minha família em especial minha mãe Rosângela a quem dedico esta tese, por ter sido exemplo, por ter doado sua vida por mim, por ter me conduzido pelos caminhos corretos, por me incentivar, e até por ficar com meus filhos e buscá-los na escola para que eu terminasse esse trabalho. Ao meu pai Pedro Paulo, meus avós Luiz Abreu e Hilda, ao Jorge, meus tios Tonio e Fátima, meus padrinhos Cristina e Luiz que lutaram e me orientaram para que eu tivesse uma educação digna e me incentivaram em todos os momentos. Agradeço a minha esposa por dividir comigo o peso do dia a dia para que eu terminasse esse trabalho, aos meus queridos filhos Rafael e Isabela pelo sorriso carinhoso que me faz caminhar a cada dia, pelo tempo que abriram mão de ficar comigo e passear para que eu me dedicasse ao trabalho. Meus queridos primos Emanuel e Gabriel e demais familiares por todo apoio e incentivo.

Sou profundamente grato a todos os meus professores de ontem e de hoje, desde o início de minha formação, em especial aos meus orientadores Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado, e Prof. Dra. Bárbara Cristina Euzébio Pereira Dias de Oliveira, que além de serem grandes amigos/irmãos, confiaram em mim e acreditaram que eu era capaz, quando nem eu acreditava, e por se doarem muito para que esse trabalho fosse concluído (vocês sabem o quanto sou grato a vocês!!!), meus ex-orientadores, Profa. Luzia Fátima Gonçalves Caputo, Profa. Dra. Denise Valle, Prof. Dr. Henrique Leonel Lenzi (*in memoriam*) e Profa. Dra. Lycia de Brito Gitirana, que em momentos diferentes dessa caminhada me ajudaram, incentivaram, ensinaram, e imprimiram em mim um pouco de suas características.

Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Patologia do IOC que me ajudaram, formaram, e fizeram os meus dias mais divertidos (não vou citar nomes...

tenho medo de esquecer alguém), em especial a Luciana, Luzia Barros, Luzia Caputo, Marcia Terra, Pricila Guedes, Izabella Gonçalves e meus alunos Yuli, Igor e Jéssica, que colocaram a mão na massa junto comigo.

Sou grato também à Prof. Dra. Myrna Bonaldo e à Prof. Dra. Patrícia Sequeira que compraram a ideia deste projeto e deram um grande apoio moral, intelectual e financeiro em um momento difícil do andamento deste trabalho. Ao grupo do laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus que sempre me receberam de portas abertas e contribuíram muito com essa tese. Muito obrigado a Clara Soares Viga, Carlos Frota e Marcelo de Oliveira, por serem acima de tudo FIOCRUZ! Sem o apoio de vocês com certeza esse trabalho não aconteceria, sou grato pela ajuda gratuita que vocês me deram.

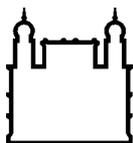
Muito obrigado aos amigos Prof. Dr. Carlos Logullo e a Marcelle Uhl por permitirem que eu utilizasse o microscópio confocal da UENF. Aos amigos do setor de Produção e Tratamento de Imagens em especial Rodrigo Mexas pelo tratamento das imagens para o artigo, Leonardo Perim e Leonardo Cinilha por salvar meu computador em vários momentos desse trabalho. A Prof. Dra. Rita Nogueira e Prof. Dra. Flávia Barreto do Laboratório de Flavivírus por serem solícitas em me ajudar e ceder o anticorpo contra febre amarela.

Sou grato ao centro de microscopia da Carl Zeiss em Munique em especial ao Ylmas Niyaz e Sebastian pelo apoio com a utilização do microscópio de super-resolução. Ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde PDTIS – FIOCRUZ pela utilização da plataforma de sequenciamento de DNA. À FAPERJ e à CAPES que financiaram esse projeto. E, finalmente, ao povo Brasileiro que com seus impostos financiou os estudos de um “filho teu” desde a classe de alfabetização até o Doutorado, espero ao longo da vida retribuir com honra. MUITO OBRIGADO !!!!

“Desde o primeiro dia que nos foi facultado admirar o panorama encantador que se divisa quando se coloca os olhos na ocular de um microscópio, sobre cuja platina está uma preparação; desde que vimos com o auxílio deste instrumento maravilhoso os numerosos seres vivos que povoam uma gota de água; enraizou-se em nosso espírito a ideia de que os nossos esforços intelectuais de ora em diante convergiriam para que nos instruíssemos, nos especializássemos numa ciência que se apoiasse na microscopia.”

“Não esmorecer para não desmerecer”

Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

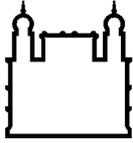
Estudo histopatológico e molecular de embriões de *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus, 1758) infectados com o vírus da Febre Amarela 17DD.

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Pedro Paulo de Abreu Manso

A vacina contra febre amarela é produzida a partir da inoculação do vírus atenuado 17DD em ovos embrionados de galinha. Esta vacina é extremamente eficaz e segura, gerando imunidade que pode perdurar por até trinta e cinco anos. Embora a replicação deste vírus em embriões de galinha seja utilizada desde 1937, pouco se sabe sobre os aspectos da infecção nestes embriões, especialmente que órgãos, tecidos e células são responsáveis pela replicação viral. Nesse trabalho, analisamos embriões de galinha (*Gallus gallus*) infectados pelo vírus da FA 17DD em diferentes tempos de infecção (24, 48, 72 e 96 horas) conforme as condições empregadas na produção de vacina na Fiocruz. Identificamos o vírus da Febre Amarela através de imunofluorescência em diferentes tecidos, correlacionamos a presença deste agente infeccioso às pequenas reações histopatológicas observadas nos tecidos, validamos essa detecção pela confirmação do material genético viral e seu sequenciamento, e confirmamos que este vírus replica na região onde foi identificado pela presença de seu intermediário replicativo. Nesse sentido observamos que as alterações histopatológicas que ocorrem nos embriões de galinha infectados pelo vírus FA 17DD se apresenta branda e sistêmica ao longo do tempo analisado. Nossos dados apontam que as primeiras células a manifestar a infecção são mioblastos com aspecto mesenquimal que puderam ser observados no coração e no músculo esquelético a partir de 48 horas de infecção. Após 72 horas, o vírus FA 17DD replica em células do músculo esquelético, cardiomiócitos, células da glia e neurônios, no epitélio tubular renal, parênquima pulmonar e fibroblastos. Nossos dados permitem sugerir o tecido muscular esquelético como um local privilegiado na produção das partículas virais. Após 96 horas a infecção se torna mais intensa no sistema nervoso e se mantém nos mesmos níveis nos demais tecidos já infectados. O conjunto de dados gerados nesse trabalho contribui para elucidar aspectos importantes sobre a patologia da febre amarela em embriões de galinha, e evidenciar os tecidos e células responsáveis pela produção do vírus FA 17DD nestes embriões. Estes dados podem ser úteis na compreensão e formulação de novas estratégias de produção da vacina, além de impactar no desenvolvimento de estratégias baseadas no uso do vírus FA 17DD como plataforma de produção para outras vacinas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Histopathological and molecular study of *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus, 1758) chicken embryo infected with Yellow Fever Virus 17DD strain.

ABSTRACT

PHD THESIS IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Pedro Paulo de Abreu Manso

Yellow fever vaccine is produced from the inoculation of attenuated virus YF 17DD in embryonated chicken eggs. This vaccine is extremely effective and safe, generating immunity that can persist across up to thirty-five years. Although replication of this virus in chicken embryos is used since 1937, little is known about aspects of infection in these embryos, especially that organs, tissues and cells are responsible for viral replication. In this study we analyzed chicken embryos (*Gallus gallus*) infected in vaccine production (Biomanguinhos) with YF 17DD virus in different times post infection (24, 48, 72 and 96 hours). Here it was possible to detect the Yellow Fever Virus by immunofluorescence, to correlate this presence with tiny tissue reactions, to validate it by genomic RNA detection and to sequence it in the same studied area, confirming that this virus is replicated in these regions by the replicative intermediate detection. In this thesis the histopathological changes that occur in chicken embryos infected by YF 17DD virus during the production of yellow fever vaccine were observed in a kinetic way. We observed that the infection in these embryos presented itself mild and systemic. Our data show that the first cells which express infection are myoblasts with mesenchymal shape that could be observed in the heart and skeletal muscle at 48 hours of infection. After 72 hours the yellow fever virus 17DD replicates mainly in skeletal muscle cells, cardiomyocytes, glial cells and neurons, but also in the renal tubular epithelium, lung parenchyma and fibroblasts. Our findings suggested skeletal muscle tissue as a main place in the production of viral particles. After 96 hours the infection becomes more intense in the nervous system and is maintained at the same levels in other tissues already infected. The data generated in this study contributes to elucidate important aspects of the yellow fever pathology in chicken embryos, and elucidate the tissues and cells responsible for YF 17DD virus production in this model. Our data may be helpful in the understanding and design new strategies of vaccine production, and impact in development of strategies based on the use of the virus YF 17DD as a platform for other vaccines production.

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Vírus da Febre Amarela	4
1.2. Quadro Clínico da febre amarela	10
1.3. Patologia da febre amarela	13
1.4. Epidemiologia da febre amarela.....	20
1.5. Vacina contra febre amarela	26
1.6. O modelo <i>Gallus gallus</i>	37
1.7. Desenvolvimento embrionário em <i>Gallus gallus</i>	42
2. Objetivos	47
2.1. Objetivo geral	47
2.2. Objetivos específicos.....	47
3. Artigo I	48
4. Artigo II	76
5. Discussão	99
6. Perspectivas	114
7. Conclusões	116
8. Referências Bibliográficas	118

Índice de Figuras

Figura 1-1 - Esquema do genoma do Vírus da Febre Amarela, da poliproteína formada após a tradução e das proteínas virais.....	5
Figura 1-2 - Estrutura dos dímeros de proteína do Envelope.....	7
Figura 1-3 - Esquema da estrutura do Vírus da Febre Amarela nas formas imatura e infecciosa.	7
Figura 1-4 - Esquema da biossíntese de partículas virais pelas células infectadas. .	10
Figura 1- 5 - Distribuição das formas clínicas da febre amarela.....	11
Figura 1- 6 - Fases clínicas da forma clássica da febre amarela.	13
Figura 1- 7 - Esquema da Patogênese da febre amarela.....	15
Figura 1- 8 – Aspecto histopatológico de fígado humano de paciente com febre amarela.	17
Figura 1- 9 - Ácino hepático evidenciando as zonas do lóbulo. As lesões dos hepatócitos ocorrem preferencialmente na zona 2.....	17
Figura 1- 10 Ciclos biológicos da febre amarela.	21
Figura 1- 11 Áreas de risco de transmissão da febre amarela no mundo.....	23
Figura 1- 12 Mapa da distribuição espacial das epizootias de primatas não humanos (PNH) e casos humanos de febre amarela, de acordo com o município de local provável de transmissão.....	25
Figura 1- 13 Fluxo de produção da vacina de febre amarela em BioManguinhos.....	32
Figura 1- 14 Gráfico representando ao longo do tempo os principais eventos de uma resposta imunológica padrão ao vírus FA 17DD.....	34
Figura 1-15 Esquema do embrião de <i>Gallus gallus</i> indicando os principais anexos embrionários.....	44

1. Introdução

A febre amarela é uma doença de etiologia viral transmitida por mosquito, associada à infecção por um flavivírus que acomete populações presentes nas regiões tropical da América do Sul e Sub-Sahariana da África. A infecção pelo vírus da febre amarela pode ser subclínica ou abortiva, com sintomas semelhantes à gripe, ou causar uma doença pansistêmica que acomete o fígado, rins e miocárdio, associada a hemorragia e choque, causando uma mortalidade, em sua forma grave, superior a 50%. Não existem antivirais para o tratamento desta doença, sendo a única forma de controle o tratamento preventivo, baseado na vacinação em massa das populações humanas residentes em área de risco (1, 2).

A vacina contra febre amarela foi desenvolvida a partir da amostra Asibi, isolada em Ghana, em 1927. Inicialmente, obteve-se a amostra febre amarela 17D (FA 17D), que se apresentou atenuada para humanos, através de passagens seriadas em culturas de tecido de galinha. Duas sub-amostras foram, independentemente derivadas a partir da FA 17D, denominadas 17D-204 e 17DD. A 17D-204 foi produzida na passagem 204 em tecidos de embrião de galinha, enquanto a 17DD foi obtida a partir de passagem da amostra 17D em tecido embrionário de galinha, e subsequentemente a passagem 281 em ovos embrionados de galinha (3). A amostra FA 17DD foi empregada pela primeira vez no Brasil em 1937. Desde então, vem sendo produzida pela Fundação Oswaldo Cruz e, a partir de 1976, em sua unidade técnico-científica - Bio-Manguinhos - único laboratório nacional produtor desta vacina. A vacina é produzida a partir da amostra 17DD do vírus da Febre Amarela inoculada em ovos embrionados de galinha livres de patógenos específicos (SPF), de acordo com as normas estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde. Aproximadamente 500 milhões de doses da vacina contra febre amarela foram administradas em todo o mundo desde a introdução do sistema de lote-

mente em 1945, com mais de 98% de proteção efetiva por pelo menos dez anos (4).

Apesar da disponibilidade desta vacina altamente eficiente, a febre amarela permanece como uma importante causa de morbidade e mortalidade nas regiões tropicais da África e da América do Sul (5). Isto se deve, em especial, às pessoas que residem em áreas endêmicas ou epizooticas e viajantes não vacinados. Além disso, a vacina é contraindicada em uma série de situações, tais como: pacientes com alergia a ovo ou outro componente da vacina, mulheres grávidas ou em período de amamentação, menores de 6 meses ou maiores de 60 anos, pacientes com SIDA, pacientes que receberam transplante de órgãos, portadores de imunodeficiência primária, imunossuprimidos, portadores de neoplasias malignas e pacientes com histórico de doença tímica (6). Embora a vacina anti-amarela seja de grande eficiência e segurança, casos de doenças viscerotrópica e neurotrópica associados à vacina têm ocorrido, em especial em pacientes com imunodeficiências ou idosos (7). Nestes casos, o percentual de óbitos pode chegar a 65%. Isto se torna mais grave pela carência de conhecimento no que se refere à patologia e à patogênese humana, que são descritas de forma fragmentada, permanecendo ainda obscuros os distúrbios fisiológicos que levam alguns pacientes à forma grave da doença e ao óbito (8).

Embora os embriões de galinha sejam utilizados desde 1937 como fonte para a produção de vírus da Febre Amarela (9), as bases histopatológicas e moleculares que regulam a infecção viral neste sistema biológico ainda não são bem compreendidas. Não há descrição em literatura de quais são as células responsáveis pela biossíntese de partículas virais durante a infecção de embriões de galinha inoculados com a amostra FA 17DD. A determinação destas células ampliaria as possibilidades de desenvolvimento de uma vacina baseada em cultura de células, e conseqüentemente com menor teor de proteínas do sistema biológico produtor.

Essa compreensão se torna mais relevante, uma vez que dados recentes apontam a possibilidade de utilização dos vírus FA 17DD como

plataforma de produção de outras vacinas. Estes vírus tem se mostrado eficientes como vetores virais recombinantes de proteínas de outros flavivírus, como os vírus da encefalite japonesa, do oeste do Nilo e da dengue, e de outros organismos não relacionados, tais como *Plasmodium yoelli* e *Trypanosoma cruzi* (10-12).

Este trabalho foi desenvolvido com o intuito de elucidar, ao menos em parte, as bases histopatológicas e moleculares que regulam a infecção em *Gallus gallus* utilizados para a produção da vacina contra febre amarela, identificar o(s) tecido(s) ou célula(s) responsável(eis) pela produção viral, e ampliar os conhecimentos existentes sobre este sistema biológico. Este estudo irá também contribuir com o avanço do conhecimento das peculiaridades histopatológicas envolvidas na patogênese da febre amarela de maneira a corroborar com o esclarecimento de pontos ainda duvidosos ou não totalmente elucidados, na patogênese em humanos.

1.1. Vírus da Febre Amarela

O vírus da Febre Amarela é um arbovírus cuja partícula viral mede cerca de 50nm de diâmetro, é envelopada, com genoma de RNA de fita simples e polaridade positiva. Este vírus é o protótipo do gênero Flavivírus, o qual inclui setenta vírus, em sua maioria com importância médica, como o Vírus da Dengue, o Vírus do Oeste do Nilo e o Vírus da Encefalite Japonesa (13, 14).

Estudos de epidemiologia molecular sugerem que o Vírus da Febre Amarela surgiu há cerca de mil anos na África, onde possui maior variabilidade genética com quatro genótipos distintos (13). Provavelmente, o vírus surgiu no leste africano, de onde se disseminou para a região central e para o oeste. Do oeste africano, com o tráfico de escravos, o vírus chegou à América, onde existem dois genótipos (13, 14).

O RNA genômico, com cerca de 10,8 Kb, é capeado na extremidade 5', não possui poliadenilação na extremidade 3' e em ambas possui regiões não traduzíveis UTR's, que flanqueiam uma única região aberta de leitura (ORF). A tradução do material genético gera uma poliproteína precursora que é clivada durante e após a tradução em dez proteínas funcionais, divididas em estruturais e não estruturais. As três proteínas estruturais são: a do capsídeo (C), a precursora da proteína de membrana (prM) e a do envelope (E). As sete proteínas não estruturais são denominadas pela sigla NS seguida de um número, sendo estas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (13, 19) (Figura 1-1).

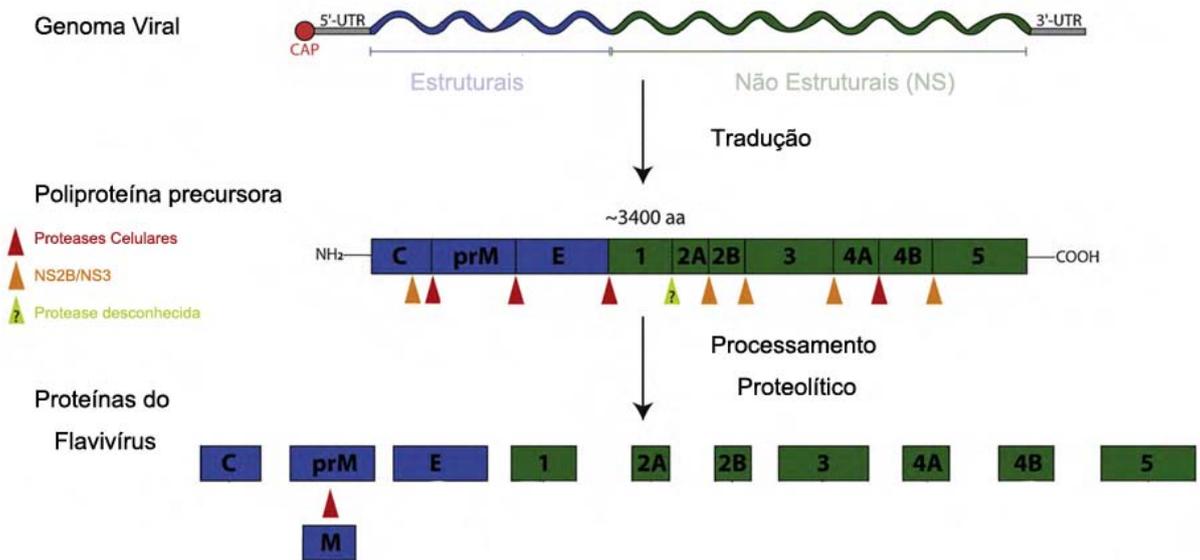


Figura 1-1 - Esquema do genoma do Virus da Febre Amarela, da poliproteína formada após a tradução e das proteínas virais. Adaptado de Pastorino *et al.*, 2010 (2)

As proteínas não estruturais desempenham diversas funções na replicação e produção de novos vírus. NS1 é uma glicoproteína de cerca de 46kDa envolvida principalmente na replicação do material genético viral. Esta proteína pode ser encontrada no interior da célula e na superfície celular aderida à membrana plasmática. NS1 é ainda secretada pela célula, gerando forte resposta humoral no organismo (19). É descrito que anticorpos do hospedeiro reconhecem células que apresentam esta proteína na superfície e as eliminam por fagocitose e *clearance* via receptor Fc- γ (4, 19). NS2A é uma pequena proteína hidrofóbica de 22 kDa, multifuncional, envolvida na replicação do RNA viral, no rearranjo de membrana para a formação do envelope viral e na regulação do sistema imune inato (2). A proteína NS2B é uma pequena proteína de 14 kDa, que age como cofator da proteína NS3, que, por sua vez, é uma grande enzima de 70 kDa, multifuncional, envolvida principalmente na clivagem da poliproteína e na replicação do RNA viral. Esta proteína possui atividade de serinoprotease, helicase e RNA 5` trifosfatase (19). NS4A é uma pequena proteína com cerca de 16 kDa, hidrofóbica, associada à membrana do retículo endoplasmático (RE), que está envolvida na

replicação do genoma viral e no rearranjo da membrana para formação do complexo de replicação (2). A proteína NS4B é hidrofóbica, possui 27 kDa, está envolvida com a replicação do material genético do vírus, além de bloquear a ativação de interferon pelo bloqueio da via de STAT-1(20). NS5 é uma grande proteína de 103 kDa essencial para a replicação do genoma viral, e tem as funções de RNA polimerase, RNA dependente e de metiltransferase (2, 19).

A proteína do capsídeo (C) é altamente básica, formada por 120 aminoácidos, com peso molecular de 11 kDa. Sua estrutura é composta por quatro hélices ($\alpha 1 - \alpha 4$) conectadas por pequenas alças. Em solução, estas proteínas formam dímeros, de forma que as hélices $\alpha 2$ e $\alpha 4$ de um monômero estejam em posição antiparalela às hélices $\alpha 2$ e $\alpha 4$ do monômero vizinho. Estes dímeros formam blocos que se montam envolvendo o material genético formando o nucleocapsídeo. Possui resíduos carregados positivamente nas porções $\alpha 1$ e $\alpha 4$ que sugerem que esta proteína interaja com RNA de forma semelhante às histonas. Regiões hidrofóbicas expostas da hélice $\alpha 2$ facilitam a ligação do nucleocapsídeo à membrana lipídica (19, 21).

A proteína de membrana (M) é uma glicoproteína, que quando traduzida se apresenta em uma forma precursora chamada prM de 160 aminoácidos (26 kDa). Logo após a tradução essa proteína forma um heterodímero com a proteína do envelope. É descrito que PrM tem importante função como chaperona na montagem e dobramento da proteína E (22). A clivagem de prM em M ocorre pela ação de furinas residentes no Complexo de Golgi, e coincide com a maturação do vírus na via secretória. Após a clivagem, a proteína apresenta 75 aminoácidos e a porção clivada é secretada (19).

A proteína do envelope (E) é uma glicoproteína com 495 aminoácidos (53 kDa). Sua estrutura rica em folhas beta se apresenta sob a forma de um homodímero, no qual cada monômero possui três domínios. Um domínio central, na região N terminal, chamado I, flanqueado por um lado pelo domínio II, que possui um peptídeo de fusão na sua porção distal e por outro lado pelo peptídeo III, o qual possui um domínio semelhante a uma imunoglobulina, onde estão situados os sítios de ligação aos receptores celulares (21). Os

homodímeros formam-se pela ligação do peptídeo de fusão do domínio II de um monômero com o domínio III do monômero adjacente (Figura 1-2). Nos vírus imaturos os dímeros de proteína E estão ligados à proteína prM formando um trímero em forma de espinho, que confere à superfície do vírus uma aparência irregular. Nesta estrutura, a proteína prM forma um “cobertura protetora (*cap*)” sobre os peptídeos de fusão que estão na parte mais externa da proteína E. Já na forma madura, após a clivagem da prM em M, o fragmento proteico “pr” se dissocia dos dímeros de E, que se organizam longitudinalmente a membrana do envelope viral, conferindo uma superfície lisa à partícula viral. Somente após este processo de maturação do virion, a proteína E adquire conformação própria para as etapas de interação, internalização e subsequente fusão com as membranas da vesícula endocítica celular (4, 21) (Figura 1-3).

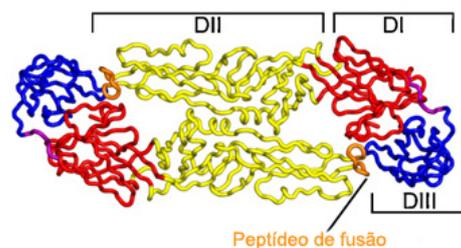


Figura 1-2 - Estrutura dos dímeros de proteína do Envelope. Adaptado de Heinz & Stiasny, 2012 (4).

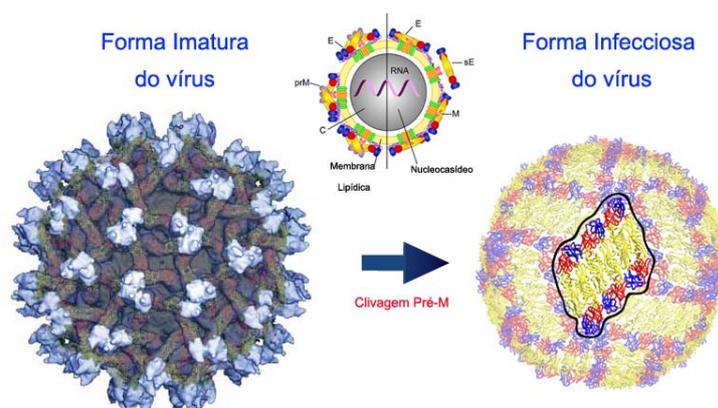


Figura 1-3 - Esquema da estrutura do Vírus da Febre Amarela nas formas imatura e infecciosa. Adaptado de Heinz & Stiasny, 2012 e Suchetana et al. 2005 (4, 21).

O vírus da Febre Amarela é produzido experimentalmente por células de diversas origens, tais como mosquitos, carrapatos, aves e mamíferos. Em mamíferos, linhagens de diversos órgãos e animais são susceptíveis à infecção, tais como rins de hamster (BHK), de macacos (VERO, CV-1, MA-104, LLC-MK2), porco (PS-1), além de adenocarcinoma humano (SW-13), células de linfoma humano (U937), células mononucleares humanas e cordão umbilical (HUVEC) (8, 23). Em aves, culturas primárias de fibroblastos de embriões de galinha e pato também são capazes de replicar o vírus (8, 24). Em infecções naturais, nos hospedeiros vertebrados, os vírus infectam principalmente células dendríticas, hepatócitos, cardiomiócitos e células epiteliais do túbulo renal.

As etapas de internalização, biossíntese e liberação do vírus da Febre Amarela na célula hospedeira não são bem conhecidas. Diversos trabalhos versam sobre o tema em diferentes Flavivírus. Admite-se por consenso que estas etapas são comuns a todos os Flavivírus. Uma vez na superfície da célula o vírus adere a receptores, através de sítios de ligação da proteína do envelope e em seguida é endocitado pela via das clatrininas. O endossoma primário é gradualmente acidificado, disparando um gatilho de trimerização da proteína E. Em pH ácido, os dímeros de proteína E se dissociam e em seguida, se rearranjam em trímeros, expondo o peptídeo de fusão que se liga a membrana do endossoma. Após a fusão o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma da célula, onde ocorre a dissociação da proteína C do RNA viral (4, 21) (Figura 1-4).

Devido ao seu papel preponderante na fusão do envelope viral à membrana da vesícula endocítica, além de mediar a interação com a superfície celular, a proteína do envelope é o principal alvo de anticorpos neutralizantes na imunidade ao vírus. Estudos em camundongos sugerem que anticorpos contra o domínio III da proteína E possuem maior poder de neutralização (4).

Uma vez livre no citoplasma, imediatamente se inicia a tradução do RNA viral. Como o material genético do vírus é de polaridade positiva, este é diretamente traduzido por ribossomas da célula hospedeira, produzindo assim a poliproteína precursora viral. Peptídeos de sinalização direcionam o

complexo de tradução para o retículo endoplasmático, onde começam a ser sintetizadas as primeiras proteínas envolvidas na replicação do material genético e na produção de novos vírus. A replicação do genoma viral é realizada pelas proteínas não estruturais codificadas pelo RNA viral e por fatores da própria célula. O início da replicação ocorre com a transcrição de um RNA de polaridade negativa, chamado intermediário replicativo, que servirá como molde para a transcrição de novos RNAs genômicos. A síntese de RNA é assimétrica, sendo o RNA positivo produzido de dez a cem vezes mais que o RNA negativo. A replicação do material genético viral forma vesículas com poros abertos para o citoplasma celular na superfície da membrana do retículo endoplasmático (19, 25) (Figura 1-4).

A clivagem da poliproteína é realizada por enzimas celulares e por aquelas codificadas pelo genoma viral. Peptidases celulares são responsáveis por clivar, no lúmen do retículo endoplasmático, as junções entre as proteínas: C/prM, prM/E, E/NS1, NS4A/NS4B. A serinoprotease NS3 e seu cofator NS2B são responsáveis por clivar, no citoplasma da célula, a região carboxiterminal da proteína C e as junções entre as proteínas: NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A e NS4B/NS5 (2, 19).

A montagem da partícula viral se dá na superfície do retículo endoplasmático quando várias cópias da proteína C se associam com uma cópia do RNA viral para formar o nucleocapsídeo. Este complexo se une aos heterodímeros de proteína E e prM para formar a partícula viral imatura. Esta se diferencia em diversos aspectos da partícula infecciosa, é maior em diâmetro e apresenta cerca de sessenta projeções em forma de espículas na superfície, formadas pelo trímero prM e E, como já citado anteriormente. A partícula imatura é então direcionada para o Complexo de Golgi, onde ocorre a clivagem de prM pela ação de furinas, e a consequente maturação do vírus (19, 21). As partículas virais são eliminadas pela via exocítica ou, quando o efeito citopático já é avançado, por lise celular (8) (Figura 1-4). A biossíntese destes componentes virais pelas células infectadas, somados à perda da função celular e às consequências da resposta imunológicas do organismo, levam a

uma série de sintomas que caracterizam a febre amarela, e que podem variar de acordo com o organismo e a amostra viral.

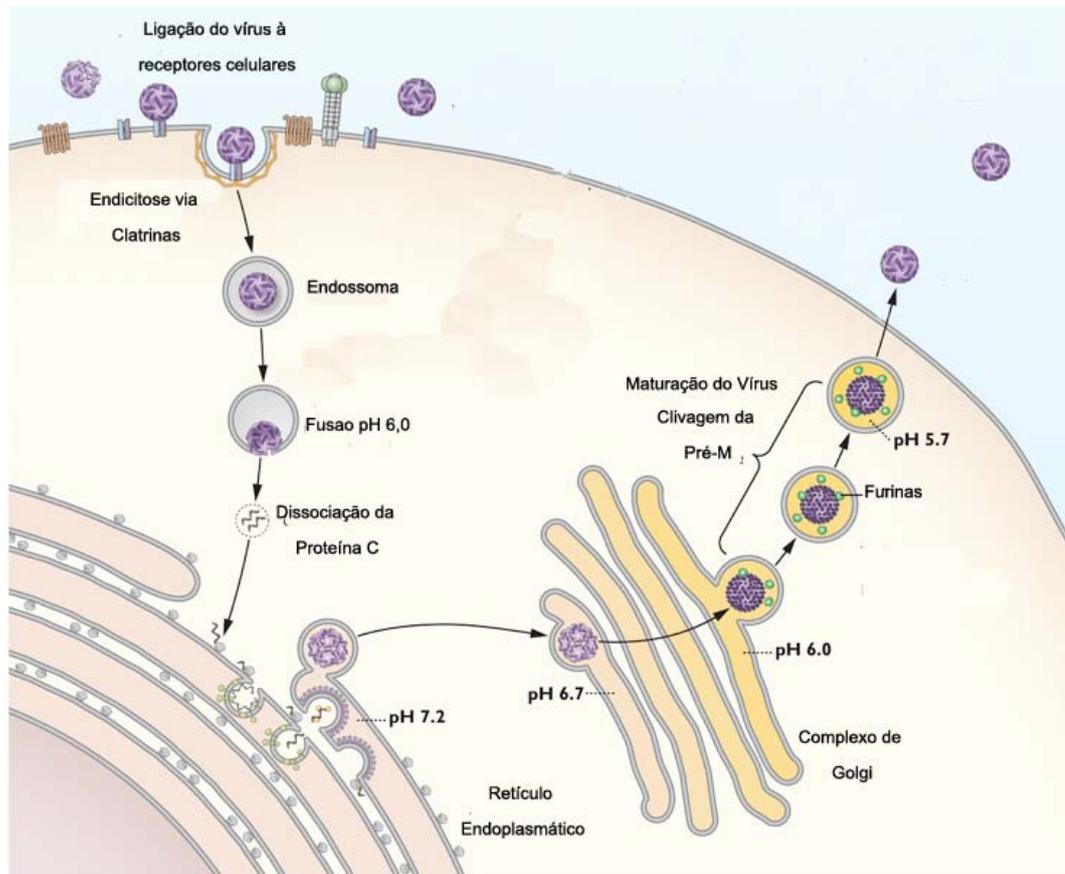


Figura 1-4 - Esquema da biossíntese de partículas virais pelas células infectadas. Adaptado de Pierson, 2014 (26)

1.2. Quadro Clínico da febre amarela

O quadro clínico da febre amarela é agudo e de curta duração, pode variar de assintomático ou subclínico até formas fulminantes. Somente entre 10 e 20% das infecções são graves e provocam em mais da metade destes casos óbito (27, 28) (Figura 1-5).

O período de incubação da doença pode variar em média de 3 a 6 dias podendo em alguns casos durar 10 dias. Após esse período, a viremia pode variar de 10^5 a 10^6 partículas infecciosas por mililitro de sangue, sendo suficiente para infectar novos mosquitos (27). Nas formas leves da doença os

sintomas são cefaleia discreta, fraqueza (astenia), tontura e febre leve ou moderada de início súbito. O paciente se recupera inteiramente após o curso da doença que pode durar entre algumas horas até dois dias (28).



Figura 1- 5 - Distribuição das formas clínicas da febre amarela. Fonte: Vasconcelos, 2003 (28).

Na forma moderada os sintomas citados anteriormente são mais intensos, a cefaleia é mais duradoura e a febre elevada só melhora com antitérmicos. Acompanhado da febre pode ocorrer bradicardia (sinal de Faget). Surgem também mialgia, artralgia e náuseas com ou sem vômito. Ao menos um dos sintomas como: epistaxe, ligeira albuminúria e icterícia podem ocorrer. Os sintomas perduram por dois a três dias e desaparecem sem deixar sequelas (28).

Nas formas graves, o quadro clínico tem início com cefaleia intensa e febre elevada acompanhada de bradicardia. A mialgia é generalizada e as náuseas são mais intensas e vêm acompanhadas de vômito. O paciente fica mais icterício, ocorrem hemorragias, especialmente sangramento uterino e hematêmese, a albuminúria é persistente podendo vir acompanhada de

oliguria. Estes sintomas podem desaparecer após três ou quatro dias nas formas graves abortivas ou durar entre cinco e sete dias (27, 28).

A forma maligna ou clássica apresenta um percurso que pode ser dividido em três fases distintas: 1) infecção, 2) remissão e 3) intoxicação, onde ocorre o óbito na maioria dos casos (8, 27, 28) (Figura 1-6). A doença surge com febre elevada abrupta chegando a 40°C, seguida de cefaleia de alta intensidade, acompanhada de dores musculares intensas generalizadas especialmente nas costas, tonturas, prostração, anorexia e fraqueza. Nesta fase que pode durar cerca de três dias, o paciente apresenta alta viremia. Em seguida ao período infeccioso, ocorre uma melhora súbita, com diminuição da intensidade dos sintomas, que se denomina fase de remissão, e que pode durar em média um dia. Após esse período, tem início a fase de intoxicação, que se caracteriza por piora no quadro do paciente. Nesta, o vírus deixa a circulação e é encontrado principalmente no fígado, rins e coração, entre outros órgãos. Ocorre plaquetopenia acentuada, podendo chegar a 20.000/cm³, e surgem as hemorragias nas mucosas, pele, ouvido e nariz. Os vômitos são mais frequentes se tornando hemorrágicos com a evolução do quadro (vômito negro) (27, 28). O paciente torna-se icterício com concentrações de bilirrubina que variam de 10 – 30 mg/dl, com grande predomínio de bilirrubina direta (28). Provavelmente devido ao efeito citopático nos músculos esquelético e cardíaco, há aumento nos níveis de aminotransferases, podendo alcançar 2.000 U/mm³, estando a aspartato aminotransferase (AST) mais elevada e precoce que a alanino aminotransferase (ALT). Por volta do quinto ao sétimo dia, ocorre falência renal caracterizada por oliguria acentuada, seguida de anúria, e necrose tubular aguda, com níveis plasmáticos de ureia acima de 200/ mm³ e creatinina em torno de 5mg/ mm³. Neste momento, a febre decai chegando à hipotermia, a tensão arterial tende a decrescer, e o paciente entra em choque hemorrágico ou hipovolêmico, que leva alguns pacientes a óbito. Em sua maioria, os pacientes graves morrem por volta do sétimo ao décimo dia de doença, em virtude do descontrole das hemorragias ou da falência hepato-renal. Existem relatos da forma maligna fulminante, onde as fases da doença não são bem demarcadas, e o paciente evolui para o óbito no terceiro dia da doença (27-29).

Os pacientes que sobrevivem à forma clássica da febre amarela, ainda persistem com mialgia e indisposição por cerca de duas semanas. Neste período é fundamental o controle de infecções secundárias que podem levar o paciente à óbito. Embora lenta a recuperação é completa não havendo sequelas (8, 27-29).



Figura 1- 6 - Fases clínicas da forma clássica da febre amarela. Inspirado em Gardner & Ryman, 2010 (30).

1.3. Patologia da febre amarela

O estudo da Patologia da febre amarela teve início em 1692, quando Antônio Brebon realizou em alto mar a primeira necropsia descrita de um indivíduo morto por febre amarela. Embora tenha concluído equivocadamente que a causa da doença era uma infestação por lombrigas, Brebon ressalta o estado degenerado do fígado (31). Somente em 1890, Councilman, então assistente de Patologia na Universidade Johns Hopkins, publica um trabalho no qual analisava os caracteres histológicos do fígado na febre amarela,

apontando como característica da doença a presença de uma massa acidófila no interior das células que chamou de “corpúsculos hialinos”. Segundo o autor, essa característica era mais importante que a degeneração gordurosa apontada por outros autores. Alguns médicos brasileiros notavelmente contribuíram com a base da descrição anatomopatológica da febre amarela, com destaque para Amadeu Fialho, Azevedo Sodré, Eudoro Villela, Magarinos Torres, Miguel Couto e Rocha Lima. Este último descreveu as lesões acidófilas e gordurosas já descritas por Councilman, mas reconheceu ainda o caráter médio-lobular preferencial dessas lesões que permite o diagnóstico da doença (31).

Atualmente, os dados disponíveis sobre a patologia e patogênese da febre amarela ainda são descritos em casos humanos fatais e em infecções experimentais de primatas não humanos, hamsters e camundongos (27, 28, 32-37). A análise de necropsias restringe o conhecimento da patologia a casos terminais, e mesmo os modelos experimentais reproduzem a forma maligna ou grave da doença. Não há um modelo de estudo que reproduza as formas moderadas, leves e subclínicas (33).

Estes dados apontam para duas vias distintas de desenvolvimento da doença, o viscerotropismo e o neurotropismo (38). A infecção humana (*Homo sapiens*), de macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) e de hamsters (*Mesocricetus auratus*) é viscerotrópica, já a infecção de camundongos é neurotrópica (16, 28, 32-34, 38). Cabe citar que, embora não seja o curso natural da doença, em humanos imunodeficientes e em recém-nascidos, pode ocorrer a manifestação viscerotrópica ou neurotrópica da doença ligada a vacinação com o vírus FA 17D (6, 27).

A infecção natural ocorre pela inoculação dos vírus por um mosquito infectado na derme do hospedeiro. Monath e Barrett sugerem que a quantidade de vírus inoculada pode variar de 3 - 4 log₁₀ PFU (8, 27). Os vírus inoculados infectam inicialmente células dendríticas residentes na pele, as quais são susceptíveis *in vitro* e apresentam um papel importante na infecção por outros flavivírus como o vírus da dengue (8, 27, 39, 40). Em seguida, os vírus são

drenados pelos vasos linfáticos para os linfonodos onde são replicados e liberados na corrente sanguínea gerando a primeira viremia (8, 27, 38, 41, 42), que pode durar de poucas horas a sete dias dependendo da gravidade da infecção (28). Uma vez na via hematogênica, os vírus atingem o fígado, os rins, o coração, o baço e os demais órgãos (Figura 1-7) (28, 38).

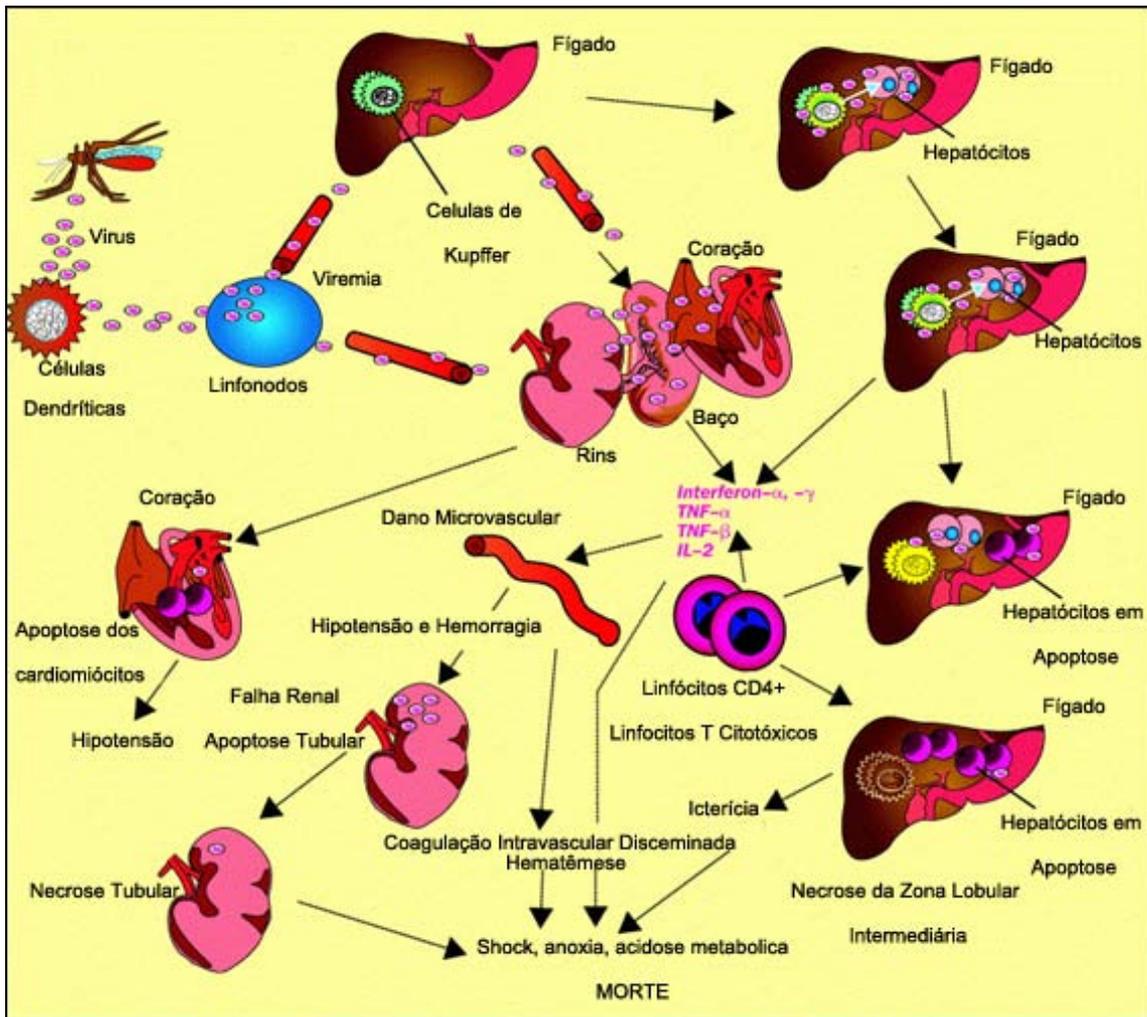


Figura 1- 7 - Esquema da Patogênese da febre amarela. Adaptado de Monath, 2001 (27).

Embora desempenhem papel fundamental na fase inicial da infecção, os dados morfológicos disponíveis sobre os efeitos da infecção nos linfonodos nesta fase são escassos e sugerem apenas efeito indireto, manifesto pela hiperplasia folicular e depleção dos linfócitos (43).

Em macacos Rhesus a infecção no fígado ocorre cerca de vinte e quatro horas após a inoculação experimental do vírus e se dá inicialmente pela infecção das células de Kupffer (27). Estas células aparentemente formam uma barreira de proteção para os hepatócitos, que só se infectam após aquelas sofrerem apoptose (8). Este evento é tardio, presente na fase de intoxicação, cerca de 24 a 48 horas antes da morte em casos letais e em macacos Rhesus infectados experimentalmente (8, 27, 38). Os danos nas células hepáticas decorrem da combinação entre efeito citopático decorrente da biossíntese dos componentes virais, resposta imune e hipóxia. Certamente o mecanismo mais importante é a apoptose induzida pela biossíntese de vírus pelas células ou mediada por TGF- β , e receptores do tipo FAS (38, 41, 42, 44).

Por análises microscópicas, nos modelos humano, rhesus e hamster, é possível identificar hepatócitos infectados com a morfologia característica da doença manifestada pela presença dos corpúsculos acidofílicos já mencionados, chamados de corpúsculos de Councilman e Rocha-Lima (Figura 1-8) (8, 27, 45, 46). Estes podem se apresentar de três formas: como pequenas áreas bem definidas de condensação eosinofílica lado a lado no citoplasma, ou citoplasma totalmente condensado eosinofílico, com núcleo picnótico central, ou como massas anucleadas eosinofílicas dentro das trabéculas ou livres no lúmen dos sinusóides (46). Estes hepatócitos apresentam positividade citoplasmática para o antígeno viral e para o receptor FAS (41, 42).

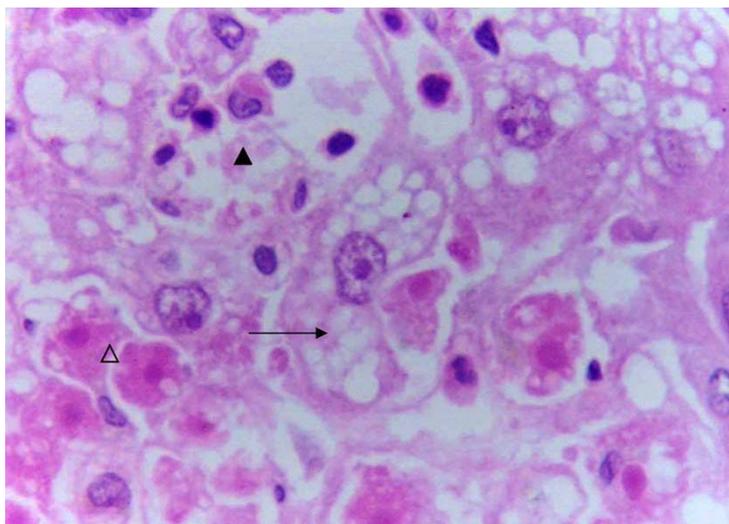


Figura 1- 8 – Aspecto histopatológico de fígado humano de paciente com febre amarela, corado por Hematoxilina e Eosina (400x) Corpúsculo de Councilman (Δ), necrose lítica (▲) esteatose microvesicular (→). Retirado de Quaresma (2005) (46).

As lesões de Councilman são mais intensas na zona 2 (zona intermediária) dos lóbulos hepáticos, em detrimento das demais zonas lobulares (Figura 1- 9) (45, 46). É possível identificar nestas regiões, além dos hepatócitos infectados, células de Kupffer $CD68^+$, células NK e citocinas como $TNF-\alpha$, $INF-\gamma$ e $TGF-\beta$. Esta última apresenta forte positividade na zona intermediária do fígado de pacientes que evoluem para óbito (42).

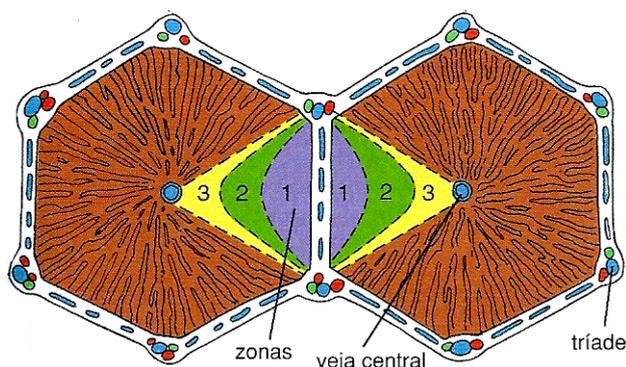


Figura 1- 9 - Ácino hepático evidenciando as zonas do lóbulo. As lesões dos hepatócitos ocorrem preferencialmente na zona 2. Retirado de Ross, 2008 (47).

Ainda na região lobular é possível identificar focos de necrose lítica caracterizados pela ausência de hepatócitos intactos associados à presença de

linfócitos e neutrófilos (Figura 1- 8) (42, 45, 46, 48). Outro aspecto marcante da patologia nos lóbulos hepáticos é a presença de células com esteatose microvesicular (Figura 1- 8), por vezes com a presença de “células em mórula”, e esteatose macrovesicular com células repletas de gordura com núcleo excêntrico. A esteatose hepática é predominante na zona intermediária, junto às regiões de apoptose, mas também ocorre nas zonas 1 e 3 (8, 45, 46).

A resposta inflamatória local é pouco expressiva quando comparada às lesões nos hepatócitos (46, 49). Infiltrados mínimos ou moderados são observados no espaço porta, com predominância de linfócitos e monócitos. Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, linfócitos B CD20⁺, e células NK podem ser observados na região portal, e em menor quantidade nas zonas lobulares. Há um predomínio de linfócitos CD4⁺ nestes infiltrados. As citocinas TNF- α , INF- γ e TGF- β também foram identificadas nos infiltrados portais, e parecem modular a resposta inflamatória (38, 42). Trabalhos sugerem que a expressão de TGF- β é um dos fatores predominantes para imunossupressão, tornando a reação inflamatória pouco expressiva face aos danos presentes no fígado (38, 42, 48). Em consequência do exposto, a ação proteolítica no estroma e na matriz extracelular causada pela ação de células do sistema imune é mínima (50). As alterações na malha reticular são raras; em geral os trabalhos descrevem que não há alterações nesta rede de fibras, mostrando uma preservação da matriz extracelular do fígado em detrimento da desordem celular. Focos de hemorragia são encontrados no espaço porta e no lóbulo hepático. Pigmentos de hemossiderina podem ser observados em células de Kupffer (8, 27, 38, 45, 46, 51).

Tanto em humanos quanto em macacos rhesus, que se recuperam da forma grave da febre amarela, é possível notar uma reestruturação total do fígado, graças aos pequenos danos ao estroma (50). Uma das características do fígado em fase avançada de infecção ou em regeneração é a presença dos corpúsculos de Villela, que resultam da impregnação dos corpúsculos de Councilman por pigmentos biliares. Estes são amarelo brilhante e podem estar também no interior de células de Kupffer (50).

Os rins de macacos rhesus infectados experimentalmente e humanos infectados apresentam manifestações microscópicas semelhantes às encontradas no fígado. O epitélio tubular apresenta degeneração eosinofílica severa e microesteatose. Não há infiltrado inflamatório aparente (8). É possível identificar o antígeno viral, por imunohistoquímica, nas células epiteliais tubulares o que sugere que a produção de vírus pela célula pode contribuir com o dano renal (51). Embora clinicamente seja detectada albuminúria em pacientes graves não há alterações evidentes nos glomérulos renais (51). Contudo, em macacos rhesus ocorrem danos à membrana basal da cápsula de Bowman e são detectados antígenos virais nos glomérulos dois a três dias após a infecção (8).

Também é possível encontrar antígenos virais no miocárdio, que apresentam padrão necroapoptótico semelhante aos rins e fígado (8, 51). As lesões se estendem por células do nó sinoatrial e do feixe de His, podendo ser uma das causas de bradicardia observada clinicamente em alguns pacientes. É possível identificar áreas de esteatose nas fibras miocárdicas (8).

O baço humano sofre profundas modificações no curso da infecção pelo vírus da Febre Amarela, caracterizadas inicialmente pelo surgimento de células com padrão mononuclear no interior e ao redor dos folículos. Em seguida, ocorre dilatação destes folículos e conseqüente diminuição do número de linfócitos. Este quadro progride até que as células com padrão mononuclear se sobrepõem aos linfócitos que terminam por desaparecer. Estas células não são fagócitos e aparentam células imaturas da linhagem linfocítica. Este mesmo padrão é observado em outros órgãos linfóides como os linfonodos e a placa de Payer (43).

Em seus estágios iniciais, a infecção pelo vírus da Febre Amarela em humanos leva à leucopenia em especial neutropenia, acompanhada de moderada trombocitopenia. A análise da medula óssea de macacos rhesus infectados experimentalmente revela degeneração de megacariócitos, e hiperplasia hematopoiética (8). Embora não existam evidências em febre

amarela, a principal célula infectada pelo vírus da dengue na medula óssea são os megacariócitos (52).

A análise do trato digestório em necropsias revela um grande conteúdo de sangue digerido no interior do estômago e do intestino delgado, especialmente no duodeno. Petéquias são observadas junto a rompimentos da mucosa. Aparentemente, os danos ao trato digestivo são secundários à infecção, e estão ligados principalmente à disfunção na homeostase do sistema circulatório (50).

Em necropsias de indivíduos mortos pela febre amarela, é possível observar petéquias por toda pele, mucosas, peritônio, além de moderado derrame pleural e edema pulmonar e cerebral. Danos aos capilares são uma característica das febres hemorrágicas. Na dengue estes danos estão ligados ao elevado nível de IL-8 no plasma sanguíneo e à susceptibilidade do endotélio à infecção viral. Na febre amarela, a etiologia desse fenômeno não foi elucidada (8).

1.4. Epidemiologia da febre amarela

A febre amarela possui dois ciclos biológicos bem distintos, determinados pelo vetor e pelo hospedeiro preferencial, um ciclo urbano e um ciclo silvestre (Figura 1- 10). O vetor do ciclo urbano é o *Aedes aegypti*, e o ciclo silvestre é mantido por culicídeos do gênero *Aedes* na África e dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* na América do Sul (6, 28).

O ciclo urbano se caracteriza por seu vetor e pela inexistência de hospedeiro não humano. Um paciente em região urbana, em fase virêmica infecta novos mosquitos que infectarão novos indivíduos. Este ciclo não ocorre no Brasil desde 1942, com o último relato na cidade de Sena Madureira no estado do Acre. Nas Américas, o último relato ocorreu em Trinidad no ano de 1954 (28, 53). Já o ciclo silvestre, envolve outros vetores já destacados, que se prestam a reservatórios da doença, pois permanecem infectados por toda a vida. Os hospedeiros são primatas não humanos que atuam como agentes

amplificadores da doença, uma vez que infectados são capazes, na fase viremica, de infectar outros mosquitos. O homem se contamina acidentalmente quando se expõe a esses vetores principalmente por atividades laborais ou pelo ecoturismo, entrando no ciclo enzoótico natural (6, 28, 53). Caso este homem infectado acidentalmente, retorne para uma área urbana com vetores competentes, pode reiniciar um novo ciclo urbano. Na Savana africana é possível ainda identificar um ciclo intermediário, onde ocorre a transmissão entre o homem, o vetor e o primata não humano (Figura 1- 10). Neste caso, o homem e o macaco servem como amplificadores da doença. Esse ciclo ocorre em função do hábito semi-doméstico dos vetores que ocorrem nesta região, principalmente a espécie *Aedes simpsoni* (6, 28).

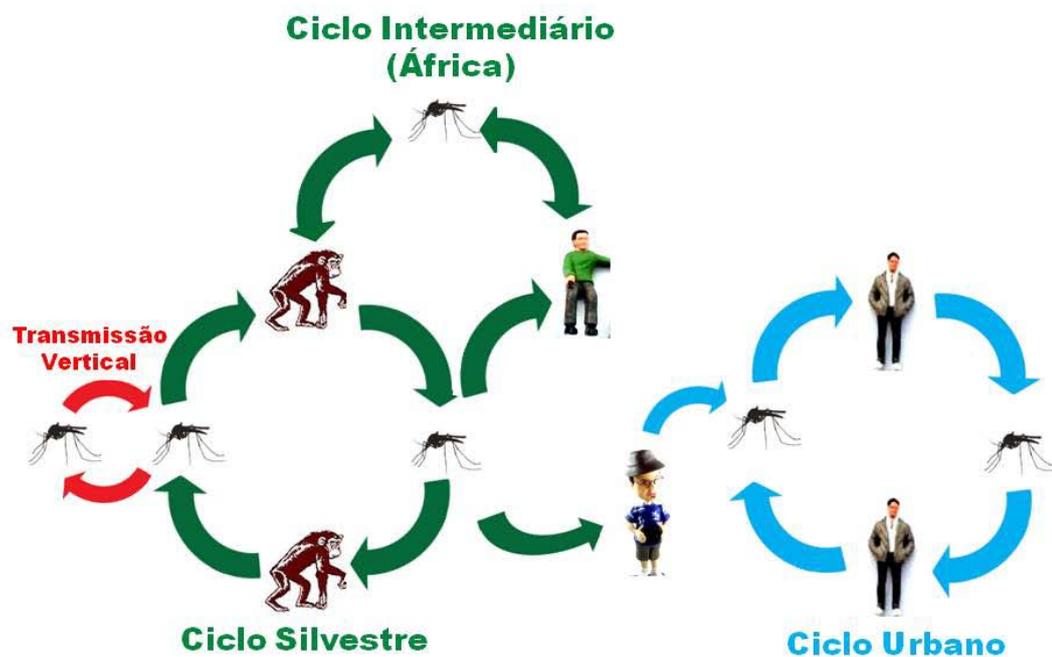


Figura 1- 10 Ciclos biológicos da febre amarela.

Diversos primatas não humanos são hospedeiros do vírus da Febre Amarela no ciclo Silvestre, com destaque no Brasil para os macacos pertencentes ao gênero *Cebus* (macaco prego), *Alouatta* (guariba), *Ateles* (macaco aranha) e *Callithrix* (sagui) (53). Ao contrário dos demais que

apresentam alta taxa de letalidade, os macacos do gênero *Cebus* são mais resistentes à infecção, apresentando baixa letalidade, embora sejam facilmente infectados. Não se sabe a importância epidemiológica de outros mamíferos na manutenção do ciclo silvestre; contudo inquéritos sorológicos em áreas endêmicas apontam a participação de gambás, porco espinhos e morcegos (53).

Até meados da década de 1930 a forma silvestre da febre amarela não era conhecida. Os primeiros relatos da doença, não ligados à transmissão pelo *Aedes aegypti*, ocorreram em 1898 por Adolpho Lutz, no interior do Estado de São Paulo. Já pelos anos de 1930, um surto epidêmico no Vale do Canaã no estado do Espírito Santo, chamou a atenção de pesquisadores da Fundação Rockefeller, que fizeram pesquisas minuciosas descartando a existência do vetor urbano no local (31). Em 1936 os dados coletados em Canaã culminaram na descrição do ciclo silvestre pelo Doutor Fred L. Soper que a definiu como sendo a "febre-amarela que se encontra em zonas rurais, silvestres e fluviais, sem o concurso do *Aedes aegypti*" (31, 54).

Após a introdução da vacina anti-amarílica e a consequente erradicação da forma urbana, a forma silvestre se presta à manutenção da doença, e como fator de risco para a reemergência do ciclo urbano, em cidades infestadas pelo *Aedes aegypti* (53). De fato, a febre amarela continua como uma doença infecciosa de grande importância epidemiológica, a despeito dos esforços de vacinação em massa de populações em áreas de risco, em função, principalmente, do ciclo silvestre (14).

Atualmente, a febre amarela acomete uma extensa área que compreende as regiões Sub Saariana da África e tropical da América do Sul, onde anualmente são reportados milhares de casos de infecção (Figura 1- 11). A maioria dos casos é atribuída ao ciclo silvestre ou intermediário da doença; contudo, ciclos urbanos ocorrem periodicamente na África (6, 14).

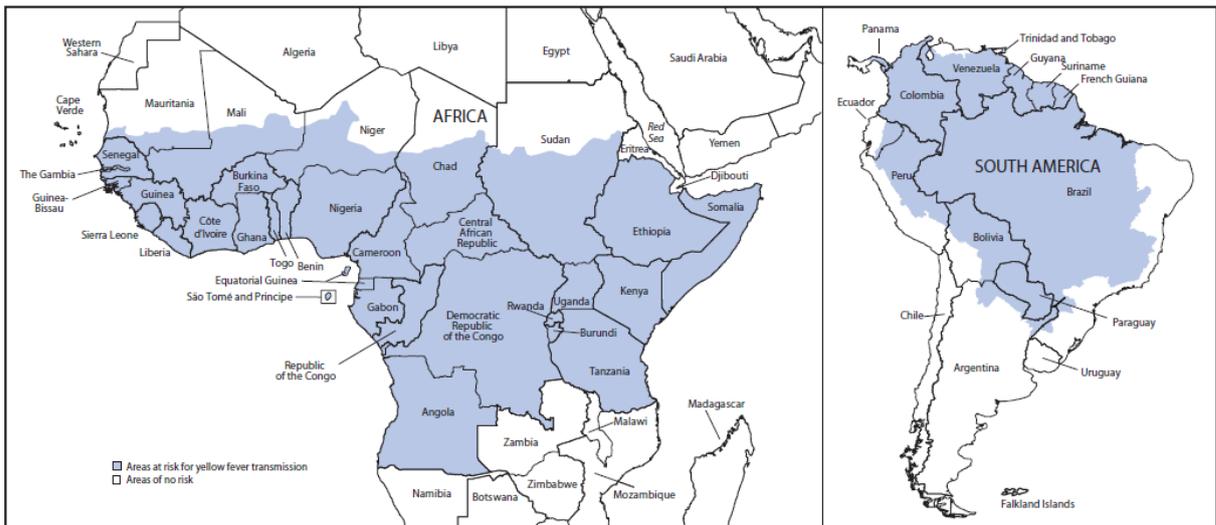


Figura 1- 11 Áreas de risco de transmissão da febre amarela no mundo.
Fonte: Centers for Disease Control and Prevention – CDC, 2010 (6)

Uma das características epidemiológicas da febre amarela consiste no fato de que a maioria das pessoas desenvolve as formas brandas ou assintomáticas da doença, que são de difícil diagnóstico clínico quando fora da vigência de uma epidemia. Supõe-se, portanto que em algumas regiões a febre amarela seja subnotificada (28).

A maioria dos surtos que ocorrem na África estão situados na região oeste. Não se sabe ao certo os motivos para as regiões central e leste deste continente serem menos acometidas. Algumas teorias apontam para uma menor densidade populacional humana e de vetores, a existência de genótipos diferentes do vírus e a proteção cruzada pela existência de anticorpos contra outros flavivírus na região (6, 14). Esforços de vacinação nos últimos anos têm reduzido o número de casos nestas regiões. Contudo, a África ainda responde por cerca de 90% dos casos de febre amarela no mundo (55).

Na América do Sul, a transmissão da febre amarela se dá em regiões de mata, principalmente das bacias dos rios Araguaia, Amazonas e Orinoco. Peru e Bolívia possuem a maior incidência de casos nos últimos anos, todos ligados ao ciclo silvestre. Um fato preocupante é que áreas de transmissão de febre amarela silvestre têm se aproximado de regiões com alto índice populacional e presença de *Aedes aegypti*, é o caso de São Paulo, Rio Grande

do Sul e Goiás no Brasil e Assunção no Paraguai. Em 2007, um surto no Paraguai com vinte e dois casos confirmados e seis mortes, próximo à região metropolitana de Assunção obrigou as autoridades locais a vacinar em regime de emergência cerca de 1,27 milhão de pessoas. Cabe ressaltar que esta região não era acometida desde a década de 1970 (6, 14, 56).

Quanto à distribuição da febre amarela silvestre no Brasil, é possível reconhecer três regiões epidemiológicas: 1) endêmica, que inclui toda região norte, centro-oeste e o estado do Maranhão; 2) de transição ou epizootica, que compreende cidades dos estados do Piauí, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul; e 3) uma terceira região considerada indene, que compreende a região litorânea do nordeste, sul e sudeste (28). Nos últimos anos, a área enzoótica tem aumentado progressivamente, com destaque para as regiões sul e sudeste, onde ocorreram grandes epizootias nos anos de 2008 e 2009 (57).

De fato o controle epidemiológico da febre amarela, necessita de vigilância ativa sobre os casos de epizootias em primatas não humanos, já que estes são sentinelas para a detecção de casos humanos. Em geral os últimos surtos epidêmicos humanos coincidem com regiões onde estão ocorrendo epizootias (57, 58). O mapa da figura (Figura 1- 12) apresenta em uma série de um ano, a ocorrência de epizootias ligadas à febre amarela e sua coincidência com os casos humanos da doença.

É conhecido que os surtos em primatas não humanos ocorrem em uma determinada região em períodos que variam de sete a quatorze anos. Esse comportamento cíclico se dá em função da susceptibilidade da população à infecção (31, 58). A infecção de outros mamíferos pode contribuir para a manutenção deste ciclo, ampliando assim a possibilidade de hospedeiros (53). Outro fator preponderante que tem sido apontado por diversos autores é a possibilidade do vírus da febre amarela ser transmitido verticalmente nos mosquitos vetores (Figura 1- 10) (59-62).

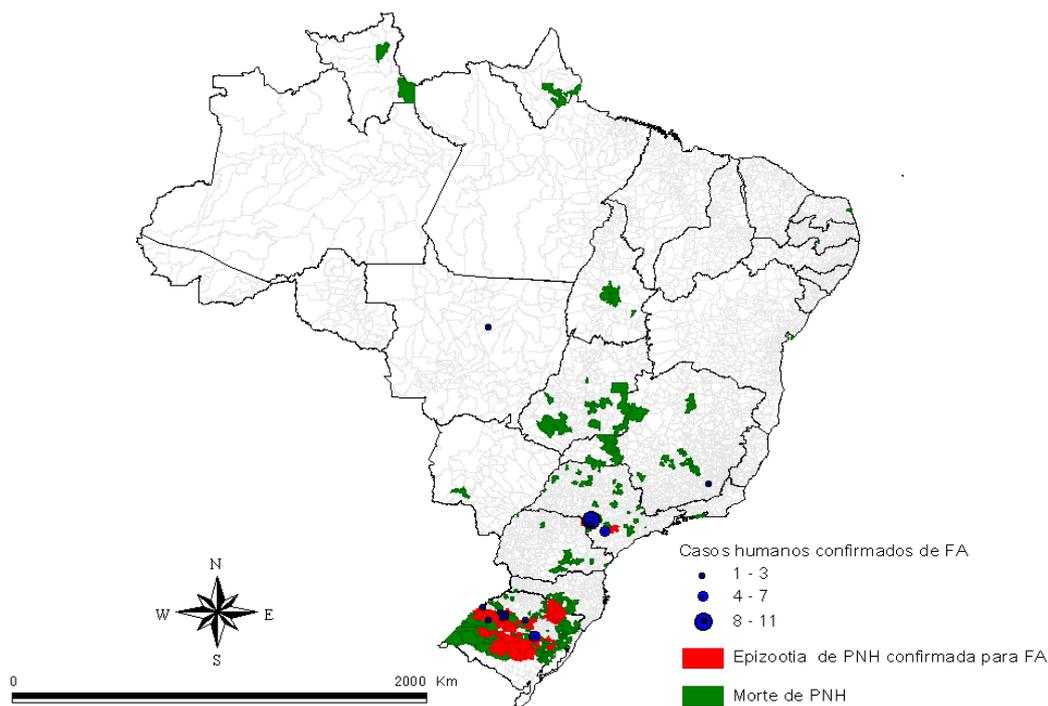


Figura 1- 12 Mapa da distribuição espacial das epizootias de primatas não humanos (PNH) e casos humanos de febre amarela, de acordo com o município de local provável de transmissão. Brasil, outubro/2008 a setembro/2009. Fonte: Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância em Saúde (57).

Mesmo nas regiões de mata, os surtos de febre amarela respeitam certa sazonalidade, sendo mais frequente no final da temporada de chuvas, quando há maior densidade da população vetorial (53). Essa relação com o período do verão fez com que os moradores da cidade do Rio de Janeiro, no século passado, fizessem uma analogia com o período de frutificação da mangueira, que dizia “Ano de mangas, ano de febre amarela” (63).

A febre amarela permanece como uma doença de notificação compulsória pela Organização Mundial de Saúde, sendo obrigatório o relato dos casos humanos e de epizootias, bem como o alerta aos turistas quanto à necessidade de vacinação. O controle da doença se dá pela vacinação da população residente em áreas endêmicas e de risco, e de turistas que pretendem visitar estas áreas, além do controle da população de vetores (6, 53, 57). Não existe tratamento eficaz para os pacientes que desenvolvem a doença

ou para aqueles que o fazem nas formas graves da doença ligadas à vacina (2).

1.5. Vacina contra febre amarela

O início da busca pela vacina passou pela identificação do agente causador da doença. Diversos organismos foram elencados como possíveis causadores da febre hemorrágica, e em consequência diversas vacinas foram desenvolvidas. Podemos destacar o trabalho de Domingos Freire que em 1879 anunciou ter descoberto “o germe” (*Cryptococcus xantogenicus*) e “o germicida” (Salicilato de Sódio). No primeiro semestre de 1883, Freire anunciou a formulação da vacina contendo esta planta microscópica atenuada. Pelo menos 12.519 pessoas entre imigrantes e brasileiros foram vacinados com esta formulação, que mais tarde chegou a ser recomendada em várias partes do mundo. Com o postulado de Koch a teoria do agente causador postulado por Freire foi desacreditada, o que reiniciou a busca por novos agentes etiológicos causadores da doença (63).

As descobertas de Walter Reed e Carlos Finlay do mecanismo de transmissão da febre amarela por mosquitos vetores favoreceram o progressivo abandono da teoria dos miasmas. Neste ponto, o controle eficiente da febre amarela se deu pelo combate ao mosquito vetor. No Brasil essa alternativa obteve relativo êxito nas campanhas do início do século XX, quando Emílio Ribas e Oswaldo Cruz erradicaram a febre amarela, em São Paulo e no Rio de Janeiro, respectivamente. Com a descoberta do ciclo silvestre da doença, essa abordagem se mostrou insuficiente, e acelerou a busca por uma vacina que permitisse a imunização em massa da população (31).

Cabe destacar ainda os trabalhos de Hideyo Noguchi em 1918, que acreditava que o agente causador da febre amarela fosse uma *Leptospira*. Noguchi vacinou cerca de oito mil pessoas contra esse agente, sem êxito no controle da doença. Neste ínterim, em junho de 1927, o sangue de um africano

de vinte e oito anos, que sofria com a forma branda da doença, chamado Asibi foi coletado, e injetado em um macaco rhesus, que desenvolveu a doença. Mais tarde essa amostra viral daria origem à vacina atenuada que até hoje é utilizada (64).

O processo de atenuação da vacina se deu por tentativa e erro, por diversas passagens em células de mosquito, embriões de camundongo e embriões de galinha (63, 64). O principal trabalho que deu origem a cepa FA 17D foi desenvolvido por Theiler e Smith que realizaram diversos testes em macacos e humanos, utilizando subcepas obtidas de passagens sucessivas da amostra Asibi em cultura de tecido de camundongo e de galinha destituída de sistema nervoso (65). Destas alternativas o ramo que gerou a vacina empregada nos dias de hoje, foi atenuada inicialmente com 58 passagens sucessivas em tecido embrionário de galinha, seguido de passagens, até a passagem 114, em tecido embrionário de galinha livre de células do sistema nervoso. Esta cepa se mostrou promissora, pois não apresentava nem neurotropismo nem viscerotropismo em macacos rhesus. Após um total de 227 passagens, esta então denominada vírus da Febre Amarela cepa 17D foi eficiente na imunização de oito indivíduos. Trazida para o Brasil, foi testada com êxito em sete técnicos de laboratório (63). Neste momento, a vacina começa a ser utilizada com a adição de soro normal humano. Esta nova formulação foi testada em 33 indivíduos obtendo êxito na imunização, o que motivou sua produção em maior escala. O vírus foi propagado através de sucessivas passagens até a de número 238, quando foi utilizado na formulação da vacina que imunizou 289 pessoas em Minas Gerais, seguido de 38.266 pessoas em todo o Brasil em 1937. Esta formulação permaneceu em uso até 1940, quando surgiram casos de icterogênese causada pelo soro humano. Neste momento, a utilização de soro é descontinuada e o extrato da vacina passa a ser diluído em água, para sua formulação (3).

Várias subcepas foram desenvolvidas neste período derivadas a partir da cepa FA17D, com destaque para duas, denominadas FA 17D-204 e FA 17DD. A FA 17D-204 foi produzida na passagem 204 em tecidos de embrião de galinha, e é utilizada até hoje na formulação da vacina francesa. A 17DD foi

obtida a partir de passagens sucessivas da cepa FA 17D em tecido embrionário de galinha, gerando vários sub lotes, com diferentes números de passagens. Neste ponto, pesquisadores perceberam que as amostras virais geradas diretamente em ovos embrionados de galinha apresentam maior título que as geradas em cultura de tecido embrionário, e que um número excessivo de passagens alterava as características das subcepas tornando-as ineficazes na imunização. Neste contexto, um dos lotes desenvolvidos se mostrou mais promissor, no qual foram realizadas 38 passagens da subcepa FA 17DD em embriões, gerando a cepa denominada *EPlow*. Esta amostra estava na passagem 281 da amostra original, e a partir dela, foram gerados lotes chamados semente, na passagem 284 e 285. A vacina foi então formulada na passagem 286. O emprego dos lotes semente permitiu a produção de uma grande quantidade de vacinas, mantendo o mesmo número de passagens da amostra viral. Este lote mostrou-se altamente eficiente na imunização, e é empregado até os dias de hoje para a produção da vacina (3).

A base molecular da atenuação do vírus da Febre Amarela não é bem conhecida, mas sabe-se que a diferença entre linhagem original Asibi e a vacinal é muito pequena, de 68 nucleotídeos resultando na troca de 32 aminoácidos. O gene que codifica a proteína do envelope é o mais alterado, com 11 nucleotídeos mutados, gerando oito aminoácidos modificados. Estas modificações podem ser a chave na mudança de especificidade e quantidade de células comprometidas com a infecção, devido ao papel preponderante desta proteína na interação vírus-célula (66).

A vacina FA 17D vem sendo produzida pela Fundação Oswaldo Cruz e, a partir de 1976, em sua unidade técnico-científica - Bio-Manguinhos - única empresa nacional produtora desta vacina. Esta é produzida a partir do lote semente do vírus da Febre Amarela 17DD *EPlow* inoculado em ovos embrionados de galinha livres de patógenos específicos (SPF), de acordo com as normas estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde. Aproximadamente 500 milhões de doses da vacina contra febre amarela foram administradas em todo o mundo desde a introdução do sistema de lote-

semente em 1945, com mais de 98% de proteção efetiva por pelo menos dez anos (3, 4).

O processo de produção da vacina (Figura 1-13) inicia com a chegada dos ovos SPF, em dia zero de desenvolvimento, os quais são verificados quanto a sua integridade e em seguida incubados em uma chocadeira com temperatura e umidade controladas. No nono dia de desenvolvimento os embriões são observados em ovoscópio, sendo descartados aqueles que estiverem mortos ou não embrionados. Os ovos selecionados são então inoculados com cerca de 1.000 PFU da amostra viral semente. Amostras deste inóculo são coletadas para controle de qualidade. Os ovos são incubados por mais três dias até o 12º dia de desenvolvimento, quando os embriões são então coletados vivos. Quarenta e quatro embriões são colocados em copos de trituração de aço inoxidável, com a adição de 50 ml de água destilada estéril, onde são triturados por 12.000 rotações por minuto (rpm), durante cinco minutos. Para evitar o aquecimento da amostra e em consequência à diminuição do título viral, durante a trituração os copos são colocados em banhos de gelo. O triturado de embriões é então transferido a cada dois copos para frascos e centrifugados por uma hora a temperatura entre 4°C a 8°C. O sobrenadante é coletado e após a formulação com adição de estabilizadores (glutamato e sacarose) é então acondicionado em frascos de um litro e congelado. A solução estabilizadora foi desenvolvida na década de 1980 por Bio-Manguinhos. Esta solução permite que a amostra resista às variações térmicas durante o processo de produção e o transporte da vacina. Amostras deste preparado são coletadas para controle de qualidade. Após quarentena, as amostras liberadas são então descongeladas em banho-maria a 31°C, e reunidas para nova formulação, com a adição de diluentes, e produção da vacina a granel. Esta é então envasada de modo automatizado, em uma máquina que distribui a vacina em volumes iguais. Após o envasamento a vacina é então liofilizada, vedada e etiquetada. Amostras do produto final são coletadas para o controle de qualidade (63).

Uma vez liofilizada a vacina de Biomanguinhos é embalada junto a ampola com diluente. É apresentada como uma pastilha móvel de cor creme,

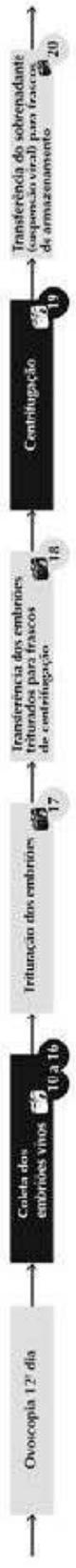
que após a reconstituição se apresenta ligeiramente opalescente, de cor levemente amarelada ou rósea. A vacina liofilizada tem validade de 24 meses, se armazenada em refrigerador entre 2°C e 8°C, ou em congelador a -20°C. Após a reconstituição, a vacina tem validade de seis horas, se mantida sob-refrigeração (63).

Cada dose da vacina, de 0,5 ml, contém cerca de 1.000 LD₅₀ do vírus FA 17DD, e deve ser injetada por via subcutânea. A proteção é de no mínimo dez anos, quando se recomenda dose de reforço. A vacina não deve ser administrada em pessoas: com doença febril aguda ou com comprometimento do estado geral de saúde; com histórico de reações anafiláticas a ovos de galinha e seus derivados, gelatina, eritromicina e canamicina; gestantes; imunodeficientes; com história de doença tímica; e crianças com menos de seis meses de idade (6, 53, 63).



Descarte de ovos rachados ou quebrados

Descarte dos embriões mortos e dos ovos não embrionados



Coleta de amostras (provas de esterilidade e potência)



Brasão (pool) das suspensões virais estabilizadas e aprovadas nos testes, com adição de diluente, estabilizador (100 na proporção para 5 litros) e estabilizador produto final a granel.



Envaseamento
 - empresa de abastecimento de frascos
 - máquina envaseadora de vialito e jogo de vórtice
 - desmontadas
 - máquina preparadora de armazém dos frascos com vacinas
 - carretilhas trolley de fluxo laminar para transferência dos frascos com vacina para o biofiltro

Coleta de Amostras
 durante o envase, ao fim deste processo e no fim de liofilização.

Frascos são armazenados em câmara fria até a transferência para o Centro de Processamento Final na Planta Industrial, após feita a limpeza final de rotulagem e embalagem da vacina.



Figura 1- 13 Fluxo de produção da vacina de febre amarela em BioManguinhos. Retirado de Benchimol, 2001 (63).

Uma das contraindicações mais expressas refere-se à vacinação de pacientes com alergia a proteínas de galinha, que se deve à quantidade considerável destas na vacina. Por exemplo, na vacina *Stamaril* da Sanofi Pasteur, considera-se uma média de 0,105µg de proteína do ovo por 0,5ml da vacina formulada (67). Segundo Freire *et al.* esse número pode chegar a 250µg por dose na vacina produzida por Biomanguinhos (24). Estima-se uma incidência de anafilaxia de 1,8/100.000 vacinados. Contudo, existem protocolos recentes que diminuem a reação alérgica, possibilitando que estes indivíduos sejam vacinados (67).

Em pacientes imunodeprimidos a replicação viral é descontrolada podendo causar febre amarela clássica ou encefalopatia aguda (68). Pacientes portadores do HIV com contagem de células CD4⁺ abaixo de 120/mm³ desenvolvem mieloencefalite aguda (69). Já em pacientes com contagem de células CD4⁺ acima de 200/mm³ não há produção de anticorpos neutralizantes e conseqüentemente não há imunidade, embora não haja relato de doença associada à vacina. No caso de pacientes que sofreram timentomia, existem dados consistentes do risco de desenvolvimento da doença (68). Um estudo recente de 19 pacientes transplantados (renais, cardíacos ou hepáticos) que receberam uma dose da vacina acidentalmente revelou que nenhum destes apresentou qualquer sintoma relacionado à vacina, embora, teoricamente, a vacinação destes indivíduos seja contraindicada (70).

A contraindicação ligada à idade se deve a imaturidade da barreira hemato-encefálica e do sistema imunológico em crianças menores de nove meses. No caso de epidemias, é permitida vacinação de crianças de até seis meses, embora o risco deva ser levado em conta. Em nenhuma hipótese crianças com idade inferior a esta devem ser vacinadas (68).

Embora seja expressamente recomendado pelo Ministério da Saúde o reforço na vacina de dez em dez anos, é cada vez mais aceita a ideia de que a cobertura vacinal é para toda a vida (68). Um dos trabalhos mais interessantes foi realizado com veteranos da segunda guerra mundial, que foram na ocasião vacinados contra a febre amarela. Nestes pacientes, níveis aceitáveis de

anticorpos neutralizantes foram detectados após mais de 30 anos de vacinação (71). Os mecanismos da resposta imune à vacina ainda não são claros, mas acredita-se que a eficiência do sistema imune adaptativo nesta resposta duradoura, seja resultado de uma forte indução do sistema inato no princípio da infecção (68).

A vacina FA 17DD promove uma infecção viral aguda, de baixa viremia, que atinge cerca de 200 PFU/ml. Esta viremia pode ser detectada entre o terceiro e o sétimo dia após a vacinação (72). Após a inoculação, ocorre baixos níveis de replicação viral nas células dendríticas com padrão semelhante a uma infecção abortiva, sem causar níveis altos de apoptose, estimulando receptores do tipo “*Toll-Like*” 2, 7, 8 e 9. Estas células promovem a liberação de uma série de citocinas pró-inflamatórias que ativam novas células dendríticas, que são drenadas para os linfonodos, promovendo a resposta adaptativa humoral e a resposta mediada por células (1).

A resposta humoral é rápida e específica. Anticorpos neutralizantes IgM são detectados rapidamente entre o terceiro e o sétimo dia após a vacinação, tendo seu pico na segunda semana e perdurando por até 18 meses. Já os anticorpos da classe IgG são produzidos mais tardiamente, porém perduram por anos, como já mencionado (1, 66). O título de anticorpos neutralizantes em indivíduos vacinados pela primeira vez chega, em média, a 30.321 mUI/ml após o trigésimo dia de vacinação (73).

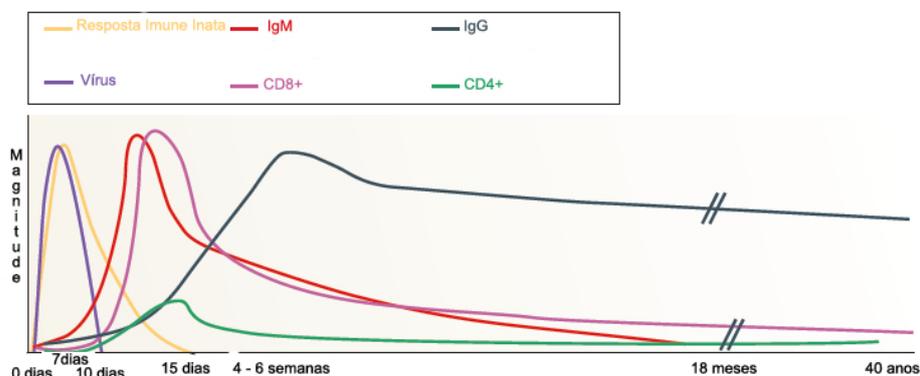


Figura 1- 14 Gráfico representando ao longo do tempo os principais eventos de uma resposta imunológica padrão ao vírus FA 17DD. Adaptado de Pulendran, 2009 (66).

Receptores do tipo *Toll-like* 3 e 9 estão envolvidos na ativação das células *Natural Killer*, no princípio da infecção. Estas células expressam marcadores de ativação, tais como CD69 e HLA DP, são altamente citotóxicas e produzem IFN- γ . Acredita-se que esta citocina polariza a resposta para Th1, inicialmente contribuindo para a ativação de Linfócitos T CD8⁺ (74). A ativação destes linfócitos é caracterizada pela expressão de marcadores de ativação tais como CD38, HLA-DR e Ki-67. As células T CD8⁺ apresentam um pico de resposta após 15 dias de vacinação, voltando a níveis normais após o trigésimo dia, e estão envolvidas diretamente no *clearance* viral (72). Linfócitos T CD4⁺ também são ativados e apresentam um padrão balanceado de resposta Th1 e Th2 (66).

Células CD8⁺ retiradas do sangue periférico de indivíduos após a vacinação apresentam uma baixa expressão da proteína Bcl-2 e alta expressão do fator Ki-67 quando comparada ao padrão do mesmo indivíduo pré-vacinação. A combinação destes fatores revela um padrão de proliferação suscetível a posterior apoptose. Estas células apresentam ainda uma forte expressão intracelular de IFN- γ , mostrando que é responsável também pela produção desta citocina (72).

A alta capacidade imunogênica da vacina FA 17DD associada à segurança e facilidade de produção em larga escala com baixo custo têm atraído pesquisadores na utilização deste vírus como uma ferramenta na produção de novas vacinas quiméricas. Esta estratégia consiste na manipulação do material genético do vírus a fim de inserir genes de proteínas exógenas com capacidade imunogênica (12). O vírus FA 17D tem se mostrado eficiente como vetor de proteínas de outros flavivírus, como os vírus da encefalite japonesa, do oeste do Nilo e da dengue, bem como de outros vírus, como o da Imunodeficiência Símia (SIV) e de outros organismos não relacionados, tais como *Plasmodium yoelli* e *Trypanosoma cruzi* (10, 11, 75). Embora promissoras, as estratégias de inserção de sequências heterólogas no genoma da cepa vacinal tem efeitos negativos sobre a biossíntese dos componentes virais, interferindo na tradução, replicação e formação da

partícula viral. Estes efeitos reduzem o “*fitness*” viral contribuindo para uma instabilidade genética e baixa imunogenicidade (12).

Embora a vacina contra a febre amarela seja considerada segura e eficiente, existem relatos de casos adversos ligados à vacinação. Duas formas graves foram descritas: 1) A doença viscerotrópica ligada à vacina, que se trata de uma infecção pansistêmica semelhante à forma grave da febre amarela e 2) a doença neurotrópica ligada à vacina, que é causada pela proliferação do vírus pelas células do sistema nervoso. Ambas são raras, com incidência de 1/250.000 vacinados, contudo, são de alta gravidade. De fato, a literatura reforça que o benefício trazido para a população que reside em áreas endêmicas e para viajantes que se expõe ao risco, compensa a manutenção da recomendação do uso da vacina (1, 7, 66, 76).

A doença neurotrópica ligada à vacina pode incluir síndromes distintas, tais como encefalite, doença autoimune do sistema nervoso central ou periférico, e síndrome de Guillain-Barré. Em geral, surge entre o segundo e o trigésimo dia de vacinação, e se manifesta por febre alta, acompanhada de cefaleia, disfunções neurológicas focais, tais como: dificuldade em se expressar verbalmente e compreender o que está sendo dito (afasia), disfunção ou interrupção dos movimentos de um ou mais membros (paresia), confusão mental e pleocitose. Os casos são raros e a taxa de mortalidade é menor que 5% (1, 66).

A doença viscerotrópica ligada à vacina se apresenta de forma muito semelhantes à febre amarela grave. Os sintomas surgem entre o segundo e o quinto dia de vacinação, e se caracterizam por febre alta, artromialgia intensa, bilirrubina elevada, linfopenia e trombocitopenia, podendo ocorrer falência hepática e renal. Os achados microscópicos são: necrose da região intermediária dos lobos hepáticos, esteatose, degeneração eosinofílica dos hepatócitos, apoptose e corpúsculos de Councilman e Rocha Lima. Partículas virais foram isoladas de diversos órgãos dos pacientes acometidos pela doença, sendo caracterizadas molecularmente como o vírus FA 17D. Embora mais comum que a manifestação neurotrópica, a incidência da forma

viscerotrópica é igualmente baixa, contudo a taxa de mortalidade é bem mais alta, chegando a 60% (1, 66, 77).

Análises por sequenciamento mostraram que não há mutações no genoma da amostra viral isolada dos pacientes com as doenças graves ligadas à vacina, quando comparados com as amostras FA 17D originais. Cabe ressaltar, que os casos não estão relacionados a um único lote da vacina, o que aponta para a hipótese de que os casos adversos estão relacionados a características imunológicas do paciente (1, 66, 77).

1.6. O modelo *Gallus gallus*

A utilização de embriões de galinha como modelo biológico remonta ao ano 300 A.C., quando Aristóteles realizou um estudo cuidadoso, observando a morfologia de embriões de diferentes idades, registrando as fases do desenvolvimento em sua publicação *Historia animalium*. Desde então, *Gallus gallus* vem sendo sistematicamente utilizado para estudos em todo o mundo, contribuindo com diversas descobertas importantes para diferentes áreas da ciência (78, 79). O baixo custo dos ovos, o desenvolvimento rápido (21 dias), a facilidade de manipulação dos embriões, a manutenção em chocadeira, entre outros fatores, contribuem para a escolha dos embriões de aves para este fim (80).

Os estudos em Patologia com embrião de galinha tem início com os trabalhos de Peyton Rous (81), que descreveu a capacidade de células filtradas de sarcoma de galinhas gerarem o tumor em outras galinhas adultas saudáveis. Este trabalho motivou o autor a repetir o experimento, desta feita em embriões, observando o mesmo resultado (82). Motivados por essa observação, Goodpasture e Woodruff em 1931, utilizaram este método para estudar Poxvírus (83). Estes autores observaram que as lesões causadas pela biossíntese das partículas virais na membrana corioalantoica eram semelhantes às causadas naturalmente pela doença. O sucesso na

propagação deste vírus em embriões de galinha abriu precedente para uma série de testes com outros tipos virais, tornando este modelo fundamental para o estudo da virologia (84).

É nesta atmosfera que, em 1937, dois grupos paralelamente, Elmendorf e Smith nos Estados Unidos (9), e Jadin na Bélgica (85), testam a capacidade dos ovos embrionados de galinha produzir o vírus da febre amarela. Neste momento já se sabia que este vírus era capaz de replicar em tecido embrionário de galinha, e era desta forma que as cepas virais eram mantidas. Em ambos os trabalhos, a técnica se mostrou promissora.

Elmendorf e Smith (9) mostraram que, quatro dias após a inoculação da amostra de vírus da Febre Amarela em ovos embrionados, os títulos infecciosos obtidos eram cinco vezes maiores do que quando a inoculação ocorria em cultura de células, sem ocorrer modificação nas características infecciosas do vírus. Neste trabalho, o inóculo era obtido da membrana corialantoica, dos fluidos embrionários ou de embrião fragmentado, e transferido para embriões saudáveis após quatro ou cinco dias de infecção. Estes autores testaram quatro cepas disponíveis na época: a Asibi e a Francesa que foram isoladas na África, aqui já mencionadas anteriormente, e duas brasileiras E-5 e AFB, cujo significado das siglas e detalhes das cepas não são mencionados no texto original dos autores. Destas, somente a E-5 foi produzida em ovo na primeira tentativa; para as demais, foram necessárias outras passagens (duas a três vezes) em embriões de galinha para obter resultados satisfatórios. Neste trabalho, os autores concluíram ainda que a idade ideal para inoculação era de sete ou oito dias de desenvolvimento, apontando que, antes deste período, um grande número de embriões morria após os primeiros dois dias da inoculação (9).

Neste mesmo ano, Theiler e Smith, que já conheciam a atenuação da cepa FA 17D em cultura de embriões de galinha, fizeram seus primeiros testes de vacinação em humanos, concluindo que a vacina era efetiva, não causava a doença, mas, diferente de macacos, o título infeccioso para uma resposta imune adequada deveria ser maior. Neste mesmo trabalho, estes autores

fizeram testes de vacinação em macacos, utilizando a amostra viral produzida em embriões de galinha inteiros, e apontaram que a utilização destes embriões era promissora (65).

Embora as bases científicas para a escolha do embrião de galinha como modelo na produção da vacina antiamarílica se remetam a estes trabalhos, o momento exato em que a vacina começa a ser produzida nos embriões não é muito claro. Após esta escolha, apenas em 1947, Fox e Laemmert publicaram uma compilação de observações sobre a produção de vírus da Febre Amarela, em que em um dos artigos aborda a infecção no ovo embrionado. Este trabalho é o único que analisa aspectos da infecção do vírus amarílico em embriões de *Gallus gallus*.

Fox e Laemmert (86) utilizaram neste estudo três raças de galinha: Plymouth Rock, Rhode Island Red e White Leghorn, além de embriões de raça mista. Neste momento, ainda não utilizavam ovos SPF. Estes embriões foram inoculados com 60µl da suspensão viral, em diferentes concentrações na membrana corioalantoica, aos sete ou oito dias de desenvolvimento, e posteriormente incubados a 37,5 °C. Para entender a disseminação do vírus pelo embrião, foram inoculados 3.000 M.L.D. (dose mínima letal) da cepa FA 17D-NY104 isolados do sobrenadante de cultura de células na membrana corioalantoica dos animais. Em seguida, os embriões foram coletados com 12, 24 e 48 horas, 3, 4 e 12 dias após a infecção, macerados em amostras que continham animal inteiro, sangue, membrana corioalantoica, cérebro, fígado, músculos, pele e intestino. Estes macerados eram diluídos e injetados intracerebralmente em camundongos Swiss Webster. Neste experimento, os autores determinaram que, com 12 h de infecção, o vírus está limitado às amostras de sangue e membrana; com 24 h as amostras de embrião inteiro, cérebro e fígado eram positivas; e com 48 h todos os tecidos estudados foram positivos. Este perfil se mantém até o décimo segundo dia. Em uma análise quantitativa, as amostras eram diluídas de quatro a dez vezes e, em cada ponto, de 6 a 12 camundongos eram inoculados e o LD₅₀ era calculado. No terceiro e no quarto dia de infecção, o cérebro e os músculos dos embriões de galinha infectados continham a maior parte dos vírus, e proporcionalmente o

fígado era o órgão menos afetado. O quarto dia de infecção apresentou os maiores títulos infecciosos. No 12º dia após a infecção, próximo à eclosão dos ovos, os títulos infecciosos eram menores em todos os órgãos; todavia o cérebro mantinha valores mais altos que os demais (86).

Ainda neste trabalho, embriões infectados em diferentes dias de desenvolvimento e não infectados foram observados quanto à porcentagem de eclosão. Nesta análise, foram utilizadas três subcepas virais: FA 17DEP, Asibi e uma cepa francesa neurotrópica. A subcepa 17DEP mostrou maior interferência na eclosão dos animais, chegando a 100% de letalidade em embriões infectados no nono dia, com dose de 12.000 M.L.D.. Os animais inoculados entre o sétimo e o nono dia de desenvolvimento apresentaram taxas de mortalidade expressivas, em todas as cepas, quando comparados aos animais controles. Já os animais inoculados após o 11º dia de desenvolvimento apresentavam taxas de mortalidade semelhantes aos controles. Os animais infectados morriam em sua maioria antes do 20º dia de desenvolvimento. Embora pouco expressivo, os autores relatam um relativo retardo de eclosão nos animais infectados. Os embriões que eclodiam, independente do dia de infecção, não apresentavam sinais de doença. Contudo quando avaliados quanto à presença de vírus no sangue, cerca de metade dos animais eram positivos. Os soros coletados 30 dias após a eclosão destes animais eram inoculados no peritônio de filhotes de camundongo, para testes de neutralização, e mostraram que os animais que nasciam com viremia apresentavam anticorpos circulantes contra o vírus (86). Dos animais infectados com as diferentes cepas virais e controles, foram coletadas amostras para estudos morfológicos. Embora neste trabalho não haja qualquer fotomicrografia, estes autores relataram não terem encontrado diferença considerável entre as diferentes amostras analisadas. Ocasionalmente, em alguns embriões, foram observadas alterações macroscópicas, tais como edemaciamento, petéquias e hemorragias difusas, com predominância nas patas e asas, e manchas amareladas no fígado. Cabe ressaltar que, quando mantidos em temperaturas inferiores a 32°C, as mesmas alterações foram observadas nos animais controles. Os autores afirmaram que, embora cerca de 100 animais tenham sido estudados, nenhum achado histológico particular à

infecção pôde ser caracterizado neste estudo. Algumas alterações observadas em poucos animais predominavam nos infectados, tais como: núcleos edemaciados e fracamente corados pela eosina no fígado e nos músculos; infiltrados eosinófilicos e mielopoiese na região de aderência dos músculos ao osso e nos tecidos perienterais; perda da estrutura fibrilar e infiltrados fagocitários nos músculos cardíacos e esqueléticos; esteatose e necrose marginal no fígado. Um único embrião estudado apresentou as lesões em zona intermediária típicas da febre amarela, associadas a úlceras gástricas (86).

Outros aspectos ainda foram estudados neste trabalho, visando aperfeiçoar a produção viral nos embriões de galinha. A idade ideal e o tempo de infecção foram abordados em uma cinética, na qual foram eleitos o oitavo dia para infecção e o intervalo de três dias para coleta do embrião como os melhores títulos virais. A concentração do inóculo também foi analisada, concluindo-se que é possível conseguir altos títulos infecciosos com baixas doses, embora o tempo em que esse título é alcançado dependa do inóculo. A temperatura de incubação também foi avaliada, sendo a de 37,5 °C a mais vantajosa. Diferentes vias de inoculação foram testadas, tais como a membrana corioalantoica, região periembrionária, saco vitelínico, cavidade alantoica, albumem e saco aéreo. A região periembrionária e a membrana corioalantoide mostraram os melhores resultados, sendo a região periembrionária escolhida por estes autores pela facilidade de inoculação. Contudo, a utilização da via vitelínica também apresentou bons resultados. A análise individual de título, somado à análise morfológica nestes animais, apontaram para uma conclusão importante dos autores: de que há uma variação grande de resposta individual dos animais, sendo necessária a utilização de agrupamento (“*pooling*”) de animais tanto para produção da vacina quanto para estudos que interfiram neste processo. Outros aspectos sobre a diferença de infecção entre as cepas virais disponíveis naquele momento ainda foram abordados, com destaque para a constatação de que vírus isolados de pacientes não infectam os ovos embrionados, o que sustenta os dados de Elmendorf e Smith (9) de que a infecção de *Gallus* não é um evento comum, e apontam para uma característica das cepas atenuadas: a capacidade de infectar estes ovos (86).

1.7. Desenvolvimento embrionário em *Gallus gallus*

Para compreender alguns aspectos abordados neste trabalho, é importante salientar de forma breve os principais eventos do desenvolvimento embrionário normal de embriões de galinha que ocorrem no período aqui estudado (9º ao 12º dia de desenvolvimento). O desenvolvimento embrionário em galinhas é influenciado por fatores externos. Nesse sentido, para haver uma padronização em estudos utilizando este modelo, Hamburger e Hamilton criaram uma escala de estadiamento, onde identificaram 46 estádios distintos em embriões de *Gallus gallus* utilizando características morfológicas externas do embrião como referência (87).

Uma vez que os embriões não estão em contato com a galinha adulta, todos os nutrientes, com exceção do oxigênio, estão presentes no ovo. A reprodução nas galinhas é um evento que demanda grande esforço, uma vez que o tamanho dos ovos e a quantidade de nutrientes dispensada são consideráveis. Contudo, galinhas nutridas corretamente podem colocar em média um ovo a cada dia. O ovo é telolécito, abundante em vitelo, com o núcleo e o citoplasma da célula pousado na superfície do vitelo em uma região denominada cicatrícula. A fertilização e o início do desenvolvimento ocorrem ainda dentro da galinha adulta. A clivagem é meroblástica e discoidal, pois ocorre somente na região da cicatrícula, e origina uma região em forma de disco (88). Quando essa estrutura se torna visível, considera-se o 1º estágio de Hamburger e Hamilton (HH), e o último estágio corresponde à eclosão do ovo (87).

Logo no início do desenvolvimento, três membranas especiais (amnion, membrana corioalantoica, e saco vitelínico) se desenvolvem com a função de proteger o embrião e absorver os nutrientes contidos no interior dos ovos e o oxigênio externo, para o correto desenvolvimento do embrião (figura 1-15) (89). O amnion é uma membrana elástica preenchida por líquido, que envolve o embrião. Suas principais funções estão ligadas à proteção. A presença do líquido amniótico evita a dessecação do embrião e mudanças bruscas na temperatura, além de proteger contra choques mecânicos (89). A membrana

corioalantoica se desenvolve entre o quarto e o quinto dia do desenvolvimento, a partir da fusão do alantoide e do corion. Esta membrana fica aderida à casca do ovo, e consiste em um mesoderma altamente vascularizado, rico em veias, artérias e capilares, que se conectam ao embrião pela veia e artéria alantoica. As funções da membrana corioalantoica são: realizar a respiração do embrião, mobilizar cálcio da casca para mineralização dos ossos, estocar excretas e transportar eletrólitos (90). O saco vitelínico, por sua vez, é uma membrana altamente vascularizada que envolve o vitelo. É o primeiro anexo extraembrionário a se formar já no 1º dia de desenvolvimento e permanece em constante modificação (crescimento e involução) até a eclosão do ovo. Essa estrutura altamente dinâmica desempenha funções primordiais para manutenção da vida do embrião: absorver nutrientes do vitelo, transferir estes nutrientes para o embrião e produzir células sanguíneas (eritrócitos e granulócitos) (89, 91). De fato, a membrana vitelínica é o principal sítio de hematopoese durante o desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus*, sendo ativa entre o 3º e o 20º dia de desenvolvimento (91). A ligação entre a membrana vitelínica e o embrião é feita pelo tronco vitelínico (“*yolk stalk*”), que consiste em uma projeção do intestino por onde passam os vasos vitelínicos (89).

Entre o 9º e o 12º dia de desenvolvimento (35-38HH) o principal evento relacionado à morfologia externa do embrião é o crescimento das patas, do bico, das pálpebras e das penas. No 9º dia de desenvolvimento (35HH), as patas perdem a membrana interdigital, o bico continua o processo de alongamento que iniciou em estádios anteriores e as pálpebras começam a se tornar visíveis. No 10º e no 11º dia (36 e 37HH), ocorre alongamento das estruturas anteriormente citadas e o espalhamento dos brotos da pena. No 12º dia de desenvolvimento (38HH), patas e asas estão praticamente em sua forma final, o bico também já é proeminente com cerca de 3,1 milímetros, as penas já são observadas em tamanho pequeno por todo corpo do animal e as pálpebras ocupam cerca de três quartos do olho (87).

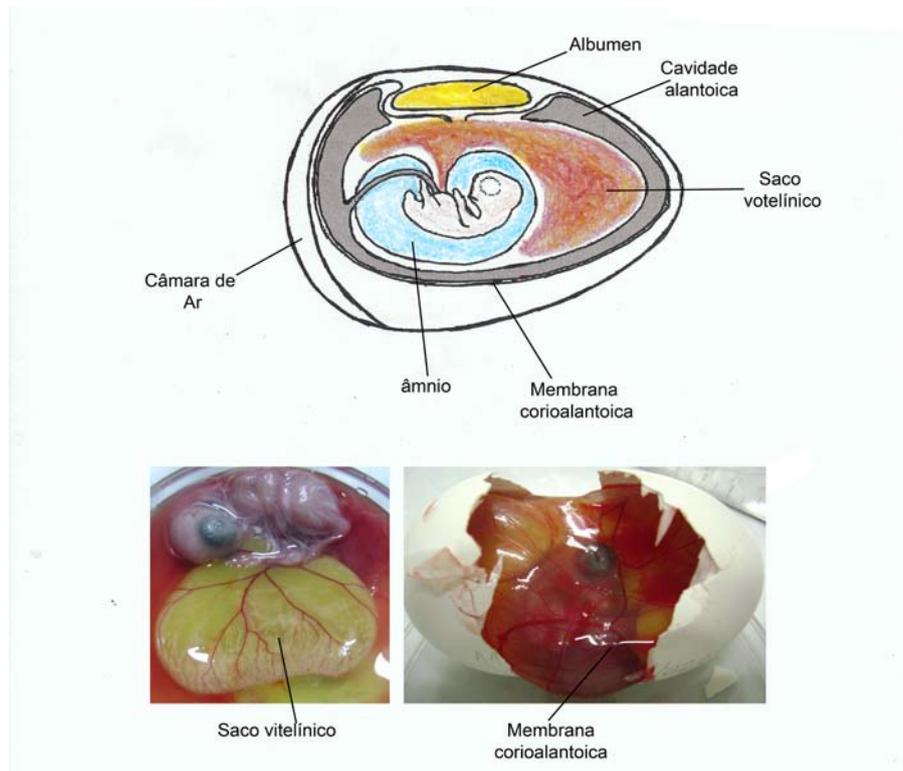


Figura 1-15 Esquema do embrião de *Gallus gallus* indicando os principais anexos embrionários. Foto de embrião evidenciando o saco vitelínico e a membrana corioalantoide.

Em paralelo ao crescimento e alongamento do corpo e dos membros, ocorre intensa formação de tecido muscular. Precusores miogênicos originados do mesoderma paraxial migram e se diferenciam em mioblastos que são abundantes no quinto dia de desenvolvimento. Estas células se tornam mais escassas na medida em que vão se agregando para formar as fibras mioblásticas após o 7º e 8º dia de desenvolvimento, desaparecendo por completo após o 12º dia. A maturação completa das fibras musculares só ocorre próximo à eclosão do ovo (92).

Entre o 9º e o 12º dia, a maioria dos órgãos está completando ou já completou seu desenvolvimento. Neste período, por exemplo, ocorre o início da formação da inervação periférica do coração (fibras de Purkinje) e das artérias coronárias, embora todas as câmaras cardíacas já estejam formadas (93). Os batimentos cardíacos já se fazem presentes, tendo se iniciado precocemente entre 33 e 45 horas de desenvolvimento (10-11HH).

Após o 9º dia de desenvolvimento, os lobos ópticos e os hemisférios cerebrais, que estão em forte proliferação separadamente entram em contato na região do diencéfalo. O cerebelo inicia seu desenvolvimento no 8º dia, tendo as primeiras quatro fissuras transversas formadas após a metade do 9º dia. O cérebro só atinge a forma semelhante à adulta no 20º dia (89). A barreira hematoencefálica se forma progressivamente, estando parcialmente formada a partir do 13º dia, quando ainda se restringe à medula espinhal, e se completa em torno do 15º dia, quando envolve todo o sistema nervoso (94).

A formação dos rins nas aves é dividida em três estágios. Inicialmente, ocorre a formação dos pronefrons que constituem uma estrutura primitiva vestigial não funcional. Após o 4º dia de desenvolvimento, estes desaparecem e são substituídos pelos mesonefrons, que são funcionais durante a maior parte do desenvolvimento. Os túbulos e glomérulos renais iniciam sua formação entre o 1º e o 5º dia de desenvolvimento, sendo os rins mesonéfricos funcionais entre o 5º e o 7º dia. A partir do 11º dia, inicia-se a involução dos tubulos mesonéfricos e o início da atividade dos metanéfricos (89, 95).

Como mencionado, o crescimento do bico é um dos eventos externos evidentes. Próximo ao 9º dia de desenvolvimento, com o crescimento deste, ocorre a formação da cavidade oral e o animal adquire a capacidade de abrir e fechar a boca. O esôfago e o papo ampliam progressivamente o diâmetro luminal e a espessura de suas paredes, em função do crescimento e modificações no epitélio destas estruturas. A divisão entre moela e proventriculo é evidente após o 5º dia. Entre o 9º e o 16º dia ocorre um expressivo crescimento dos músculos da moela, o qual permanece até a eclosão do ovo. O epitélio ainda em desenvolvimento, após o 8º dia, forma projeções e excreta uma substância queratinosa para a luz da moela. Os intestinos crescem progressivamente após o 5º dia; sua taxa de crescimento superior ao do corpo faz com que essa estrutura forme alças (89).

O fígado das aves difere morfológicamente daquele dos mamíferos, uma vez que não forma lóbulos. Os hepatócitos estão dispostos em linhas, formando uma placa dendriforme. Paralelos a essas linhas, encontram-se de

um lado estreito canalículo biliar, e de outro o sinusoide. A organogênese do fígado inicia-se após 48 horas de desenvolvimento (13-14HH), com a formação do divertículo hepático primário. No 5º dia os cordões de células hepáticas estão dispostos de maneira semelhante ao fígado adulto, e no 14º dia a estrutura do espaço porta já se encontra totalmente formada (89, 96).

O pulmão das aves é uma estrutura extremamente complexa, capaz de dar o suplemento de oxigênio necessário para a grande demanda energética que ocorre no voo. Diferente dos mamíferos, os pulmões das aves não possuem alvéolos pulmonares, mas sim uma trama de afilados brônquios chamados de parabrônquios, que culminam nos sacos aéreos. Essa estrutura permite a hematose tanto na inspiração quanto na expiração. Após o 6º dia, o pulmão já está ocupando sua localização topográfica na cavidade celômica. Embora externamente sua estrutura esteja praticamente formada, internamente ainda ocorre intensa proliferação de células para formação da árvore brônquica. Os brônquios estão em crescimento, invadindo progressivamente o mesênquima que os envolve. Os brônquios primários se formam a partir do 4º dia de desenvolvimento, se ramificam em brônquios secundários após o 8º dia e derivam para parabrônquios após o 9º dia. Os sacos aéreos se formam a partir do 5º dia, aumentando em número até próximo ao momento da eclosão (97).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral:

Estudar histopatológica e molecularmente os tecidos embrionários de *Gallus gallus domesticus* provenientes de ovos utilizados na fabricação da vacina contra febre amarela, visando determinar os órgãos/tecidos embrionários envolvidos na biossíntese das partículas virais.

2.2. Objetivos específicos:

- Demonstrar as alterações morfológicas (macroscópicas e histopatológicas) nos tecidos de embriões de galinha infectados com os vírus FA 17DD provenientes da linha de produção da vacina contra febre amarela, tanto no ponto de produção da vacina (72 horas de infecção) quanto com 24, 48, e 96 horas de infecção;

- Pesquisar os órgãos envolvidos na biossíntese das partículas de vírus FA 17DD utilizadas na produção da vacina anti-amarílica através da detecção por imunofluorescência de proteínas virais, nos vários órgãos/ tecidos embrionários, nos diferentes pontos estudados;

- Pesquisar a presença do RNA genômico e do intermediário replicativo das partículas de vírus FA 17DD nos diferentes órgãos e tecidos nos pontos estudados, confrontando-a com os achados de imunofluorescência;

- Analisar, por sequenciamento, o produto amplificado por *nested*-PCR visando certificação quanto à fidelidade da detecção do material genômico.

3. Artigo I

Título: Yellow fever 17DD vaccine virus infection causes detectable changes in chicken embryos.

Manuscrito em submissão para a revista Plos Pathogens.

Resumo:

A vacina contra a febre amarela é uma das mais efetivas feitas para humanos. Esta vacina tem sido produzida desde 1937 a partir da inoculação do vírus FA 17D em ovos embrionados de galinha. Curiosamente, pouco se sabe sobre esta infecção em embriões de *Gallus gallus*. Com o objetivo de compreender as características da infecção pelo vírus da Febre Amarela neste modelo, estudamos através de técnicas histológicas, imunohistológicas e de biologia molecular, embriões utilizados na produção de vacina contra a febre amarela, infectados por 72 horas com 1000 PFU da subcepa FA 17DD. Observamos em alguns embriões poucos corpos apoptóticos nos tecidos infectados, sem a presença de reação inflamatória, sugerindo que a infecção era branda e focal. Utilizando a técnica de imunofluorescência para detectar proteínas virais e observando por microscopia confocal e super-resolução encontramos células infectadas nos músculos esquelético e cardíaco, no sistema nervoso, no epitélio tubular renal, no parênquima pulmonar, e em fibroblastos associados ao tecido conjuntivo da derme e do pericôndrio. Observamos que o músculo esquelético aparenta ser o principal sítio de replicação neste modelo. Em todos os espécimes onde proteínas virais foram detectadas, observamos a presença do RNA genômico e do intermediário replicativo. A caracterização das células responsáveis pela replicação viral neste modelo é útil na medida em que possibilita o desenvolvimento de estratégias de produção de uma vacina baseada em cultura de células com menor quantidade de proteínas de galinha.

Yellow fever 17DD vaccine virus infection causes detectable changes in chicken embryos

Pedro Paulo de Abreu Manso¹, Barbara C E P Dias de Oliveira¹, Patrícia Carvalho de Sequeira², Yuli Rodrigues Maia de Souza¹, Jessica Maria dos Santos Ferro¹, Igor José da Silva¹, Luzia Fátima Gonçalves Caputo¹, Priscila Tavares Guedes^{1,3}, Alexandre Araujo Cunha dos Santos², Marcos da Silva Freire⁴, Myrna Cristina Bonaldo², Marcelo Pelajo-Machado¹.

1- Laboratório de Patologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

2- Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

3- Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, UNIRIO, Brazil

4- Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract

The yellow fever (YF) 17D vaccine is one of the most effective human vaccines ever created. The YF vaccine has been produced since 1937 in embryonated chicken eggs inoculated with the YF 17D virus. Yet, little information is available about the infection mechanism of YF 17DD virus in this biological model. To better understand this mechanism, we infected embryos of *Gallus gallus domesticus* and analyzed their histopathology after 72 hours of YF infection. Some embryos showed few apoptotic bodies in infected tissues, suggesting mild focal infection processes. Confocal and super-resolution microscopic analysis allowed us to identify as targets of viral infection: skeletal muscle cells, cardiomyocytes, nervous system cells, renal tubular epithelium, lung parenchyma, and fibroblasts associated with connective tissue in the perichondrium and dermis. The virus replication was heaviest in muscle tissues. In all of these specimens, RT-PCR methods confirmed the presence of replicative intermediate and genomic YF RNA. This clearer characterization of cell targets in chicken embryos paves the way for future development of a new YF vaccine based on a new cell culture system.

Author Summary

Since 1937, the vaccine against yellow fever has been produced in chicken embryos without any critical modification. Despite this highly available and effective vaccine, yellow fever remains an important cause of morbidity and mortality in tropical regions of Africa and South America, mainly by maintaining the sylvatic cycle (in which mosquitoes transmit the virus from non-human primates to people who visit or work in the jungle). To our knowledge, the present study offers the first clear elucidation of cells and tissues associated with the biosynthesis of the 17DD yellow fever virus in chicken embryos. We detected that the virus causes only mild lesions in the embryos, but affects different cells and tissues, including: muscles, cells in the heart muscles and in

the nervous system, certain tissues in the kidneys and lungs, and collagen-producing cells that exist in connective tissues in the cartilage and skin. Identifying these cells may help scientists develop a cell-culture-based vaccine with lower chick protein content. This understanding is important because recent data indicate that the YF virus 17DD may serve as a platform to produce other new recombinant vaccines.

Introduction

Yellow fever (YF) is a viral disease associated with a flavivirus infection that affects individuals in the tropical regions of South America and Sub-Saharan Africa. The course of the disease may be mild, subclinical, or abortive (with flu-like symptoms), or severe. The severe form is pansystemic: it affects the liver, kidneys, and myocardium, and includes hemorrhage and shock. Over 50% of patients with severe YF die [1,2].

Studies have described the pathology and pathogenesis of YF in fatal human cases, and in experimental infections of non-human primates, golden hamsters, and mice [3-7]. However, all these models can only provide information on YF pathology of fatal cases. There are no available models for the study of moderate, mild, and subclinical forms of YF [6].

Natural infection happens when an infected mosquito bites a person and inoculates the virus into the dermis of the host. The inoculated virus at first infects dendritic cells in the skin, which are also susceptible to virus infection *in vitro* and likely play an important role in infection by other flavivirus such as Dengue [3,8-10]. Then, lymphatic vessels drain these cells to lymph nodes, where the virus is replicated and released into the bloodstream, causing the first viremia [3,8,11-13]. Once in hematogenous route, the virus can affect the liver, kidneys, heart, spleen, and other organs, infecting mainly hepatocytes, Kupffer cells, cardiomyocytes, and epithelial cells of the renal tubule [4,11]. Morphologically, infection of these cells may generate acidophilic corpuscles (in

the liver called Councilman corpuscles or Rocha-Lima lesions), microsteatosis, and apoptotic bodies [14]. The local inflammatory response, when compared to organ injuries, is not significant. Minimal or moderate infiltrates are observed in the portal space, with lymphocytes and monocytes predominating [11].

There is no antiviral treatment for this disease, and the only way to control it is to preventively vaccinate populations living in at-risk areas [1,2]. The YF 17D vaccine effectively protects over 98% of immunized individuals for at least ten years following vaccination. Despite the wide availability of this vaccine, YF continues to cause morbidity and mortality in tropical regions of Africa and South America [15]. In these regions, both persons residing in endemic or epizootic areas and unvaccinated travelers are at risk of infection.

Complicating matters, the vaccine is also contraindicated or demands precaution for a number of patients, including: those with allergies to eggs or other vaccine components (which are difficult to identify due to trade secret laws), women who are pregnant or breastfeeding, children less than six months old, individuals older than 60, transplant recipients, patients with AIDS, patients presenting primary immunodeficiency, and immunosuppressed patients with cancer or thymic diseases [16]. Although the YF vaccine is generally very safe and effective, viscerotropic and neurotropic vaccine-associated diseases have occurred, especially in patients with immunodeficiency or the elderly [17]. These vaccine-associated diseases can kill up to 65% of affected patients due to the lack of available treatment. The physiopathology of these unexpected reactions to the vaccine remains unclear [8].

The YF vaccine was developed from the sample Asibi, isolated from a patient named Asibi who survived YF in Ghana in 1927. The sample 17D became attenuated for humans after serial passages in chicken and mouse tissue cultures. Two main sub-samples were independently derived from 17D, called 17DD and 17D-204 [18]. The sample 17DD was first used in Brazil in 1937, and approximately 500 million doses have been administered worldwide since the seed lot system was introduced in 1945 [19]. The vaccine is still produced today by inoculating 17DD YF virus in ninth day embryonated chicken

eggs free of specific pathogens (SPF), which are processed 72 hours later according to the standards set by the World Health Organization [19]. Although chicken embryos have been used since 1937 to produce the YF virus, the histopathology of this infection is scarcely studied and the molecular mechanisms that regulate the viral infection in this biological system are still not well understood. For instance, it is not known which cells biosynthesize 17DD viral particles in infected chicken embryos. This knowledge would be of great importance, since these virus-producing cells would be the initial candidates for the future development of a YF vaccine based on a cell culture system. In this study, our aim was to establish which tissues and cells are responsible for YF viral production, and to characterize the 17DD YF virus infection in *Gallus gallus domesticus* embryos in terms of the histopathological changes mediated by the viral infection in conditions similar to those used in the production of YF vaccine. Our data contribute to the literature of the histopathology of the chicken biological system, and help advance the knowledge of the histopathological peculiarities involved in the pathogenesis of YF. Identifying these competent cells could help researchers develop a vaccine with lower non-viral protein content, based on a cell culture system. A vaccine with lower chick protein content has the potential to reduce allergic and other adverse reactions, and therefore to help at least a subset of the population for whom the traditional vaccine is counter-indicated.

Material and methods

Biological System

Fertilized White Leghorn chicken eggs (*Gallus gallus domesticus*; Linnaeus, 1758) were obtained from the YF vaccine production unit (FIOCRUZ). Infection-free eggs were obtained, as well as eggs infected with YF virus 17DD strain in the ninth day of development according to the vaccine production protocol [20]. Eggs were kept in an IP70 brooder (Premium Ecologica, Brazil) with controlled temperature at 37.5 °C, and 55% relative air humidity. As

negative controls, embryos kept under the same conditions were inoculated with water for injection. For all analyses, embryos were collected at 72 hours post infection (12 days of development).

Histopathological Analysis

Chicken embryos, yolk sacs, and chorioallantoic membranes were collected and dissected. Membranes were cleaved in regions defined by quadrants. For each embryo, the head, whole wings, and whole legs were separated from the trunk, and subsequently cleaved. The trunks were transversely sectioned into subsequent samples of about 3 mm. All fragments were fixed in Carson`s formalin-Millonig for 48 hours at room temperature [21], and processed according to standard histological techniques for paraffin embedding. Sections (5 µm thick) were stained with hematoxylin-eosin [22]. The slides were analyzed in an Axiovert Z1 microscope (Carl Zeiss, Germany), and the images were acquired with an mRC5 Axiocam digital camera (Carl Zeiss, Germany).

Immunofluorescence Assay

Twenty-four hours after they were obtained, sections of all paraffin blocks from infected and control animals were de-waxed, dehydrated, and washed in PBS. Antigenic retrieval was carried out in 0.01 M citrate buffer pH 6.0 in Pascal chamber (Dako, USA), according to the manufacturer`s recommendations. The sections were incubated with a blocking solution (2% skimmed milk, 2.5% bovine serum albumin, and 8% fetal bovine serum in the same buffer) in a humid chamber for 30 minutes at room temperature, and kept overnight with an anti-YF virus antibody at 4 °C. Two polyclonal mouse antibodies directed against YF virus were used (Yellow Fever virus hyperimmune serum – Evandro Chagas Institute, and Yellow Fever 17D hyperimmune ascitic fluid cod. V525701562 – NIH). There was no difference between the anti-YF antibodies: both recognized the same set of cells, and did not react in negative controls. AlexaFluor 488-conjugated goat anti-mouse secondary antibody in 1:750 dilution (cat. A11001, Life Technologies, USA) was applied at 37 °C for 1 hour

followed by counterstaining with 1:5,000 DAPI (cat. 03571, Molecular Probes, USA). Double staining used an anti-desmin antibody in 1:100 dilution (cat. RB-9014, Thermo Scientific, USA) applied at 37 °C for 1 hour followed by an AlexaFluor 546-conjugated goat anti-Rabbit secondary antibody in 1:750 dilution (cat. A11010, Life Technologies, USA). Negative controls were performed by duplicating each sample and omitting treatment with the primary antibodies, so that any reactions resulting from the secondary antibodies or reagents employed in the analyses could be adequately traced. Sections were mounted in ProlongGold (cat. P36934, Life Technologies, USA) and analyzed in an LSM 710 or LSM 880 Airyscan confocal microscope or an ELYRA SR-SIM microscope (Carl Zeiss, Germany).

Nested-PCR

RNA samples were extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue from the same blocks used in immunofluorescence analysis, which were either positive or negative to 17DD virus. Two 10µm thick sections were put in a microtube and submitted to PureLink FFPE Kit (cat. 45-7015, Life Technologies, USA), according to the manufacturer's recommendation for RNA extraction. RNA samples eluted after the procedure were amplified by Reverse Transcription-PCR carried out with Thermoscript RT-PCR kit (cat. 11146016, Life Technologies, USA), with universal Flavivirus primers described by Tanaka [23] (YF1 – 5` GGTCTCCTCTAACCTCTAG 3` and YF3 – 5` GAGTGGATGACCACGGAAGACATGC 3`). After that, a second amplification was carried out with internal primers designed by our group (YF2 – 5` CGAGTTTTGCCACTGCTAAGCT 3` and YF4 – 5` TAGACCCCGTCTTTCTACCACC 3`). Two different protocols were performed using specific primers in RT-PCR using forward and reversed YF-1 and YF-3 primers to detect the genomic RNA and the replicative intermediate. After amplification, the nested-PCR product was sequenced in DNA Analyzer ABI 3730 (Applied Biosystems, USA), and aligned to the YF Virus 17DD genomic sequence (GenBank U17066.1) using ClustalW2 [24].

Results

Histopathological Changes Associated with YF Infection

Different embryonic tissues were stained with hematoxylin and eosin to investigate the histopathological alterations caused by the YF 17DD at 72 hours post-infection. In most cases, few differences in controls and infected embryos were observed. However, some embryos had mild focal reactions to infection, expressed by apoptotic bodies in infected tissues, including muscular tissue (Figure 1 A, B), renal tubular epithelium (Figure 1C), parenchyma of the gizzard (Figure 1 D, E), and fibroblastoid cells in perichondrium (Figure 1 F).

In addition, both infected and control embryos showed extensive areas of hematopoiesis in the yolk sac, which presented scattered blastoid cells in perivascular sheaths. The bone marrow of some embryos (infected and controls) was already formed and functional. In this embryonic stage, gastric and respiratory epithelia were developing and showed heterogeneous cellular morphology, and sometimes apoptotic cells.

Detection of YF Infection Sites by Immunofluorescence Microscopy

Because our histopathological data revealed mild changes that could be associated with YF viral infection, we decided to analyze several tissues of YF-infected embryos using more sensitive techniques: specifically, confocal and super-resolution immunofluorescence microscopy. Using anti-YF antibodies, we clearly identified viral proteins in skeletal muscle tissue (Figure 2), cardiomyocytes (Figure 3), neurons and glial cells in the brain (Figure 4 A, C), spinal cord neurons (Figure 4B), renal tubular epithelium (Figure 5), lung parenchyma (Figure 6 A and B), and fibroblasts associated with connective tissue in the perichondrium (Figure 6 C) and dermis (Figure 6 D).

We also found either isolated and intense positive cells (or small cell clusters) contrasting with extensive negative cell areas in all studied tissues.

These YF-infected cells had a characteristic staining pattern with perinuclear and hypertrophied endoplasmic reticulum, and vesicles dispersed throughout the cytoplasm (Figure 2 B, D and 4C). When analyzed by super-resolution microscopy with 0.16 μm optical slice, the endoplasmic reticulum and vesicles carrying viral proteins were more evident (Figure 7 and 8).

The viral antigen was found in skeletal muscle cells throughout the body of the embryos. The infection affected the entire length of some muscle bundles (Figure 2A), where sometimes viral antigen detection followed the striations of the cytoskeleton (Figure 2 B and 8). In some regions, it was possible to identify cells with pyknosis and karyorrhexis figures close to infected cells (Figure 2 B). At least at 72 hours post infection, the striate muscle tissue seemed to be an important site of production of the YF 17DD virus in embryos of *Gallus gallus domesticus*. The infection affected muscle bundles of the head, trunks, legs, and wings of the chicken embryos. However, the distribution of infected cells was similar across these regions. An anti-desmin antibody was then used to improve the identification of the muscle fibers, and showed a strong positive result in these cells (Figure 2 C, D).

Virus proteins forming positive clusters were found in focal areas of the heart (Figure 3). Double staining with the desmin antibody revealed that only cardiomyocytes were infected (Figure 3B).

In the brain (Figure 4 A and C), the number and localization of positive cells varied among embryos, with the cerebellum showing the highest number of positive cells. In some embryos, isolated neurons in the spinal cord were positive for virus production (Figure 4B), and we identified positive cells with a fibroblastoid pattern in the meninges (Figure 4D).

Viral antigens were identified in some epithelial cells of the kidney tubules, with an intense cytoplasmic pattern (Figure 5). The infection occurred in one or more cells per tubule section. Often, the presence of fluorescent vesicles suggests virus excretion to the lumen of the tubules (Figure 5 B and C). On the other hand, Bowman's capsule was always negative to virus protein labeling.

In some embryos, virus proteins were observed in mesenchymal cells of the lung parenchyma surrounding the bronchi and parabronchi (Figure 6A).

These cells were strongly positive for desmin (Figure 6B). The lung epithelium of all animals was free of viral antigens.

Besides the positive organs and cells, we also detected viral protein labeling in fibroblastoid cells along the bodies of some animals (in isolated areas of the subepithelial connective tissue) (Figure 6D). A few animals also had positive fibroblastoid cells in the muscular gizzard region (Figure 6E).

Using immunofluorescence, we were able to detect the virus in cells of the muscular layer of yolk stalk of one animal (Figure 6F). All cells in the vitelline and in the chorioallantoic membranes were negative. Remarkably, the livers of chicken embryos were always free of viral antigens, suggesting that at least in this embryonic stage and time of infection, the liver of *Gallus gallus domesticus* may be impervious to YF infection.

Detection of Genomic and Intermediated Replicative YF RNA from FFPE Samples by Nested-PCR Assays

We confirmed the pattern of YF17DD virus distribution in different tissues using RNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues (FFPE) followed by viral RNA amplification by Nested-PCR. This technique showed itself to be sensitive enough to amplify RNA viral fragments, and it was possible to detect genomic viral RNA in all immunofluorescence positive blocks. We were able to detect amplicons of 156 bp (the expected size products corresponding to the YF genome position from 10556 to 10711) in specimens from the legs, wings, head, and trunks of all YF 17DD-infected embryos. Fragments from the chorioallantoic and vitelline membranes were negative in both molecular biology and immunofluorescence assays (Figure 9). Notably, amplicons in positive specimens were obtained from viral RNA using either the specific primer to the viral genome, or the replicative intermediate, indicating active replication of viral RNA (Figure 9). We then sequenced the amplicons of these samples and compared them to the viral genome of the strain 17DD, finding 100% identity. Corroborating the specificity of this analysis, control animals and blocks without viral antigen (which were negative in the

immunofluorescence microscopic studies) were all negative in the genomic viral RNA detection.

Discussion

The YF vaccine is one of the most successful human vaccines ever made. Yet, until recently little was known about its mechanisms of immunity [25]. Similarly, although the 17DD vaccine has been produced in embryonated chicken eggs since 1937, the properties of viral proliferation in this model were poorly elucidated.

The present results show that in *Gallus gallus* embryos, the yellow fever 17DD virus is replicated in skeletal muscle cells (Figure 2), cardiomyocytes (Figure 3), renal tubular epithelium (Figure 5), lung parenchyma (Figure 6 A and B), fibroblastoid cells of the connective tissues (Figure 6C and D), and in glial cells and neurons (Figure 4 A and C). Our data also show that the skeletal muscle tissue has an important role in production of yellow fever 17DD viral particles, whereas no infection (including acidophilic corpuscles or steatosis) was detected in the liver. To clarify these findings and to test if the liver might become infected at a different stage, further studies should be conducted at different times of infection.

To emulate conditions used in YF vaccine manufacturing, we chose to work with 12-day-old chicken embryos inoculated with the YF vaccine virus and analyzed after 72 hours of infection [18,20]. While this increases the validity of the present study, in this stage, the events related to the normal embryo formation and the high rate of cell proliferation complicate the identification of histopathological changes putatively associated with the viral infection events. For example, the bone marrow formation starts and there is a high granulocytic and erythrocytic production in the yolk sac [26]. Because the immune system is still immature, the virus spreads and proliferates more easily [27-29]. The lung epithelium and gastrointestinal tract are under development, presenting cells in mitosis and apoptosis, as well as cells with cytoplasmic budding. To establish that these findings were not directly related to the infection it was necessary to study a sufficient number of embryos, and to use the sensitive immunostaining

approach. As a result, we detected the sites of viral proliferation in a broad range of cell types from different tissues. Examining the positive cells with hematoxylin and eosin-stained serial sections allowed us to observe that some apoptotic cells were related to the viral infection (Figure 1).

Molecular tools were performed to corroborate the specificity of our results. Using RT-PCR we were able to detect viral genomic RNA in all immunofluorescence positive blocks (Figure 9). In contrast, the blocks where the infection was not detected by immunofluorescence were also negative to viral genomic RNA. Every PCR product was sequenced and compared with 17DD yellow fever virus reference genome. In samples where viral RNA was amplified, the presence of the replicative intermediate was evidenced, suggesting that viral replication is occurring where the virus protein was detected.

An intracellular pattern of viral antigen location could be clearly seen in infected cells (Figure 2 B, D and 4C). We observed cells with intensive perinuclear labeling, consistent with the endoplasmic reticulum location, and a pattern suggesting cytoplasmic vesicular exocytosis. In muscular cells, the viral proteins detected follow the pattern of striations of the cytoskeleton consistent with the sarcoplasmic reticulum localization (Figure 2 B, D, as well as 7 and 8), showing the commitment of this organelle in virus production.

Although the steps of cell interaction, assembly, and exit of the YF virus in the host cell are not fully understood, these mechanisms have been documented in other flaviviruses. The intracellular localization pattern we observed is consistent with that described for other flaviviruses, where the assembly of the viral particles happens in the surface of the endoplasmic reticulum, and their elimination is carried out by exocytosis [2,3,8,19,30,31].

Studies of wild yellow fever virus pathology in humans, hamsters, and non-human primates show that the liver, kidneys, and heart are the organs most affected by infection [3-7,32-34]. Fatal cases of vaccine-adverse diseases usually have the same histopathological findings as the wild YF infection [17,35,36]. Our results suggest that the livers of chickens are not affected by the

infection. The kidneys were positive in the tubular epithelium without apparent involvement of the glomerulus (Figure 5). The infection of the kidney tubular epithelium cells by yellow fever virus has been demonstrated in humans and Rhesus monkeys, who, unlike our chicken embryos, also experienced renal failure [8,37]. Although some cells undergoing apoptosis were found in the same areas where viral antigens were detected (Figure 1C), apparently the *Gallus gallus* kidney damage is mild relative to severe cases in humans. It was interesting to find the virus in the lumen of the renal tubular epithelium (Figure 5B, C), because others have found the vaccinal 17DD virus in the urine of vaccinated patients [38].

We also detected the virus and apoptotic cells in the myocardium of infected animals (Figure 3). The presence of virus in the heart has been identified in humans, where viral antigens are found in the myocardium of infected patients, with a necroapoptotic and steatosis profiles similar to what is observed in the kidneys and liver [8,37]. In the present model, we did not find any steatosis, and although apoptotic figures were seen in the affected areas, there was no associated necrosis.

In this study, infected skeletal muscle cells were found throughout the bodies of the embryos. Because of its large area and the observed intensity of infection, this tissue could be the major site of viral replication. Since no other work on the pathology of YF infection mentions skeletal muscle infection, this finding is unprecedented. Yet, our results corroborate Fox and Laemmert's [39] identification of higher viral titers in muscle and nerve tissues after 72h of infection. Although no other data on YF skeletal muscle infection are available, clinically it is known that one of the main symptoms of yellow fever is muscle pain, in addition to the significant increase of aminotransferases in critically ill patients, which can be explained by the cytopathic effect in cardiac and skeletal muscle [3,4]. Although it is necessary to examine this phenomenon in humans, infection of these cells (and the consequent rhabdomyolysis observed) could justify these symptoms. Conversely, other arboviruses associated with symptoms of muscular pain similar to those seen in YF, such as Chikungunya

[40], Mayaro [41], and Ross River [42] viruses, can infect muscle cells in humans and in experimental models.

In *Gallus gallus*, desmin expression is not restricted to skeletal muscle cells, but also occurs in mesenchymal-like cells. The anti-desmin antibody helps to detect skeletal muscle cells in different regions of the animal, and allows the disclosure of mesenchymal infected cells in the lung parenchyma (Figure 6 A and B). Different tissues also showed rare infected fibroblastoid cells (Figure 6). The infection of fibroblasts in culture is already known [43], but apparently the susceptibility to infection of these cells *in vivo* seems less expressive than *in vitro*, at least at 72 hours post infection. Although the yolk sac is the site of virus inoculation, this extraembryonic membrane showed no evidence of infection. Only fibroblastoid cells in the muscular layer of the yolk stalk were positive (Figure 6F). Likewise, molecular detection techniques also showed the chorioallantoic membrane was negative. Our results do not corroborate Fox and Laemmert's detection of virus titer in extracts of these membranes [39].

The 17DD strain maintains some neurovirulence, observed when a virus sample is intracerebrally inoculated in mice and non-human primates. In addition, rare cases of vaccine-associated neurotropic disease (YEL-AND) have been documented in children younger than 9 months, mainly due to the immaturity of the blood–brain barrier. Patients with immunodeficiency also show documented YEL-AND cases [1,8,25]. In this study, we observed animals with infection in the brain (Figure 4A and C), cerebellum, and spinal cord cells (Figure 4B), probably also due to immaturity of the blood–brain barrier, which is formed in chicken embryos after 15 days of development [44].

The lack of inflammation in the affected tissues could be due to the immature immune system of these animals [27-29], but it may also be related to characteristics of YF. In affected tissues, infected cells were either isolated or present in small clusters, suggesting that the infection is mild in most of these tissues. Overall, there was great variability in response and susceptibility to infection among our sample, possibly because *Gallus gallus* is not an isogenic

animal. Yet, despite the YF 17DD infection, most of the animals, when left under favorable conditions, are born without any sequelae of the disease [39].

In conclusion, our data suggest that YF 17DD infection of *Gallus gallus* embryos is mild and systemic, and affects various tissues and cells with different embryonic origins; however, not all cells are susceptible to virus infection. The skeletal muscle tissue seems to be the main site of production of the YF 17DD virus due to its large body area and the intensity of its cell labeling.

The elucidation of cell and tissue competence could help develop new possibilities for producing the YF 17D virus (e.g., in cell cultures). This approach could, in turn, minimize problems related to high levels of chicken proteins in the vaccine [43,45]. Our data are particularly relevant to this problem because recent studies have suggested the possibility of using virus 17DD as another vaccine production platform, in which 17DD has proved to be an effective viral vector to recombinant proteins of other flaviviruses (including Japanese encephalitis, West Nile, and dengue viruses), and of other unrelated organisms, such as *Plasmodium yoelli* and *Trypanosoma cruzi* [46-48]. Nevertheless, further studies are needed to better elucidate YF infection, and to establish how it occurs in humans. Of particular interest, kinetic studies should seek to clarify, for example, when and how viral particles reach the organs and tissues identified in the present work.

Acknowledgments

The authors would like to thank Luciana Silva Souza and Luzia Helena Pereira Barros for histological technical assistance, Rodrigo Mexas (Image Production and Treatment Facility) for assistance with image processing, Dr. Rita Maria Ribeiro Nogueira and Dr. Flavia Barreto dos Santos for providing one of the antibodies against the yellow fever virus, Clara Soares Viga (Molecular Biology of Flavivirus Laboratory-IOC), José Marcus Malachias, Marcelo de

Oliveira, and Carlos Alberto Frota (Biomanguinhos) for their technical assistance, Dr. Carlos Jorge Logullo de Oliveira and Marcelle Vianna de Carvalho Uhl (UENF) for access to the confocal microscope, Yilmaz Niyaz, Sebastian Wiesner (ZEISS Microscopy Labs Munich) for access to Super-resolution microscopy, and the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTISFIOCRUZ for use of the DNA analysis facility.

This manuscript was reviewed by a professional science editor and by a native English-speaking copy editor to improve readability.

References

1. Barrett AD, Teuwen DE (2009) Yellow fever vaccine—how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? *Current opinion in immunology* 21: 308-313.
2. Pastorino B, Nougairède A, Wurtz N, Gould E, de Lamballerie X (2010) Role of host cell factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. *Antiviral research* 87: 281-294.
3. Monath TP (2001) Yellow fever: an update. *The Lancet infectious diseases* 1: 11-20.
4. da Costa Vasconcelos PF (2003) Febre amarela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36: 275-293.
5. Bearcroft W (1957) The histopathology of the liver of yellow fever-infected rhesus monkeys. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 74: 295-303.
6. Xiao S-Y, Zhang H, Guzman H, Tesh RB (2001) Experimental yellow fever virus infection in the Golden hamster (*Mesocricetus auratus*). II. Pathology. *Journal of Infectious Diseases* 183: 1437-1444.
7. Tesh RB, Guzman H, da Rosa APT, Vasconcelos PF, Dias LB, et al. (2001) Experimental yellow fever virus infection in the Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). I. Virologic, biochemical, and immunologic studies. *Journal of Infectious Diseases* 183: 1431-1436.
8. Monath TP, Barrett AD (2003) Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever. *Advances in virus research* 60: 343-395.
9. Barba-Spaeth G, Longman RS, Albert ML, Rice CM (2005) Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. *The Journal of experimental medicine* 202: 1179-1184.
10. Marovich M, Grouard-Vogel G, Louder M, Eller M, Sun W, et al. Human dendritic cells as targets of dengue virus infection; 2001. Nature Publishing Group. pp. 219-224.
11. Quaresma JA, Pagliari C, Medeiros D, Duarte MI, Vasconcelos PF (2013) Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress

- and challenges in the immunopathology of yellow fever. *Reviews in medical virology* 23: 305-318.
12. Quaresma JAS, Barros VLRS, Fernandes ER, Pagliari C, Guedes F, et al. (2006) Immunohistochemical examination of the role of Fas ligand and lymphocytes in the pathogenesis of human liver yellow fever. *Virus research* 116: 91-97.
 13. Quaresma JA, Barros VL, Pagliari C, Fernandes ER, Guedes F, et al. (2006) Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF- β , TNF- α and NK cells activity. *Virology* 345: 22-30.
 14. Quaresma JA, Barros VL, Pagliari C, Fernandes ER, Andrade Jr HF, et al. (2007) Hepatocyte lesions and cellular immune response in yellow fever infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 101: 161-168.
 15. Robertson SE, Hull BP, Tomori O, Bele O, LeDuc JW, et al. (1996) Yellow fever: a decade of reemergence. *Jama* 276: 1157-1162.
 16. Staples JEG, M.; Fischer, M. (2010) Yellow fever vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *MMWR Recomm Rep* 59: 1-27.
 17. Lown BA, Chen LH, Wilson ME, Sisson E, Gershman M, et al. (2012) Vaccine administration decision making: the case of yellow Fever vaccine. *Clinical Infectious Diseases* 55: 837-843.
 18. Post PR, Carvalho Rd, Freire MdS, Galler R (2001) The early use of yellow fever virus strain 17D for vaccine production in Brazil-a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 849-857.
 19. Heinz FX, Stiasny K (2012) Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine* 30: 4301-4306.
 20. Benchimol JL (2001) Febre amarela: a doença ea vacina, uma história inacabada; Yellow fever: the disease and the vaccine, an unfinished history: Fiocruz.
 21. Carson F, Martin J, Lynn J (1973) Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *American Journal of Clinical Pathology* 59: 365.
 22. Mayer P (1903) Notiz über Hämatein und Hämalan. *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technick* 20: 409.
 23. Tanaka M (1993) Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction. *Journal of virological methods* 41: 311-322.
 24. McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, et al. (2013) Analysis tool web services from the EMBL-EBI. *Nucleic acids research* 41: W597-W600.
 25. Pulendran B (2009) Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. *Nature Reviews Immunology* 9: 741-747.
 26. Guedes PT, de Abreu Manso PP, Caputo LFG, Cotta-Pereira G, Pelajo-Machado M (2014) Histological Analyses Demonstrate the Temporary Contribution of Yolk Sac, Liver, and Bone Marrow to Hematopoiesis during Chicken Development. *PloS one* 9: e90975.
 27. Lowenthal J, Connick TE, McWaters PG, York JJ (1994) Development of T cell immune responsiveness in the chicken. *Immunology and cell biology* 72: 115-122.
 28. Vargas A, Zeisser-Labouèbe M, Lange N, Gurny R, Delie F (2007) The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the *in vivo* evaluation of drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59: 1162-1176.
 29. Davison T (2003) The immunologists' debt to the chicken. *British poultry science* 44: 6-21.

30. Lindenbach BD, Rice CM (2003) Molecular biology of flaviviruses. *Advances in virus research* 59: 23-61.
31. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG (2005) A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology* 3: 13-22.
32. Sbrana E, Xiao S-Y, Popov VL, Newman PC, Tesh RB (2006) Experimental yellow fever virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) III. Clinical laboratory values. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 74: 1084-1089.
33. Hudson NP (1928) The Pathology of Experimental Yellow Fever in the Macacus Rhesus: II. Microscopic Pathology. *The American journal of pathology* 4: 407.
34. Hudson NP (1928) The Pathology of Experimental Yellow Fever in the Macacus Rhesus: III. Comparison with the Pathology of Yellow Fever in Man. *The American Journal of Pathology* 4: 419.
35. Rowland M, Plackett TP, Smith R (2012) Yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease. *Military Medicine* 177: 467-469.
36. Vasconcelos PF, Luna EJ, Galler R, Silva LJ, Coimbra TL, et al. (2001) Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases. *The Lancet* 358: 91-97.
37. De Brito T, Siqueira S, Santos R, Nassar E, Coimbra T, et al. (1992) Human fatal yellow fever: immunohistochemical detection of viral antigens in the liver, kidney and heart. *Pathology-Research and Practice* 188: 177-181.
38. Domingo C, Yactayo S, Agbenu E, Demanou M, Schulz AR, et al. (2011) Detection of yellow fever 17D genome in urine. *Journal of clinical microbiology* 49: 760-762.
39. Fox JP, Jr HWL (1947) The cultivation of yellow fever virus II. Observations on the infection of developing chick embryos. *The American journal of Hygiene* 46: 21 -40.
40. Ozden S, Huerre M, Riviere J-P, Coffey LL, Afonso PV, et al. (2007) Human muscle satellite cells as targets of Chikungunya virus infection. *PLoS One* 2: e527.
41. Shawn F. Taylor MD, Paresh R. Patel MD, Thomas J.S. Herold MD (2005) Recurrent Arthralgias in a Patient With Previous Mayaro Fever Infection. *Southern Medical Journal* 98: 484-485.
42. Seay AR, Griffin DE, Johnson RT (1981) Experimental viral polymyositis Age dependency and Immune responses to Ross River virus infection in mice. *Neurology* 31: 656-656.
43. Freire MS, Mann GF, Marchevsky RS, Yamamura AM, Almeida LF, et al. (2005) Production of yellow fever 17DD vaccine virus in primary culture of chicken embryo fibroblasts: yields, thermo and genetic stability, attenuation and immunogenicity. *Vaccine* 23: 2501-2512.
44. Wakai S, Hirokawa N (1978) Development of the blood-brain barrier to horseradish peroxidase in the chick embryo. *Cell and tissue research* 195: 195-203.
45. Rutkowski K, Ewan P, Nasser S (2013) Administration of Yellow Fever Vaccine in Patients with Egg Allergy. *International archives of allergy and immunology* 161: 274-278.
46. Guy B, Guirakhoo F, Barban V, Higgs S, Monath TP, et al. (2010) Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses. *Vaccine* 28: 632-649.
47. Nogueira RT, Nogueira AR, Pereira MC, Rodrigues MM, Galler R, et al. (2011) Biological and immunological characterization of recombinant Yellow Fever

- 17D viruses expressing a Trypanosoma cruzi Amastigote Surface Protein-2 CD8+ T cell epitope at two distinct regions of the genome. Virol J 8: 127.
48. Bonaldo MC, Sequeira PC, Galler R (2014) The yellow fever 17D virus as a platform for new live attenuated vaccines. Human Vaccines & Immunotherapeutics 10: 0--1.

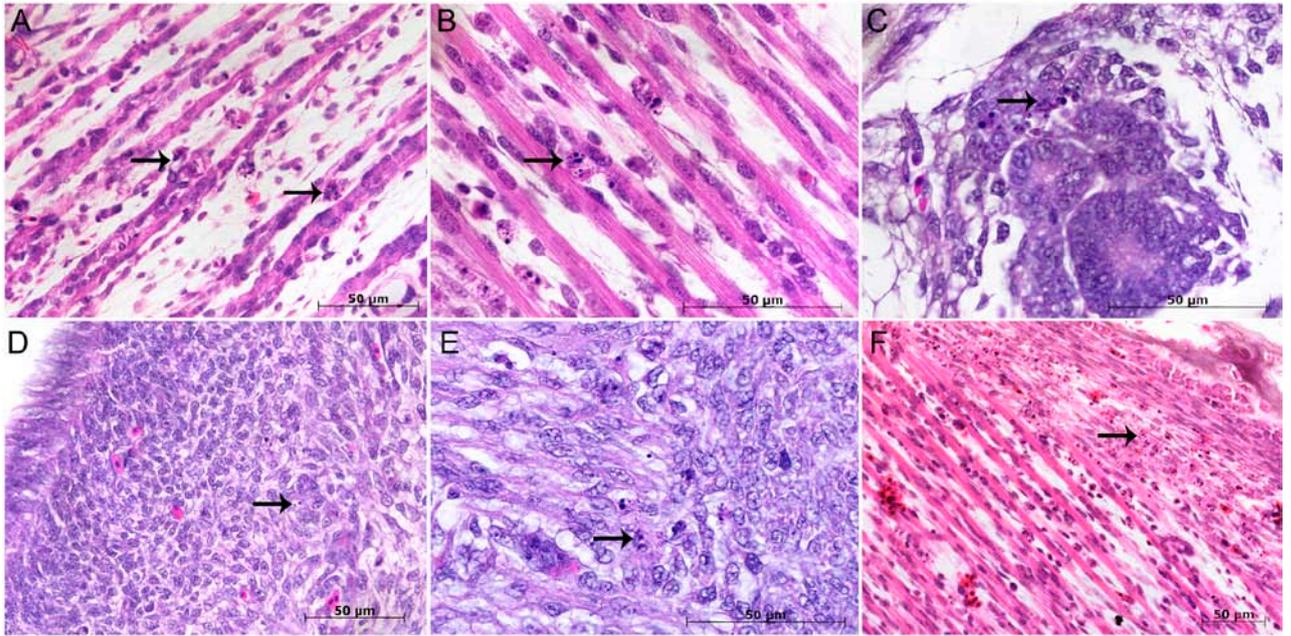


Figure 1. Brightfield microscopy of tissues of *Gallus gallus domesticus* 72hpi with Yellow Fever 17DD virus. (A) Apoptotic bodies in skeletal muscular tissue; (B) detail of karyorrhexis in muscular bundles; (C) Apoptotic bodies in tubular epithelium; (D) Apoptotic bodies in muscular region of gizzard; (E) detail of apoptotic bodies in the muscular layer of the gizzard; (F) Apoptotic bodies in fibroblastoid cells of perichondrium. Apoptotic nuclei are indicated by black arrow (→). Hematoxylin and Eosin stain

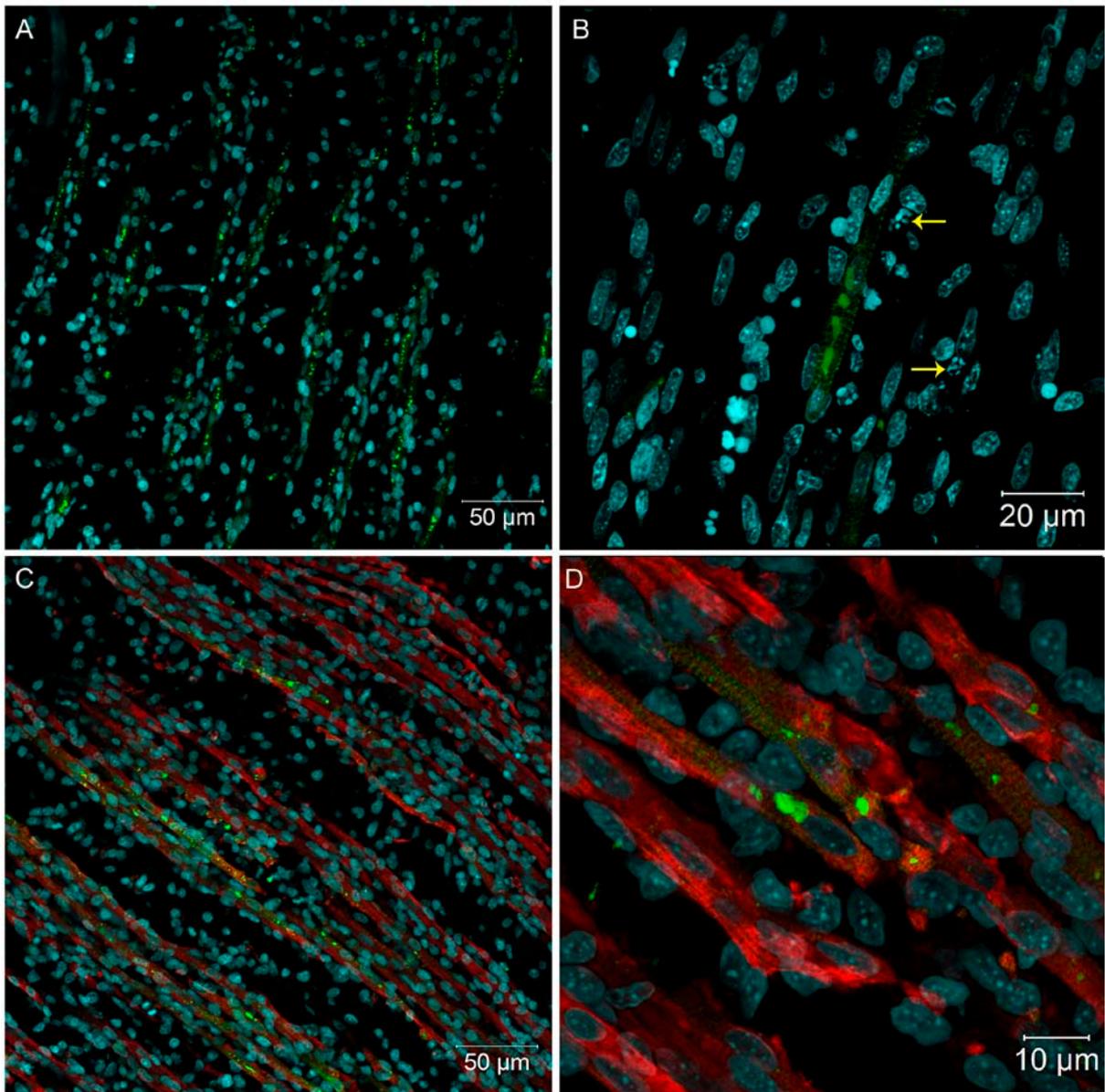


Figure 2. Immunofluorescence in skeletal muscle tissue of chicken embryos at 72 hpi with 17DD virus. Polyclonal antibodies directed against the Yellow Fever Virus were used to immunostain virus proteins in: (A) skeletal muscle cells bundles; (B) Skeletal muscle cells showing perinuclear thickening and presenting an intense labeling in sarcoplasmic reticulum following the striations of the cytoskeleton - Yellow arrows (→) show Pyknosis and karyorrhexis close to infected cells; and (C) Skeletal muscle cells evidenced by desmin antibody and showing the virus infection of the muscular bundles. (D) Detail of the infected muscular bundles, showing the perinuclear positivity together with striations. Yellow fever virus staining in green, nuclei stained with DAPI in blue and desmin in red.

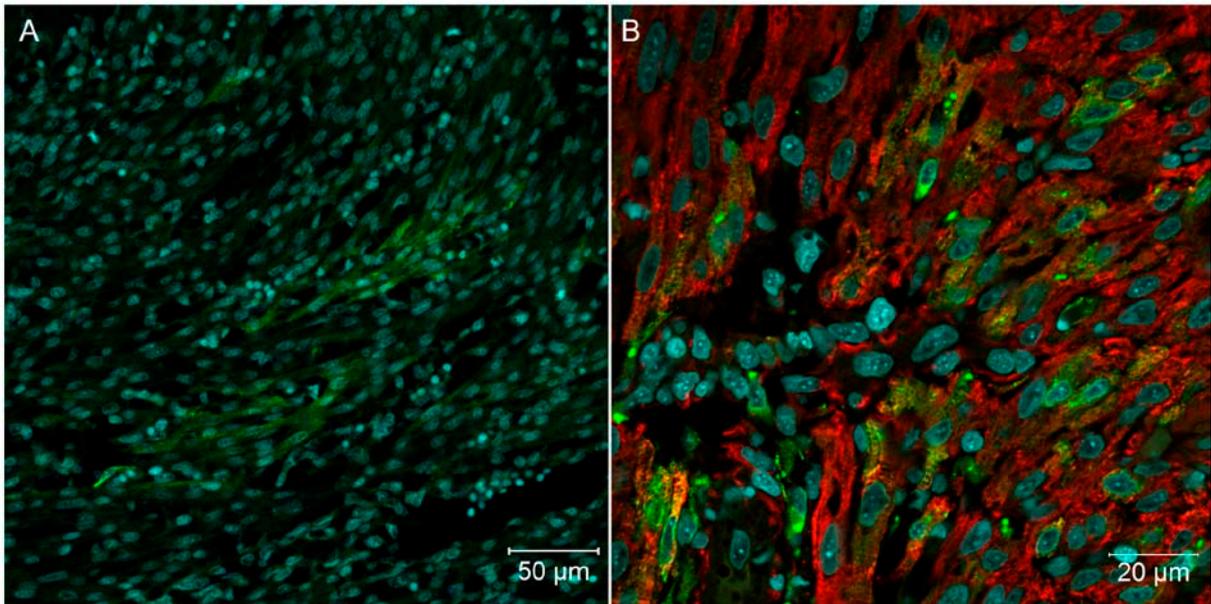


Figure 3. Heart muscular tissue of *Gallus gallus domesticus* at 72 hpi with Yellow Fever 17DD virus. (A) Infected heart muscle cells; (B) Desmin positive heart muscle cells showing perinuclear virus proteins distribution and striated pattern compatible with sarcoplasmic virus proteins distribution. Yellow fever viral antigens detection in green, nuclei stained with DAPI in blue and desmin in red.

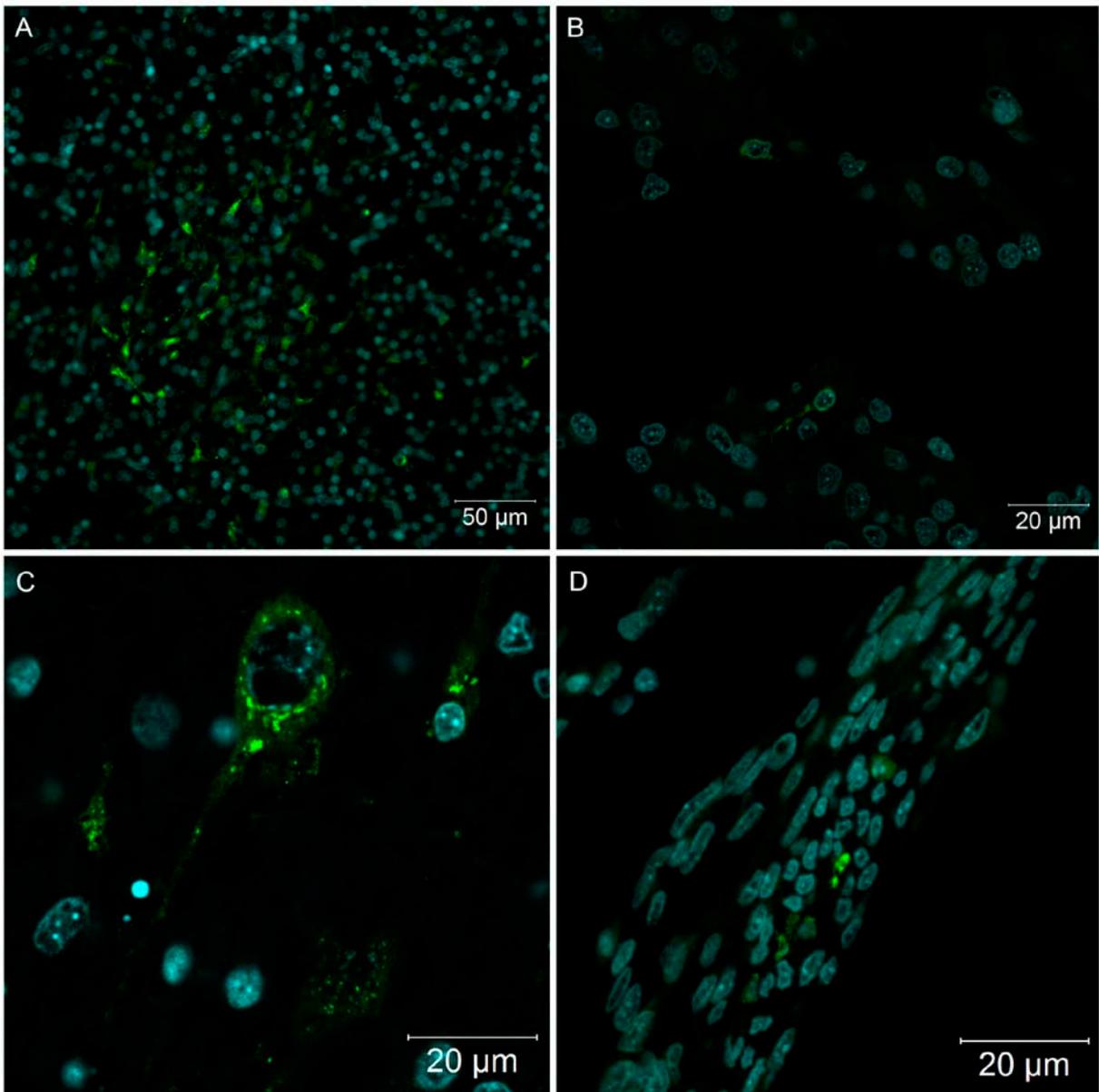


Figure 4. Nervous system of *Gallus gallus domesticus* at 72 hpi with Yellow Fever 17DD virus. (A) Brain section presenting some infected neurons and glial cells; (B) Spinal cord infected neurons; (C) One neuron of the brain showing perinuclear thickening and vesicles dispersed throughout the cytoplasm; (D) Infected fibroblastoid cells along the meninges. Yellow fever virus proteins detection in green and nuclei stained with DAPI in blue.

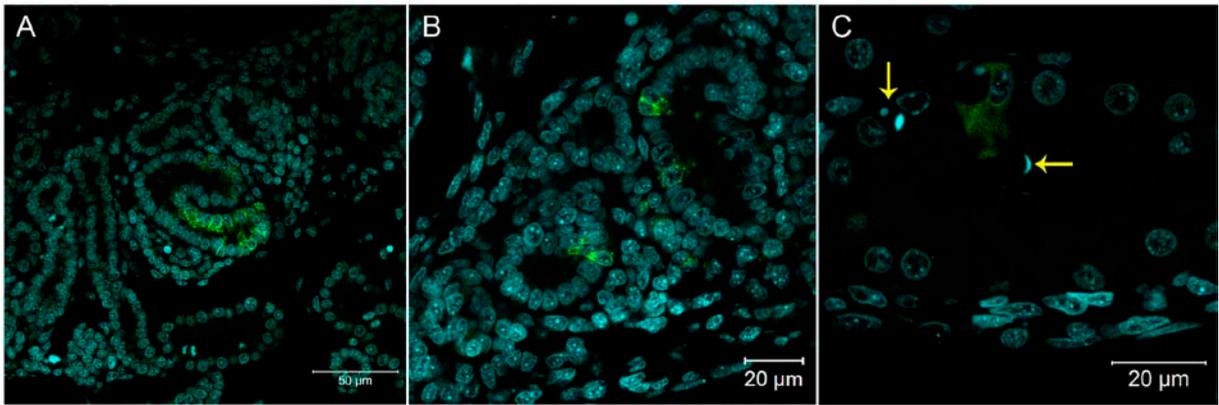


Figure 5. Tubular epithelial cells in *Gallus gallus domesticus* at 72 hpi with Yellow Fever virus. (A, B) Infected kidney tubular epithelium cells; (C) fluorescent vesicles inside tubular kidney cells, suggesting virus excretion to the lumen of the tubules, pyknotic nuclei are indicated by yellow arrow (→). Yellow fever virus detection in green and nuclei stained with DAPI in blue.

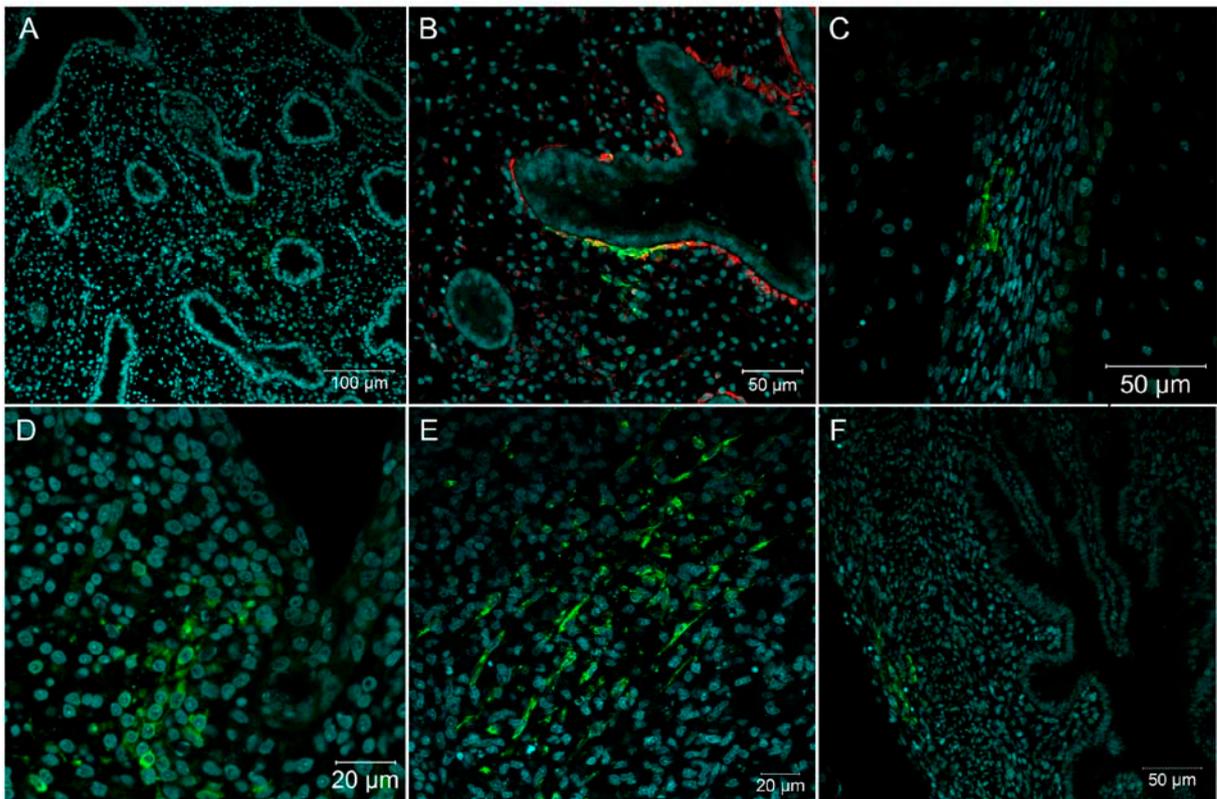


Figure 6. Fibroblastoid cells in different sites of *Gallus gallus domesticus* at 72 hpi with 17DD virus. (A) Parenchyma lung cells surrounding the parabronchi epithelium; (B) detail of parenchymal positive cells with desmin expression; (C) Infected fibroblastoid cells along the perichondrium; (D) Infected cell cluster in subepithelial connective tissue; (E) Infected cells in the muscular layer of the gizzard; (F) Infected cells in the muscular layer of the yolk stalk. Yellow fever virus proteins immunostained in green, nuclei stained with DAPI in blue and desmin in red.

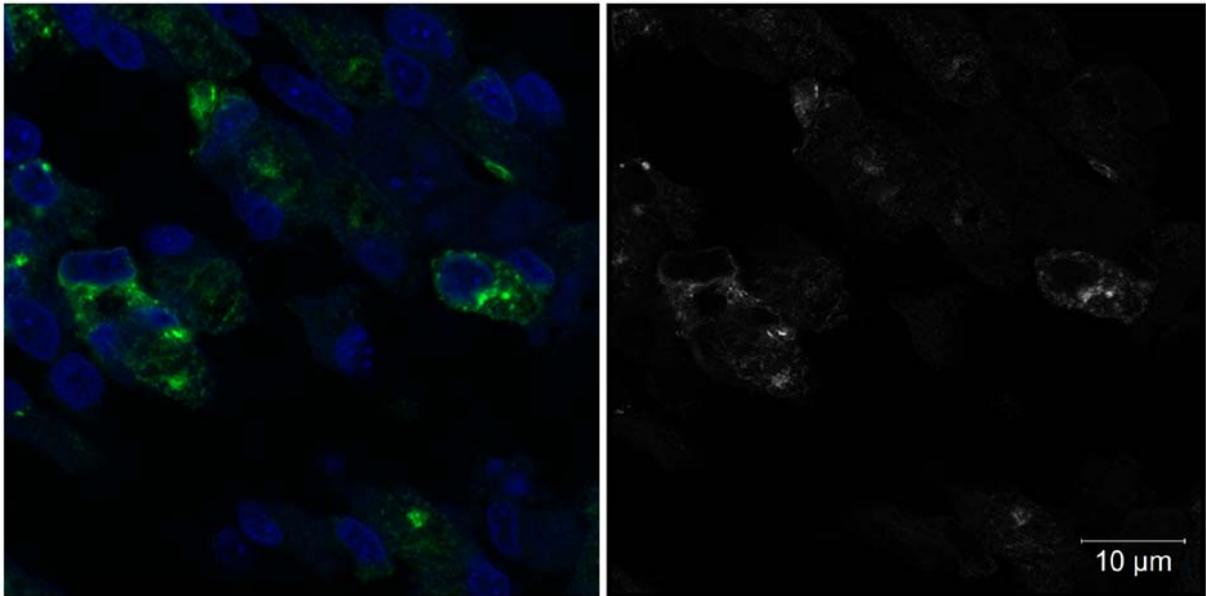


Figure 7. Intracellular aspects of muscle cells of *Gallus gallus* at 72 hpi with 17DD virus. (A) Skeletal muscle cells detected by confocal microscopic analysis; (B) Airyscan superresolution microscopy of the same field of view in a 0,16 µm optical slice showing a vesicular pattern of virus protein expression. Yellow fever virus proteins detected in green (A) or in white (B), nuclei stained with DAPI in blue (A).

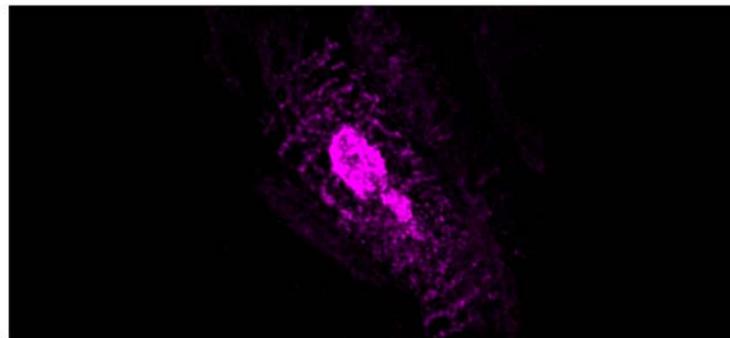


Figure 8. SR-SIM microscopy of chicken muscle cells at 72 hpi with 17DD virus. The virus proteins follow the striations in a compatible localization with the sarcoplasmic reticulum. In the center it is possible to see an agglomeration of viral proteins probably inside the endoplasmic reticulum.

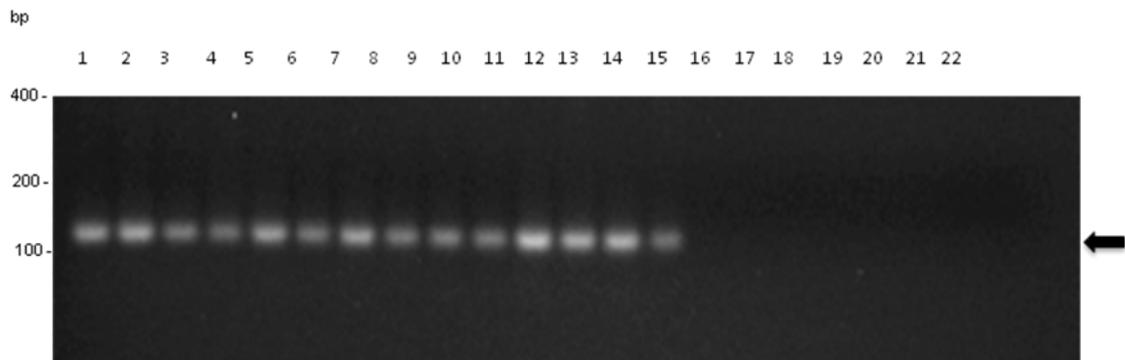


Figure 9. Detection of viral genomic RNA in YF 17DD-infected chicken embryos. The amplicons generated by nested PC were analysed by 2% Agarose gel electrophoresis. The lanes correspond to the following specimens: (1) and (2) - Head; (3) and (4) - legs; (5) and (6) - wings; lanes from (7) to (14) - trunks; (15) and (16) - vitelline membrane; (17) and (18) - chorioallantoic membrane; from (19) to (22) - negative control (water-inoculated animals). Even-numbered lanes indicate samples submitted to amplification of genomic RNA whereas odd-numbered lanes indicate samples submitted to amplification of the replicative intermediate RNA. The molecular length markers are indicated on the left of the figure. The black arrow indicates the 156bp amplicon obtained from the amplification of YF 17D RNA.

4. Artigo II

Título: Kinetic study of yellow fever 17DD viral infection in Gallus gallus domesticus.

Manuscrito em revisão pelos colaboradores.

Resumo:

A vacina contra a febre amarela é a forma mais eficaz de controle desta doença, que permanece como um importante problema epidemiológico na África e na América do Sul. Desde 1937 a produção da vacina se baseia na inoculação da subcepa 17DD em embriões de galinha. Contudo, pouco se sabe sobre as alterações histopatológicas que envolvem a infecção e biossíntese viral neste modelo. Neste trabalho, apresentamos através de métodos moleculares e morfológicos (microscopia de campo claro, imunofluorescência, microscopia confocal, *nested*-PCR e sequenciamento) a cinética da infecção pelo vírus 17DD em embriões de galinha entre 24 e 96 horas de infecção a partir do 9º dia de desenvolvimento. Nossos achados indicam que as principais células envolvidas na produção viral, são mioblastos com padrão mesenquimal. Estas também são as primeiras células a expressarem proteínas virais, após 48 horas de infecção. Após 72 horas de infecção observamos aumento do número de células infectadas dispersas por muitos órgãos e tecidos, especialmente no tecido muscular esquelético. Observamos ainda um aumento do número de células infectadas após 96 horas de infecção no sistema nervoso. Acreditamos que nossos dados sejam úteis em auxiliar na compreensão da patogênese da infecção de embriões de galinha pelo Vírus da Febre Amarela 17DD.

Kinetic study of yellow fever 17DD viral infection in *Gallus gallus domesticus*

Pedro Paulo de Abreu Manso¹, Barbara C E P Dias de Oliveira¹, Patrícia Carvalho de Sequeira², Yuli Rodrigues Maia¹, Jessica Maria dos Santos Ferro¹, Igor José da Silva¹, Luzia Fátima Gonçalves Caputo¹, Priscila Tavares Guedes^{1,3}, Alexandre Araujo Cunha dos Santos², Marcos da Silva Freire⁴, Myrna Cristina Bonaldo², Marcelo Pelajo-Machado¹.

1- Laboratório de Patologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

2- Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

3- Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, UNIRIO, Brazil.

4- Laboratório de Tecnologia Viroológica, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract

The Yellow Fever still remains an important epidemiological problem in Africa and South America, despite the fact that this disease can be controlled by vaccination. The vaccine has been produced since 1937 and is based on infection of chicken embryo with YF 17DD virus. However, little is known about the histopathological background behind virus infection and replication in this model. Here we show by morphological and molecular methods (brightfield and confocal microscopies, Immunofluorescence, nested-PCR and sequencing), the kinetics of YF 17DD virus infection in chicken embryos of 9 days of development comprising 24 to 96 hours post- infection. Our major findings indicate that the main cells involved in

virus production are myoblasts with a mesenchymal shape which also are the first cells to express virus proteins in *Gallus gallus* embryos at 48 hours post infection. At 72 hours post infection we observe an increase of infected cells in embryos. Many sites are then affected in the sequence of infection, especially the skeletal muscle. We were also able to show an increase of infection in nervous system at 96 hours of infection. As a result, our data contribute to the comprehension of the pathogenesis of YF 17DD virus infection in *Gallus gallus* embryos.

Author Summary

Vaccination is the best way to prevent yellow fever. This vaccine is one of the most effective ever developed, despite the great interest in improving their manufacturing process. One primordial step for that is to understand how and where the virus is replicated in the biological model used for the vaccine production, chicken eggs. In a previous paper our group studied infected chicken embryos from the yellow fever vaccine production. These embryos are usually infected with the YF17DD virus at nine days of development and collected 72 hours later. Although we showed the tissues and cells infected at this point, stressing out the importance of the muscular cells, it was necessary to go further with this approach, including embryos from different infection times. Here, we studied eggs with 24, 48, 72, and 96 hours. The most important data we retrieved, besides confirmatory results at 72 hours, were the positivity of myoblasts beginning at 48 hours and the enhancement of the infection in nervous system from 72 to 96 hours. Beyond the importance of understanding the pathology of yellow fever in chicken embryos, our data can be helpful for new strategies of vaccine production.

Introduction

The Yellow fever virus is the ethiological agent of yellow fever, one of the most lethal diseases in tropical regions of the world in the last century. This viral infection causes a pansystemic disease with fever, hepatic, renal and myocardial injuries, which may cause, in severe cases, hemorrhage and shock. In severe cases the mortality rate is about 50%. There is no antiviral treatment for this disease, and

the only way to control it, is the preventive action based on vaccination of populations living in risk areas [1-3].

The yellow fever (YF) vaccine was developed from a virulent Asibi strain of yellow fever virus in Ghana in 1927. The vaccine strain 17D was obtained through serial passages of the Asibi strain in chicken tissue cultures and became attenuated for humans. Two important sub-strains were independently derived from the YF 17D strain, named 17DD and 17D-204. The YF 17D strain was first used for vaccination in Brazil in 1937. Since then, the yellow fever 17DD vaccine has been produced by the Oswaldo Cruz Foundation. The vaccine is produced through inoculation of the yellow fever virus (17DD sample) into embryonated chicken eggs, free of specific pathogens (SPF), according to the World Health Organization standards [4-6].

One of the most important contributions for better understanding of virus production in chicken egg is the publication by Fox and Laemmert [7]. Their group has addressed important aspects of yellow fever vaccine production in chicken embryos, like the best virus strain, embryological stage for infection and time of infection. Although chicken embryos have been used since 1937 as a source of yellow fever virus, histopathological and molecular basis that regulate viral infection in this biological system are still not well understood.

Recently our group [8] showed by molecular techniques and immunofluorescence assays that YF 17DD virus replicates mainly in skeletal muscle tissue, but also in nervous system, fibroblast cells and cardiomyocytes. of White Legorn SPF chicken embryos at 72 hours post infection representing a similar condition employed in yellow fever vaccine manufacturing. It was possible to observe for the first time the histopathological alterations in this model and to determinate that muscle tissue could be the major site of virus replication. However, in order to deepen our understanding on YF 17DD spreading pattern and replication in different embryo tissues, the same approach was applied to other time-points of infection. Besides its biological importance, the knowledge of which cell and tissue are involved in YF 17DD replication can provide new insight for different strategies for vaccine production with less chicken proteins.

The aim of this study is to elucidate the kinetics of YF 17DD proliferation in *Gallus gallus domesticus* embryos, from 24 to 96 hours post- infection. We show that myoblast cells with a mesenchymal shape appeared to be the first infected cells in *Gallus gallus* embryos at 48 hours of infection. At 72 hours post infection we observed an increase of infected tissues. A number of cells are affected throughout

the infection, mainly muscular skeletal cells. We were also able to show a numerical increase of infection in nervous system cells after 96 hours. Our data contribute to the comprehension of the kinetics of YF 17DD infection in *Gallus gallus* embryos.

Material and methods

Biological System

Gallus gallus domesticus (Linnaeus, 1758) fertilized eggs, infected or not with yellow fever virus 17DD strain in the 9th day of development were obtained from the yellow fever vaccine production department (Bio-Manguinhos - FIOCRUZ). Infection was performed according to the vaccine production department protocol, with 1,000 PFU per inoculum [6] and negative controls were inoculated with water for injection (WFI). These eggs were kept in a brooder IP70 (Premium Ecologica, Brazil) with controlled temperature at 37.5 ° C and 55% relative air humidity. For all experiments, embryos and viteline and chorioallantoic membranes were collected at 24, 48, 72 and 96 hours post infection (10, 11, 12 and 13 days of development respectively).

Histopathological Analysis

Histopathological analysis in a brightfield microscope were performed using embryos trunks cleaved transversely in 3 mm sequential sections and separated from the head, wings and legs. Membranes were cleaved in regions defined by quadrants. All samples were fixed in Carson`s formalin-Millonig for 48 hours [9] and processed according to standard histological techniques for paraffin embedding. Sections (5 µm thick) were stained by hematoxylin-eosin [10] and analyzed in an Axiovert Z1 microscope (Carl Zeiss, Germany) equipped with a mRC5 Axiocam digital camera (Carl Zeiss, Germany).

Immunofluorescence Assay

Sections of all paraffin blocks from infected and control animals were submitted to immunofluorescence assay, as previously described [8] with an mouse polyclonal anti-yellow fever virus antibody (Evandro Chagas Institute). Double staining was performed in some samples using an anti-desmin antibody (cat. RB-

9014, Thermo Scientific, USA). As secondary antibodies AlexaFluor 488-conjugated goat anti-mouse (cat. A11001, Life Technologies, USA) or AlexaFluor 546-conjugated goat anti-Rabbit (cat. A11010, Life Technologies, USA) were applied at 37°C for 1 h followed by counterstaining with 1:5,000 DAPI (cat. 03571, Molecular Probes, USA). Negative controls were performed by omitting treatment with the primary antibodies. All sections were analyzed in a LSM 710 confocal microscope (Carl Zeiss, Germany).

Nested-PCR

RNA samples were extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue (FFPE). RNA was extracted from the same blocks used in immunofluorescence analysis which were either positive or negative to YF 17DD virus, as previously described [8]. Samples eluted after the procedure were amplified by Reverse Transcription-PCR (Thermoscript RT-PCR kit - cat. 11146016, Life Technologies, USA) with universal Flavivirus Yellow Fever primers (YF1 – 5` GGTCTCCTCTAACCTCTAG 3` and YF3- 5` GAGTGGATGACCACGGAAGACATGC 3`) [11]. After that, a second amplification was carried out with yellow fever internal primers previously designed by our group [8] (YF2 – 5` CGAGTTTTGCCACTGCTAAGCT 3` and YF4 – 5` TAGACCCCGTCTTTCTACCACC 3`). Two different protocols were performed using specific primers in RT-PCR using forward and reverse YF-1 and YF-3 primers to detect the genomic RNA and the replicative intermediate. All samples were sequenced after nested-PCR amplification in DNA Analyzer ABI 3730 (Applied Biosystems - USA). The sequences were aligned to the Yellow Fever Virus 17DD genomic sequence (GenBank U17066.1) using ClustalW2 [12].

Results

Overall, the infection of YF 17DD virus in *Gallus gallus* embryos was mild and a few lesions could be seen in tissues analyzed by brightfield microscopy. Some of these alterations sometimes were not easy to distinguish from normal events of development. The discrimination between these two aspects was only possible by using molecular and immunological techniques, which provide complementary data.

Interestingly, we could not detect viral protein by immunofluorescence in the liver, yolk sac and chorioallantoic membrane in none of the animals studied. Membranes were also negative when submitted to nested-PCR assay. The analysis of infected embryos in different times of infection showed interesting aspects of virus particles production and distribution in many embryonic tissues with a temporal dispersion association.

After 24 hours of infection neither histopathological changes nor viral antigen detection were observed. Likewise, after extraction in paraffin embedded material, we could not detect either viral genome or replicative intermediate.

Histopathological changes were not evident in animals infected for 48 hours, although at this time-point viral antigen was detected by immunofluorescence in the first positive cells. These were characterized by few mesenchymal-like cells in the skeletal muscle of the legs (Figure 1 A), and in the heart (Figure 1 B). However, RNA extracted from paraffin-embedded samples of immunofluorescent positive blocks was negative for the presence of viral genomic and replicative intermediate RNA.

Between 48 and 72 hours post-infection, a marked proliferation of virus particles occurred, which can be observed by immunofluorescence microscopy revealing the emergence of various organs infected. Hence, at 72 hours of infection, it was possible to detect viral antigen in skeletal muscle (Figure 2 A, B), cardiac muscle (Figure 2 C), in cells of the central nervous system (Figure 2 D), renal tubular epithelium (Figure 2 E), in connective tissue fibroblastoid cells (Figure 2 F), mesenchymal cells of the lung parenchyma (Figure 2 G), gizzard (Figure 2 H) and the yolk stalk (Figure 2 I). This data suggest that the skeletal muscle is the main site of virus replication, since muscle tissue of different sites showed entirely infected bundles. At this point of infection, it was possible to see infected mesenchymal-like cells adhering to the muscular fibers, and mature muscular fibers infected (Figure 2 B). Hearts showed small clusters of positive cells spread all over the organ. Nervous system presented infection in brain, cerebellum, and neurons of the spinal cords. Cells of the renal tubular epithelium were strongly positive and could be seen in small clusters or isolated in the tubular epithelium. Infected fibroblastoid cells were scattered present in many tissues, such as perichondrium and dermis.

The first pathological alterations, characterized by rare apoptotic bodies, were visible at this point of infection in infected tissues, such as in myocytes (Figure 3 A) and some renal tubule cells (Figure 3 B). The apoptotic bodies were not accompanied either by inflammation or other cellular immunological reaction. RT-

PCR analysis in paraffin embedded tissues showed that all immunofluorescence positive blocks were also positive for the detection of viral genome and replicative intermediate (Figure 4).

After 96 hours of infection, morphological alterations remain rare, even though more evident than at 72 hours. Apoptotic bodies were still evident in a few myocytes (Figure 5A), cardiomyocytes (Figure 5B), renal tubules (Figure 5C), gizzard parenchyma (Figure 5D), lung (Figure 5E) and brain (Figure 5 F). At this point of infection, a granulocytic accumulation was found in an isolated area of cardiac muscular tissue of one animal.

When analyzed by immunofluorescence assay, all organs and tissues positive at 72 hours continue to express viral antigen at 96 hours. The muscular bundles were thicker and remained infected with perinuclear clusters of viral protein (Figure 6 A, B). The viral proteins staining continue to follow the striations of the cytoskeleton suggesting accumulation in sarcolemma (Figure 6 B). In the heart, few apoptotic cells were visualized closer to infected cardiomyocytes (Figure 6 C). At this point, an exacerbation of infection in the nervous system was evident, with an increase of the number of brain cells expressing viral proteins (Figure 6 D,E). Likewise, infected spinal cord neurons were more numerous at 96 hours than at 72 hours (Figure 6 F). Cells of some nerve bundles (Figure 6 G), dorsal root ganglion (Figure 6 H) and meninges (Figure 6 I) were also positive at this time-point of infection. Samples of paraffin embedded tissues submitted to molecular analysis confirmed the presence of viral genome and replicative intermediate in all blocks positive for viral antigen by immunofluorescence microscopy (Figure 4).

Discussion

This manuscript presents unprecedented data on the kinetics of the histopathological changes that occur in chicken embryos infected with YF 17DD virus during vaccine production. We observed that in general, this infection revealed to be mild and systemic. Our data indicate that the first cells to express infection are myoblast with a mesenchymal shape. These cells were observed in heart and skeletal muscle, at 48 hours of infection. After 72 hours of infection, cardiomyocytes, muscular fibers, renal tubule cells, parenchymal lung cells, nervous system, gizzard muscle cells, dermal fibroblast and other cells were infected. After 96 hours the

infection became more intense in the nervous system and the other tissues remained infected.

The yellow fever vaccine has been used successfully for about seventy years. Since 1937, when Elmendorf and Smith [13] described the possibility of producing the yellow fever virus in chicken embryos, few studies have addressed this issue. Fox and Laemmert [7], studied the infection of YF 17D substrains in non-specific pathogen free chicken embryos of different races, through a functional test by inoculating extracts of infected embryos in mice brains. Recently, our group characterized the chicken embryo cells responsible for YF 17DD virus particles production at 72 hours post-infection (twelfth day of development) [8]. To our knowledge, the aforementioned works are the only ones that address the infection of chicken embryos by yellow fever virus. Although there is great interest in reducing the amount of chicken protein in vaccine against yellow fever formulation [14], the production strategy remains almost unchanged since 1945. We believe that the scarcity of studies that address the relationship of the virus with chicken embryos is a limiting factor for the success of new approaches.

In the present study, we used eggs obtained from the manufacturing of yellow fever vaccine, whose were specific pathogen free (SPF) and maintained under conditions according to international quality standards. Fox and Laemmert [7], did not find visible histopathological changes by light microscopy in infected embryos. In our study, histopathological changes were not so evident and were often confused with normal developmental events. Hence, the viral detection in infected cells and tissues was only conceivable employing molecular techniques. However, in the early points of infection, even these techniques were not sensitive enough to detect viral infection. The theoretical limit of detection in nested-PCR for yellow fever samples extracted from cell culture is 0.7 PFU / ml [15]. In our work an approximately 1,000-fold greater amount (1,000 PFU) was inoculated into each studied egg, but one must consider that possibly part of the inoculum could be strayed before reaching competent cells. In addition, the RNA samples from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues (FFPE) were obtained only from small tissue specimens of the embryo. So the absence of detection at the starting point might be associated to the degree of viral spreading in the embryonic tissues. On the other hand, it might also be associated with the technical constraints of RNA extraction in FFPE material due to fixation and processing damage to the quality and quantity of the extracted samples [16]. However, the possibility of integrating morphological and molecular

virus detection makes the FFPE RNA extraction an extremely valuable tool. Here it was possible to detect the yellow fever virus by immunofluorescence, to correlate this presence with tiny tissue reactions, to validate it by genomic RNA detection and to sequence it in the same studied area, confirming that this virus can replicate in these regions by detection of the replicative intermediate.

In humans, the natural infection of yellow fever virus and other flaviviruses starts on skin resident dendritic cells [1,17-19]. These cells can migrate to lymph nodes, where the virus replicates, and in sequence, is released into the bloodstream, beginning with the viremia [1,19-22]. Once the virus reaches the hematogenous way, other competent organs such as the liver, kidneys, heart, spleen and others become infected [20,23]. In the same way, when humans are vaccinated with YF 17DD virus, poor replication occurs in dendritic cells, which are also drained into the lymph nodes promoting adaptive humoral and cell-mediated response [2]. In *Gallus gallus* model, virus is inoculated in the yolk sac. However, it was not possible to identify viral proteins by immunofluorescence techniques in cells of the vitelline membrane, of the endothelial wall, or inside the blood vessels at all time-points of infection studied. Viral genome was not detected by nested-PCR in vitelline membrane in any studied time-point. Therefore, it is interesting to reflect on how viruses reach the organs that are infected at the subsequent time-points. Vitelline membrane is highly vascularized, and at this stage of development it is responsible for much of the production of circulating blood cells [24]. Taken into account the absence of infection in these cells, we hypothesize that once in the membrane, the inoculum would be passively transported by the circulation to reach competent organs for viral production. In this context, after 24 hours neither viral RNA nor viral protein could be detected by nested-PCR or immunofluorescence in this area.

Similarly, we did not observe any histopathological changes in different samples from 24 hours of infection. We hypothesize that the amount of infected cells was not sufficient to be detected by nested-PCR in FFPE samples or immunofluorescence. Nevertheless, Fox and Laemmert approached neuropathic effect on mice brains by injecting body extract from chicken embryo infected for 24 hours with the YF 17D-204 strain [7].

From 48 hours of infection onwards, infected cells were identified in skeletal and heart muscles. These showed a consistent pattern with myoblasts with a mesenchymal shape. In regions where the viral antigens were identified, a small number of cells was positive. We have observed that, at this point of infection,

immunofluorescence was more sensitive than nested-PCR for virus detection in FFPE samples. This finding needs to be further explored, since studies with West Nile virus showed that nested-PCR assay of samples derived from FFPE is more sensitive than immunohistochemistry [25].

In chicken embryos infected with YF 17D-204 strain, an increase of viremia occurs between 48 and 72 hours post-infection [7]. Accordingly, we observed the same occurrence in YF17DD- infected cells and tissues along this period. After 72 hours of infection, the viral antigen can also be detected by immunofluorescence, in renal tubules, gizzard muscle layer, lung parenchyma, and fibroblastoid cells in the connective tissue of the dermis. The presence of apoptotic bodies were observed in the same place where cells were positive to viral protein by immunofluorescence. It was also observed in human and hamster infected with wild yellow fever virus, where the predominant mechanism of cell death is intrinsic and extrinsic apoptosis [20-22,26]. Although molecular markers of apoptosis were not employed in our study, the lack of immune system maturity in this development stage of *Gallus gallus*, as well as the absence of cellular reaction in infected regions, allow us to assume that the trigger of apoptosis in this case is intrinsic. In general, the presence of apoptotic bodies in humans, hamsters and non-human primates is accompanied by microsteatosis on affected organs [19,20,26], which was not observed in our study model.

The flaviviruses are positive strand RNA viruses, which generate a negative strand of RNA during genome replication. This negative strand RNA template, called replicative intermediate, is found throughout the infection, usually in a double-stranded RNA form [27]. Both genomic and replicative intermediate RNA strands were detected after 72h of infection in all specimens that were positive for viral antigen detection by immunofluorescence. The presence of the replicative intermediate, in these samples, confirmed viral replication in referred tissues. This result was confirmed by sequencing all amplicons that showed 100% homology with the yellow fever virus 17DD genome.

After 96 hours of infection, cytopathic effect was rare but the presence of apoptotic bodies could be seen in some cells. When compared to the YF 17D-204 growth kinetics in chicken embryos, at 96 hours of infection virus titer was stabilized and there were higher concentrations of titer in the head and muscles of animals [7]. Likewise, we found large increase in the number of infected cells in the brains of the animals studied.

During production of yellow fever vaccine, eggs are inoculated at the 9th day of development and embryos are collected after 72 hours of infection, on the 12th day of development. The choice of this period relies on the ideal relationship between viral titer and mortality of embryos [6,7,27]. Fox and Laemmert observed the proliferation YD 17DD viral peak in *Gallus gallus* at 72 hours post-infection [7]. According to Penna [27], three days of infection is the best time condition for the vaccine production while four days could also be accepted in some laboratories. Based on morphological observations, we did not detect increase in infection between 72 and 96 hours, except for the nervous system where higher concentrations of positive cells were seen after 96 hours of infection.

Some authors suggests that the YF 17DD vaccine is not composed of a cloned population, but actually a mixture of subpopulations [14]. Here, we performed virus sequencing analysis in order to confirm that PCR and immunofluorescence detections were really consistent with the presence of YF 17DD virus. However, since this approach was not made towards a single organ, we cannot discard the possibility of different YF 17DD subpopulations production in specific organs. As a result, the late enhancement of the nervous system infection could be either due to the necessity of more time for YF 17DD to be produced by the neurons, or by the later production of a specific minority subpopulation that preferentially spread in the brain.

The wild yellow fever virus is predominantly viscerotropic in humans and nonhuman primates, and on the other hand neurotropic in mice and rabbits [19]. Although it is uncommon, there are reports of disease associated with neurotropic yellow fever vaccine, which mostly occurs in children or immunocompromised patients [2,28,29]. Interestingly, during the process of attenuation of the Asibi strain, after successive passages in mouse brain, the virus could be produced by neurons. Other passages in chicken embryo tissues without nervous system were needed to reduce this characteristic in YF 17D strain [29]. Our data show that YF 17DD virus infects cells of the nervous system in the chicken brain, spinal cord, and peripheral nerves, which denotes relative neurocompetence to produce YF 17DD virus. However, in this model the infection of the nervous system could be facilitated by the immaturity of the blood-brain barrier during this development stage [30].

An event that draws attention to our findings was the absence of both histopathological changes and viral antigen in the liver of the studied animals. The liver is the most affected organ in wild yellow fever affecting humans, nonhuman

primates, and golden hamsters [19,31]. Similarly, in vaccine-associated viscerotropic disease cases, liver is the most affected organ [2]. In intraperitoneal inoculated Rhesus monkeys, Kupffer cells are infected 24 hours after inoculation [19]. In a model closer to our experiment, Fox and Laemmert showed, by functional tests, that YF 17D-204 strain infected liver of chicken embryos, even though this organ presented lower virus titers than all other organs studied [7]. The apparent contradiction between our data and those from this work could be explained by the possible viremia in the blood circulating inside the liver. On the other hand, we should consider the possibility of inefficient virus detection in the liver due to limitations the techniques applied in the study. Additionally, it is also possible that some kind of histopathological change in the liver occurs at later time-points of the infection.

Renal tubular epithelium infection after inoculation of wild yellow fever virus has been demonstrated in humans and Rhesus monkeys [19,33,34]. In fatal human cases the presence of viral antigen in the cytoplasm of the renal tubular epithelium cells was detected by immunohistochemical methods [32]. In Golden hamsters, minor changes were observed in kidney tubules after one or two days of infection, which apparently were not related to infection [26]. We observed apoptotic figures and infected cells with cytoplasmic expression of viral protein in tubular epithelium after 72 and 96 hours post infection.

The formation of muscle bundles in chicken embryos occurs between the 8th and 18th days of embryonic development [33]. Between the 8th and the 10th days occurs the peak of myotubes formation, and consequent myoblasts number decrease [33,34]. In this period of development, interestingly we observed after 48 hours of infection (11th day of development) positive myoblasts in muscle tissue, and then after 72 hours of infection (12th day of development) fully infected muscle bundles. In some fields, infected myoblasts associated with muscle bundles were observed, but after 96 hours, we detected only infected muscle fibers. Apparently, the first cells to be infected are the myoblasts with mesenchymal shape cells, which will later form infected muscle bundles. As we have shown before [8], at 72 hours of infection, muscle tissue may represent the major site of viral replication in the embryo because of its occupation area and the number of infected cells. It is known that muscle cells are able to be infected by other arboviruses which present human clinical myalgia as a common element, such as Chikungunya [35], Mayaro [36] e Ross River [37]. Chikungunya specifically infects human satellite cells [35] which are progenitor cells of the muscle [38]. The importance of mesenchymal cells is also expressed when we

observe positivity to viral antigen, with similar pattern in other organs, such as muscular wall of the gizzard and yolk stalk, and lung parenchyma. Fibroblastoid cells of the dermis, perichondrium and meninges, which also have mesenchymal origin, are also infected. Although cells of other origins can also be infected by YF 17DD virus, our data suggest that these immature cells with a mesenchymal pattern observed in those tissues play an important role in the production of YF 17DD virus.

Finally, we conclude that different tissues are affected along YF 17DD virus infection in chicken embryos from vaccine production. The muscle tissue is the first to demonstrate infection and, immature cells consistent with myoblasts with mesenchymal shape, present in this tissue, play an important role in early infection. Moreover, we observed that there is an increase in the number of infected nervous tissue within 96 hours, which could be a good reason to support the vaccine production at 72 hours-infected embryos. We believe that the data produced in this study elucidate important aspects of the pathology of yellow fever in chicken embryos, which can be helpful in the understanding and design of new strategies for vaccine production.

Acknowledgment

The authors would like to thank Luciana Silva Souza and Luzia Helena Pereira Barros for histological technical assistance, Rodrigo Mexas (Image Production and Treatment Facility-IOC) for assistance with image processing, Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira and Dra. Flavia Barreto dos Santos (Flavivirus Laboratory-IOC) for providing the antibody against Yellow Fever virus, Clara Soares Viga (Molecular Biology of Flavivirus Laboratory-IOC), Marcelo de Oliveira and Carlos Alberto Frota (Biomanguinhos) for technical assistance, Dr. Carlos Jorge Logullo de Oliveira and Marcelle Vianna de Carvalho Uhl (UENF) for giving access to the confocal microscope and the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS/FIOCRUZ for providing DNA analysis facility.

References

1. Monath TP (2001) Yellow fever: an update. *The Lancet infectious diseases* 1: 11-20.
2. Barrett AD, Teuwen DE (2009) Yellow fever vaccine—how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? *Current opinion in immunology* 21: 308-313.
3. Massad E, Coutinho FAB, Burattini MN, Lopez LF, Struchiner CJ (2005) Yellow fever vaccination: how much is enough? *Vaccine* 23: 3908-3914.
4. Post PR, Carvalho Rd, Freire MdS, Galler R (2001) The early use of yellow fever virus strain 17D for vaccine production in Brazil—a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 849-857.
5. Heinz FX, Stiasny K (2012) Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine* 30: 4301-4306.
6. Benchimol JL (2001) Febre amarela: a doença ea vacina, uma história inacabada; Yellow fever: the disease and the vaccine, an unfinished history: Fiocruz.
7. Fox JP, Jr HWL (1947) The cultivation of yellow fever virus II. Observations on the infection of developing chick embryos. *The American journal of Hygiene* 46: 21 -40.
8. Pedro Paulo de Abreu Manso, Barbara C E P Dias de Oliveira, Patrícia Carvalho de Sequeira, Yuli Rodrigues Maia, Jessica Maria dos Santos Ferro, et al. Histopathological Studies of chicken embryos infected by the vaccine Yellow Fever 17DD virus. pp. In press.
9. Carson F, Martin J, Lynn J (1973) Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *American Journal of Clinical Pathology* 59: 365.
10. Mayer P (1903) Notiz über Hämatein und Hämalan. *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technick* 20: 409.
11. Tanaka M (1993) Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction. *Journal of virological methods* 41: 311-322.
12. McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, et al. (2013) Analysis tool web services from the EMBL-EBI. *Nucleic acids research* 41: W597-W600.
13. Elmendorf JE, Smith HH (1937) Multiplication of yellow fever virus in the developing chick embryo. *Experimental Biology and Medicine* 36: 171-174.
14. Freire MS, Mann GF, Marchevsky RS, Yamamura AM, Almeida LF, et al. (2005) Production of yellow fever 17DD vaccine virus in primary culture of chicken embryo fibroblasts: yields, thermo and genetic stability, attenuation and immunogenicity. *Vaccine* 23: 2501-2512.
15. Sánchez-Seco M, Rosario D, Domingo C, Hernandez L, Valdes K, et al. (2005) Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *Journal of virological methods* 126: 101-109.
16. Foss RD, Guha-Thakurta N, Conran RM, Gutman P (1994) Effects of fixative and fixation time on the extraction and polymerase chain reaction amplification of RNA from paraffin-embedded tissue: comparison of two housekeeping gene mRNA controls. *Diagnostic Molecular Pathology* 3: 148-155.
17. Barba-Spaeth G, Longman RS, Albert ML, Rice CM (2005) Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. *The Journal of experimental medicine* 202: 1179-1184.

18. Marovich M, Grouard-Vogel G, Louder M, Eller M, Sun W, et al. Human dendritic cells as targets of dengue virus infection; 2001. Nature Publishing Group. pp. 219-224.
19. Monath TP, Barrett AD (2003) Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever. *Advances in virus research* 60: 343-395.
20. Quaresma JA, Pagliari C, Medeiros D, Duarte MI, Vasconcelos PF (2013) Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. *Reviews in medical virology* 23: 305-318.
21. Quaresma JAS, Barros VLRS, Fernandes ER, Pagliari C, Guedes F, et al. (2006) Immunohistochemical examination of the role of Fas ligand and lymphocytes in the pathogenesis of human liver yellow fever. *Virus research* 116: 91-97.
22. Quaresma JA, Barros VL, Pagliari C, Fernandes ER, Guedes F, et al. (2006) Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF- β , TNF- α and NK cells activity. *Virology* 345: 22-30.
23. da Costa Vasconcelos PF (2003) Febre amarela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36: 275-293.
24. Guedes PT, de Abreu Manso PP, Caputo LFG, Cotta-Pereira G, Pelajo-Machado M (2014) Histological Analyses Demonstrate the Temporary Contribution of Yolk Sac, Liver, and Bone Marrow to Hematopoiesis during Chicken Development. *PloS one* 9: e90975.
25. Bhatnagar J, Guarner J, Paddock CD, Shieh W-J, Lanciotti RS, et al. (2007) Detection of West Nile virus in formalin-fixed, paraffin-embedded human tissues by RT-PCR: a useful adjunct to conventional tissue-based diagnostic methods. *Journal of clinical virology* 38: 106-111.
26. Xiao S-Y, Zhang H, Guzman H, Tesh RB (2001) Experimental yellow fever virus infection in the Golden hamster (*Mesocricetus auratus*). II. Pathology. *Journal of Infectious Diseases* 183: 1437-1444.
27. Penna H, Smithburn KC, Duriex C, Koerber R, Penna HA, et al. (1956) Production of 17D yellow fever vaccine. *YF Vaccination Monograph Series*: 67-68.
28. McMahon AW, Eidex RB, Marfin AA, Russell M, Sejvar JJ, et al. (2007) Neurologic disease associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of 15 cases. *Vaccine* 25: 1727-1734.
29. Martins RdM, Pavão ALB, de Oliveira PMN, dos Santos PRG, Carvalho SMD, et al. (2014) Adverse events following yellow fever immunization: Report and analysis of 67 neurological cases in Brazil. *Vaccine*.
30. Wakai S, Hirokawa N (1978) Development of the blood-brain barrier to horseradish peroxidase in the chick embryo. *Cell and tissue research* 195: 195-203.
31. Strode GK (1951) *Yellow Fever*. London: McGraw-Hill Book Company, INC.
32. De Brito T, Siqueira S, Santos R, Nassar E, Coimbra T, et al. (1992) Human fatal yellow fever: immunohistochemical detection of viral antigens in the liver, kidney and heart. *Pathology-Research and Practice* 188: 177-181.
33. Zhou Z, DelProposto Z, Wu L, Xu J, Hua J, et al. (2012) In ovo serial skeletal muscle diffusion tractography of the developing chick embryo using DTI: feasibility and correlation with histology. *BMC developmental biology* 12: 38.
34. Tokuyasu K, Maher PA, Singer S (1984) Distributions of vimentin and desmin in developing chick myotubes in vivo. I. Immunofluorescence study. *The Journal of cell biology* 98: 1961-1972.

35. Ozden S, Huerre M, Riviere J-P, Coffey LL, Afonso PV, et al. (2007) Human muscle satellite cells as targets of Chikungunya virus infection. *PLoS One* 2: e527.
36. Shawn F. Taylor MD, Paresh R. Patel MD, Thomas J.S. Herold MD (2005) Recurrent Arthralgias in a Patient With Previous Mayaro Fever Infection. *Southern Medical Journal* 98: 484-485.
37. Seay AR, Griffin DE, Johnson RT (1981) Experimental viral polymyositis Age dependency and Immune responses to Ross River virus infection in mice. *Neurology* 31: 656-656.
38. Mauro A (1961) Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 9: 493-495.

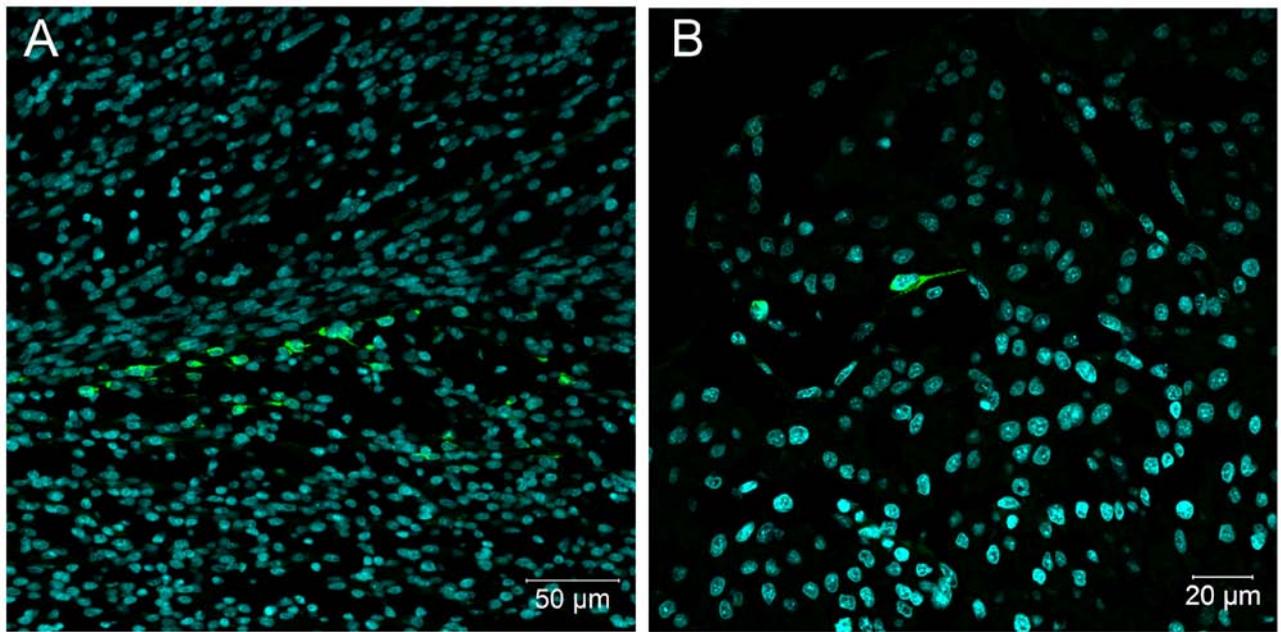


Figure 1. Confocal microscopy analysis of embryos of *Gallus gallus domesticus* 48 hpi with Yellow Fever 17DD virus. Mesenchymal cells in legs skeletal muscle (A) and in the heart (B). Yellow fever virus in green, nuclei stained with DAPI in blue.

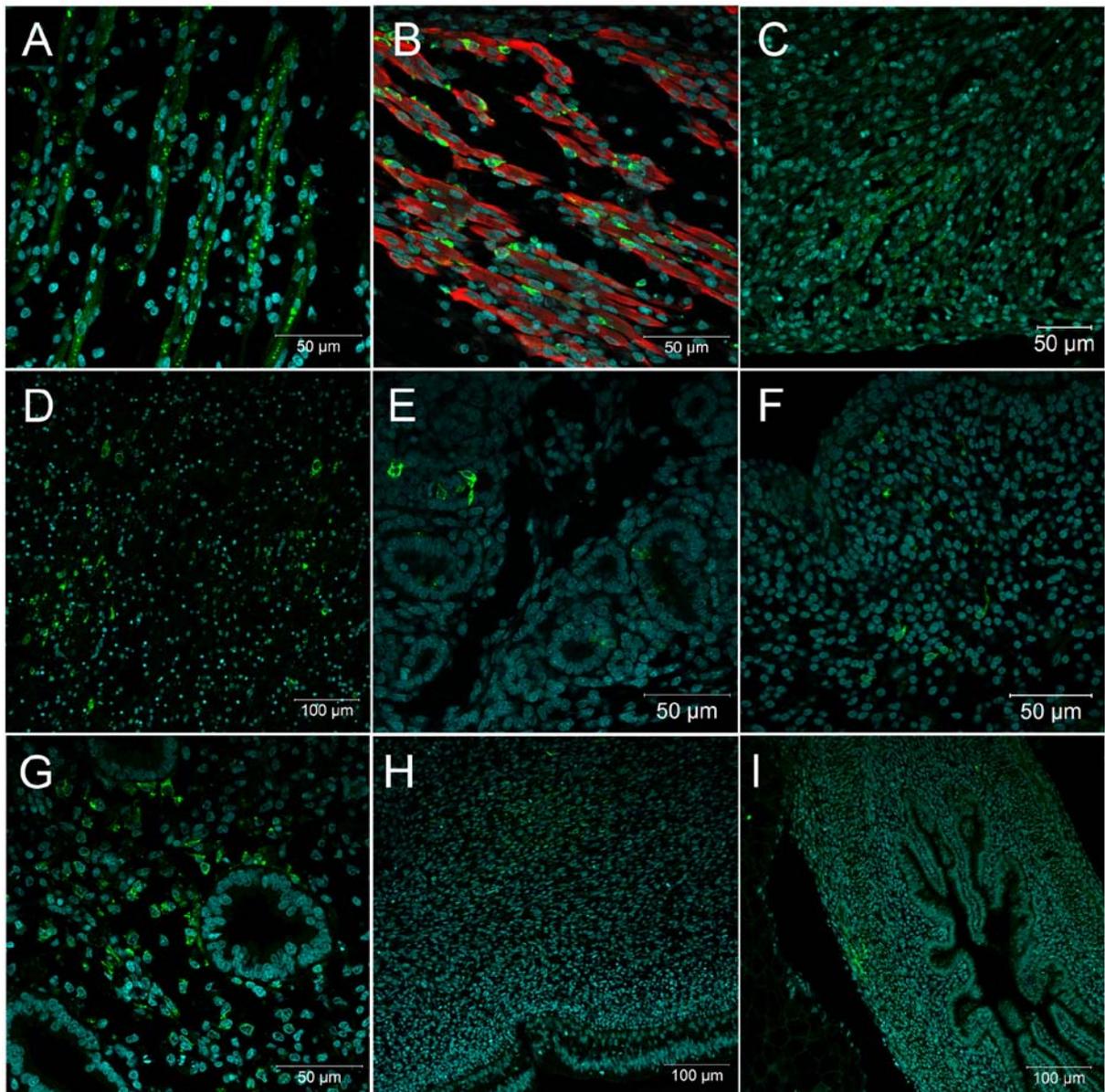


Figure 2. Confocal microscopy analysis of *Gallus gallus domesticus* 72 hpi with Yellow Fever 17DD virus. (A) Infected skeletal muscle bundles. The viral protein form clusters in the cytoplasm and follow the muscular striations; (B) Infected muscular fibers and mesenchymal cells adhering to infected and non infected muscular fibers; (C) Infected muscular cells in the heart. (D) Infected nervous tissue cells in the brain; (E) Infected kidney tubular epithelium cells; (F) Infected cells in dermal connective tissue; (G) Infected lung parenchyma cells; (H) Infected cells in the muscular layer of the gizzard; (I) Infected fibroblastoid cells in the yolk stalk. Yellow fever virus proteins in green, nuclei stained with DAPI in blue and desmin in red.

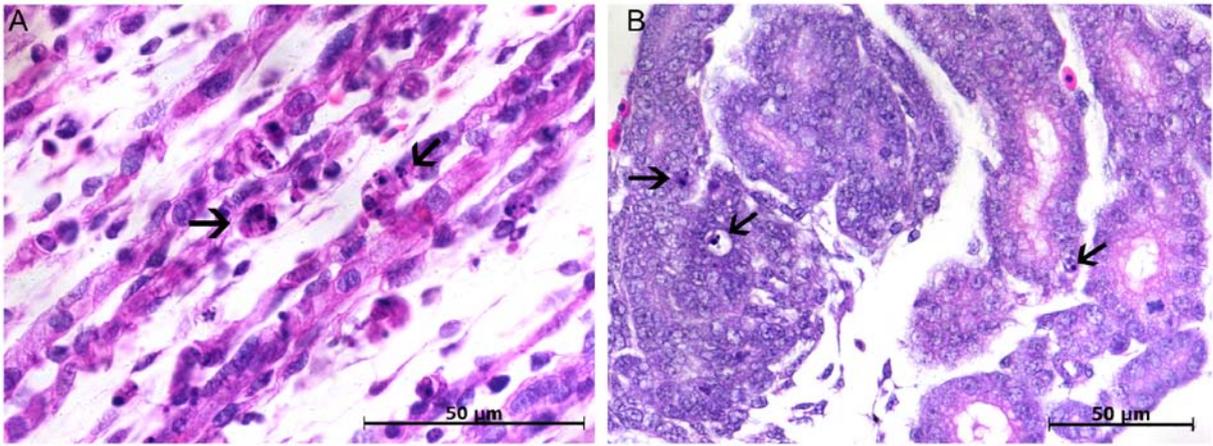


Figure 3. Brightfield microscopy analysis of *Gallus gallus domesticus* 72hpi with Yellow Fever 17DD virus. Apoptotic corpuscles in muscle bundles (A), and in the kidney tubular epithelium (B). Apoptotic nuclei are indicated by black arrow (→). Hematoxylin and Eosin stain.

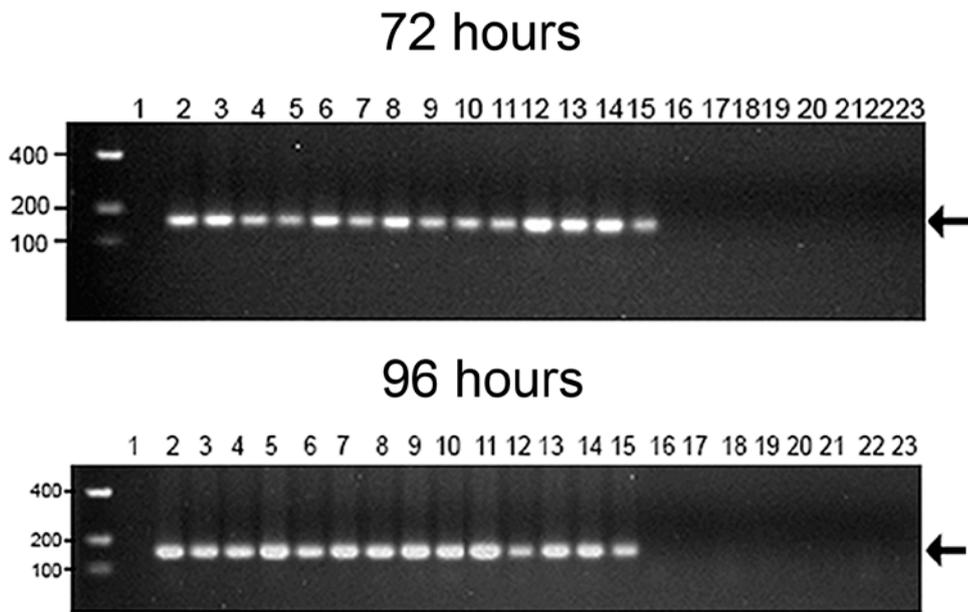


Figure 4. Detection of YF 17DD viral RNA by nested-PCR analysis. YF 17DD amplicons were assayed by means of agarose gel electrophoresis. The above figure show samples from 72 hours infected chicken embryo, and the bottom figure, 96 hours infected chicken embryo. The lanes correspond to the following specimens: (1) empty; (2) and (3) head; (4) and (5) legs; (6) and (7) wings; lanes from (8) to (15) trunks; (16) and (17) vitelline membrane; (18) and (19) Chorioallantoic membrane; from (20) to (23) negative control (water-inoculated animals). Even-numbered lanes indicate samples submitted to amplification of genomic RNA whereas odd-numbered lanes indicate samples submitted to amplification of the replicative intermediate RNA. The molecular length markers are indicated on the left of the figure. The black arrow indicates the 156bp amplicon obtained from the amplification of YF 17DD RNA.

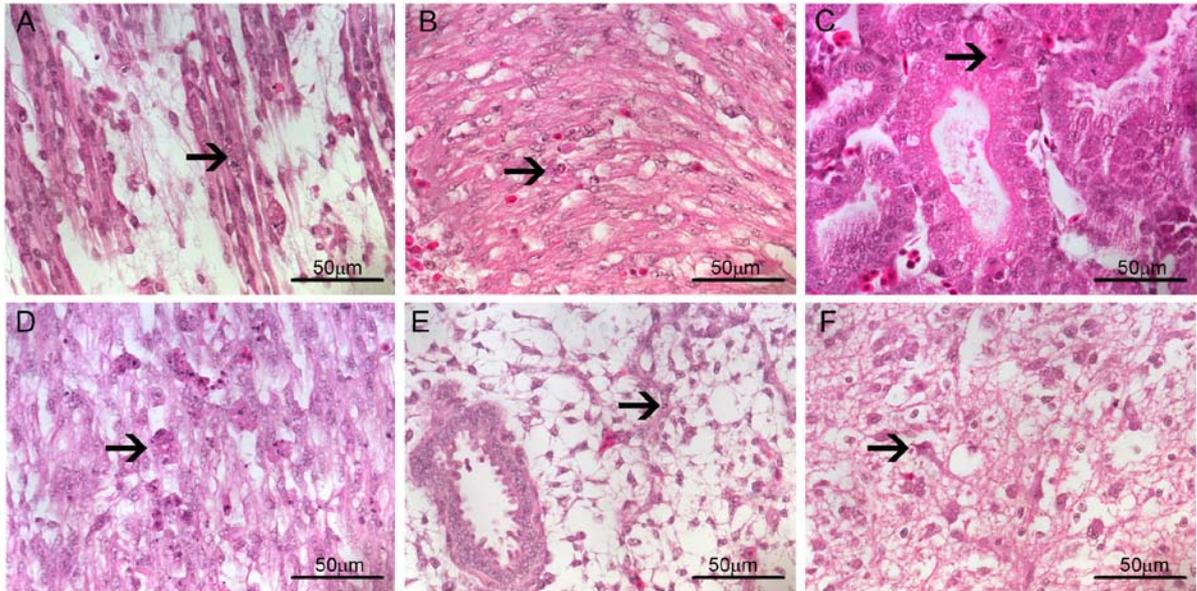


Figure 5. Brightfield microscopy analysis of *Gallus gallus domesticus* 96hpi with Yellow Fever 17DD virus. Apoptotic bodies in (A) muscular bundles; (B) heart cells; (C) kidney tubular epithelium; (D) gizzard muscle; (E) lung parenchyma; and (F) brain cells. Apoptotic nuclei are indicated by black arrow (→). Hematoxylin and Eosin stain.

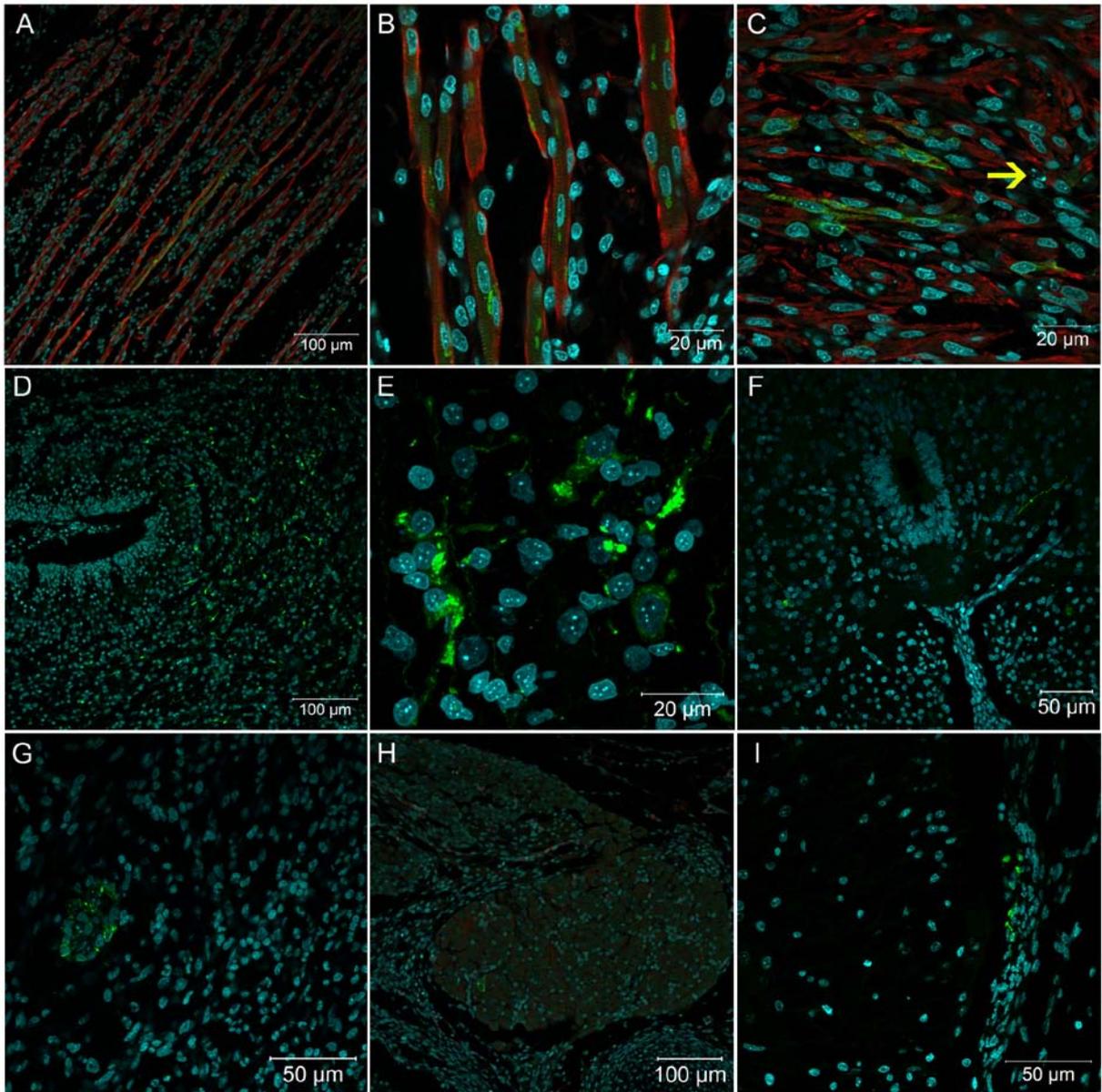


Figure 6. Confocal microscopy analysis of *Gallus gallus domesticus* 96hpi with Yellow Fever 17DD virus. (A) Infected skeletal muscle bundles, shown viral protein aggregation; (B) detail of infected muscular fibers shown perinuclear immunostaining of viral protein and clusters follow the muscular striations; (C) infected cardiomyocytes in the heart. Apoptotic bodies closer to infected cells are indicated by yellow arrow (→). (D) uninfected nervous tissue cells in the brain; (E) Detail of infected cells in the brain congested of virus proteins; (F) infected neurons in the spinal cord; (G) infected cells in nerve bundles; (H) infected cells in the dorsal root ganglion; (I) infected fibroblastoid cells in the meninges. Yellow fever virus proteins in green, nuclei stained with DAPI in blue and desmin in red.

5. Discussão

Apresentamos nesta tese dados inéditos sobre a dispersão, replicação e patogenia do vírus da Febre Amarela (FA) subcepa vacinal 17DD nos embriões de galinha infectados para a produção da vacina da febre amarela. Observamos que a infecção nestes embriões se apresenta branda, porém dispersa em diferentes órgãos, tecidos e tipos celulares. Nossos dados apontam que as primeiras células a manifestar a infecção são mioblastos com aspecto mesenquimal que puderam ser observados no coração e no músculo esquelético a partir de 48 horas de infecção. Após 72 horas, momento em que, habitualmente, a infecção é interrompida para obtenção da polpa embrionária para a produção da vacina, o vírus FA 17DD estão sendo produzidos principalmente em células do músculo esquelético, cardiomiócitos, células da glia e neurônios, mas também em epitélio tubular renal, parênquima pulmonar e fibroblastos. Nossos dados sugerem que o tecido muscular esquelético é o principal local para produção das partículas virais. Após 96 horas, a infecção se torna mais intensa no sistema nervoso e se mantém semelhante nos demais tecidos já infectados.

A vacina contra febre amarela foi desenvolvida de maneira empírica após o isolamento da cepa Asib, em 1927, e permanece como uma das vacinas mais efetivas já desenvolvidas (27, 49). Embora exista grande interesse em diminuir a quantidade de proteína de galinha em sua formulação (24), o modo de produção da vacina contra a febre amarela se mantém praticamente inalterado desde 1945, após a introdução de um padrão de produção e do lote semente (63).

No entanto, desde os trabalhos de Elmendorf e Smith (9) em 1937, que mostraram a capacidade de embriões de galinha propagar o vírus da Febre Amarela, poucos estudos abordam o padrão de infecção nesse modelo biológico. Entendemos que a escassez de trabalhos que tratem a patogênese do vírus em embriões de galinha seja um fator limitante para que novas alternativas de produção

viral sejam bem sucedidas, de modo que, em nosso trabalho, buscamos estudar a patologia do vírus FA 17DD em embriões de galinha utilizados para produção da vacina antiamarílica.

De fato, o único artigo de nosso conhecimento que explorou tal fenômeno biológico é o trabalho de Fox e Laemmert (86), que, em 1947, estudaram a infecção de subcepas FA 17D em embriões de galinha de diferentes raças não SPF. Neste estudo, foram determinados, entre outros pontos, o título viral de diferentes regiões do embrião, através de testes funcionais, inoculando extratos de embriões infectados em cérebro de camundongos. Estes autores não encontraram nenhuma alteração histopatológica visível, por microscopia de luz, nos embriões infectados. É importante salientar que a limitação tecnológica do período em que este trabalho foi realizado e o uso de diferentes cepas virais e raças de embriões de galinha, provavelmente não permitiram que fossem identificadas as discretas alterações histopatológicas que verificamos no nosso trabalho. Neste, utilizamos embriões infectados na produção da vacina contra a febre amarela, os quais eram livres de patógenos específicos (do inglês, SPF) e mantidos dentro de padrões internacionais de qualidade. Além disso, as alterações histopatológicas apresentadas são pouco evidentes e por vezes se confundem com eventos normais do desenvolvimento do embrião. Esse é o caso, por exemplo, da apoptose e da intensa proliferação celular, que são eventos comuns do processo ontogenético. Em consequência disto, a detecção do vírus, a identificação precisa das células infectadas e a observação precisa da repercussão histopatológica só foram possíveis com o auxílio de técnicas moleculares. Nesse sentido, integrando ferramentas histológicas, imuno-histológicas e moleculares, foi possível: a) identificar as células produtoras do vírus da Febre Amarela, b) correlacionar a presença deste agente infeccioso com as pequenas reações presentes no tecido, c) validar essa detecção pela confirmação do material genético viral e seu sequenciamento, e d) confirmar que este vírus estava sendo replicado na região onde foi identificado pela presença de seu intermediário replicativo.

Durante a execução deste trabalho, realizamos diversas tentativas de empregar anticorpos para detectar componentes do vírus FA 17DD em tecidos fixados e processados para parafina. Dois anticorpos policlonais permitiram a execução deste trabalho, um produzido pelo Instituto Evandro Chagas designado

FAI (Soro hiperimune contra febre amarela), e outro soro hiperimune contra FA 17D produzido pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH). Em cortes seriados, ambos foram positivos nas mesmas células de todos os tecidos estudados, conferindo confiabilidade à especificidade da marcação. Cabe comentar aqui a necessidade de empregar esforços na produção sistemática de um anticorpo para detecção histopatológica do vírus da Febre Amarela, uma vez que ambos os utilizados nessa tese não são produzidos rotineiramente e os monoclonais disponíveis comercialmente não são certificados para uso em material parafinado.

Através de imunofluorescência em cortes de tecido parafinado, com leitura em microscopia confocal ou de super-resolução (SR-SIM), foi possível observar nas células infectadas um padrão intracelular de localização do antígeno viral. Observamos células com grande intensidade de marcação perinuclear, compatível com a localização do retículo endoplasmático, além de um padrão vesicular citoplasmático sugestivo de exocitose. Embora as etapas de internalização, replicação e liberação do vírus da Febre Amarela na célula hospedeira não sejam bem conhecidas, diversos trabalhos versam sobre o tema em outros flavivírus e admite-se por consenso que estas etapas são comuns a estes vírus. O padrão de localização intracelular das proteínas virais observado em nosso trabalho é compatível com o descrito para os demais flavivírus, onde a montagem das partículas virais ocorre na superfície do retículo endoplasmático e sua eliminação pela via exocítica (2, 4, 8, 19, 21, 27). Gillespie *et al.* (2010) demonstrou a presença de complexos de replicação na membrana do retículo endoplasmático de células Vero durante a biossíntese de Vírus do Oeste do Nilo (98). Da mesma forma, células de hepatoma humano (HepG2) infectadas pelo vírus selvagem da febre amarela ou pelo vírus da dengue apresentam hipertrofia do retículo endoplasmático com brotamentos associados formando vesículas que acompanham a via exocítica, quando observadas ultraestruturalmente (99).

Os flavivírus apresentam RNA de polaridade positiva, e ao serem replicados, formam um molde de RNA de polaridade negativa, chamado intermediário replicativo. Este molde de RNA continua a ser produzido durante toda infecção, e normalmente é encontrado sob a forma de RNA de dupla fita (19). Em todos os blocos de parafina analisados neste trabalho, nos quais houve detecção do antígeno viral por imunofluorescência, detectamos também o RNA genômico e o intermediário

replicativo por *nested*-PCR. A presença do intermediário replicativo confirma, portanto, que há replicação viral nos tecidos estudados. Esse resultado foi confirmado pelo sequenciamento de todos os amplicons que apresentaram 100% de homologia com o genoma do vírus da Febre Amarela 17DD.

Inicialmente, foram estudados embriões de *Gallus gallus* submetidos às mesmas condições da produção da vacina, ou seja, infectados com vírus FA 17DD em seu 9º dia de incubação, a partir da inoculação de 1.000 PFU no interior do saco vitelínico, e com desenvolvimento interrompido 72 horas depois (12º dia) para obtenção da vacina (3, 63).

Os tecidos acometidos apresentaram células infectadas isoladas ou em pequenos grupamentos, sugerindo que a infecção é predominantemente branda. Este dado é consistente com a observação da literatura de que a maioria dos animais infectados após o oitavo dia de desenvolvimento, quando mantidos em condições propícias, nascem sem apresentar sequelas da doença (86). Contudo, em alguns animais foi possível observar maior intensidade de infecção do que em outros, ficando evidente que existe uma certa variabilidade de resposta e susceptibilidade à infecção entre os indivíduos, o que é esperado por não se tratar de uma linhagem isogênica.

A ausência de reação inflamatória evidente nos tecidos acometidos pode estar relacionada à imaturidade do sistema imunológico destes animais (90, 100, 101), e/ou à característica da doença neste modelo. A literatura mostra que os primeiros linfócitos T e B são detectados apenas após o 11º e o 12º dia de desenvolvimento respectivamente, e que os embriões se tornam imunologicamente competentes somente após o 18º dia de desenvolvimento (90). Por outro lado, embriões com nove dias de desenvolvimento já apresentam grande produção de granulócitos e eritrócitos no saco vitelínico, o que se mantém por vários dias, visto que este é o principal sítio de expansão da hematopoese nesses animais, e estão iniciando a formação da medula óssea, a qual recebe granulócitos e células imaturas, mas ainda não apresenta atividade hematopoética (91).

Os estudos de patologia da febre amarela, em humanos, primatas não humanos e hamsters, apontam o fígado, os rins e o coração como os principais

órgãos acometidos pela infecção (27, 28, 32-37, 102). Casos humanos fatais da doença viscerotrópica associada à vacina possuem, em geral, o mesmo padrão histopatológico que a doença causada pelo vírus selvagem (7, 76, 77). Em nosso trabalho, não detectamos a produção de componentes virais no fígado dos embriões infectados com o vírus FA 17DD, embora os rins e o coração tenham se mostrado infectados, mesmo que sem grande intensidade. Por outro lado, encontramos infecção preponderante em músculo esquelético e, em menor intensidade, no sistema nervoso. Ao passo que este último pode guardar certa correspondência com os quadros de reação neurotrópica à vacina, o primeiro é difícil de correlacionar com os estudos em humanos. Isto decorre do fato de que os artigos que realizam análise histopatológica dos órgãos de pacientes com reação à vacina não incluem o tecido muscular entre os tecidos analisados. Dessa forma, existe a possibilidade do músculo ser também um alvo da infecção do vírus vacinal em humanos e estar subdiagnosticado pelo fato deste ser um alvo não rotineiramente analisado.

A ausência de alterações e positividade para o antígeno viral no fígado dos animais estudados é um dos dados que chama maior atenção em nossos achados. Em macacos Rhesus inoculados intraperitonealmente, células de Kupffer infectadas são observadas 24 horas após a inoculação (8). Em um modelo próximo do aqui estudado, Fox e Laemmert mostraram em embriões de galinha infectados com a cepa FA 17D-204, que é possível identificar por testes funcionais o vírus no fígado destes embriões, embora em títulos menores que os encontrados nos demais órgãos estudados (86). A aparente contradição entre nossos dados e os destes autores pode ser explicada, pois naquele trabalho, não é possível descartar uma possível (e provável) presença de partículas virais no sangue circulante no interior do fígado, que se caracteriza por um órgão altamente vascularizado. Por outro lado, é possível que as técnicas empregadas em nosso trabalho não tenham sensibilidade suficiente para detectar os componentes virais nos níveis que se encontram nesse órgão. Ainda, não podemos afirmar se ocorre algum tipo de alteração histopatológica em tempos não observados. Como já mencionado, as células de Kupffer são as primeiras a se infectar no fígado (27). Alguns autores afirmam que estas células formam uma barreira de proteção para os hepatócitos, que só se infectariam em momento tardio, após aquelas sofrerem apoptose (8, 27, 38). Em embriões de galinha, as células de Kupffer surgem a partir do 14º dia de desenvolvimento (103). É possível imaginar que as células de Kupffer sejam, na verdade, um elemento

propagador do vírus neste órgão e que a ausência destas células em embriões de galinha nesta fase de desenvolvimento, seja um dos motivos para que neste modelo o fígado não seja infectado.

A infecção pela cepa selvagem do vírus da Febre Amarela no epitélio tubular renal já foi demonstrada em humanos e em macacos Rhesus (8, 36, 51). Em casos humanos fatais a presença de antígeno viral no citoplasma de células do epitélio tubular renal foi detectada por imunohistoquímica (51). Em Golden Hamster, foram observadas pequenas alterações nos túbulos renais após um ou dois dias de infecção, as quais aparentemente não estavam ligadas à infecção (33). Em nosso estudo, observamos células infectadas pelo vírus FA 17DD nos túbulos renais, evidenciadas pela técnica de imunofluorescência. Na mesma área onde foi identificado o antígeno viral, foram observadas células em apoptose. Não observamos em *Gallus gallus* falência renal subsequente, como observada em humanos e em Rhesus. Aparentemente, os danos no rim destes animais são muito brandos quando comparados àqueles modelos. A presença de proteínas virais na luz do epitélio tubular renal é um dado interessante quando comparado com achados que evidenciam a presença de vírus FA 17DD na urina de pacientes após receberem esta vacina (104). Esse dado corrobora a capacidade de produção do vírus FA 17DD por células do túbulo renal humanas.

Detectamos a presença de vírus no miocárdio dos animais infectados onde foram encontradas também células em apoptose. Face ao estágio de desenvolvimento, não foi possível definir alguma eventual predileção da infecção por alguma câmara cardíaca. A presença de proteínas virais no coração já foi identificada em humanos, onde é possível encontrar antígenos virais no miocárdio, que apresentam padrão necroapoptótico e esteatose semelhante ao que ocorre nos rins e no fígado (8, 51). No modelo aqui estudado não encontramos esteatose, e embora sejam vistas figuras apoptóticas nas áreas acometidas não há necrose associada aparente.

As cepas selvagens do vírus da Febre Amarela são predominantemente viscerotrópicas em humanos e primatas não humanos, e neurotrópicas em camundongos e coelhos (8). Embora seja incomum, existem relatos de doença neurotrópica ligada à vacina de febre amarela, os quais, em sua maioria, ocorrem

em crianças menores de nove meses, ou pacientes imunodeprimidos (1, 105, 106). É interessante notar que, durante o processo de atenuação da amostra retirada do paciente Asibi após sucessivas passagens em cérebro de camundongo, o vírus se tornou neurovirulento, sendo necessárias passagens em tecidos de embriões de galinha sem sistema nervoso para reduzir esta característica nas cepas FA 17D (106). Nossos dados mostram que em embriões de galinha a cepa FA 17DD infecta células do sistema nervoso no cérebro e na medula espinhal, o que denota relativa neurocompetência para produção viral. Contudo, a infecção do sistema nervoso neste modelo é provavelmente facilitada pela imaturidade da barreira hematoencefálica nesta fase de desenvolvimento (94). Testes de permeabilidade à peroxidase mostraram que embriões de *Gallus gallus* não possuem barreira hematoencefálica até o 12º dia de desenvolvimento. Esta se forma a partir do 13º dia, quando ainda se restringe à medula espinhal, e se completa em torno do 15º dia, quando envolve todo o sistema nervoso (94).

Foi possível identificar nesse trabalho células musculares esqueléticas infectadas em todo o embrião. Este tecido parece ser por sua extensão ao longo do corpo e intensidade de infecção observada, o principal sítio de produção viral neste modelo. Este dado é inédito e especialmente importante na medida em que nenhum trabalho sobre a histopatologia da febre amarela menciona infecção neste tecido. Nossos dados corroboram um dos dados de Fox e Laemmert (86) que, ao estudarem o título viral da cepa FA 17D NY104, através da inoculação de macerado de embriões de galinha em diferentes fases do desenvolvimento no cérebro de camundongos, identificaram grande quantidade de vírions nos tecidos musculares e nervoso, após 72 horas de infecção. Embora não pareçam existir outros dados sobre a infecção muscular por este vírus, é sabido que clinicamente um dos principais sintomas da febre amarela é a mialgia, além do aumento expressivo de aminotransferases em pacientes graves, que pode talvez ser explicado pelo efeito citopático no músculo cardíaco e no músculo esquelético (27, 28). Da mesma forma, um dos sintomas comuns na administração da vacina é a manifestação de mialgia (6, 49). Habitualmente, esta mialgia (tanto da doença, quanto a vacinal) é interpretada como manifestação secundária à elevação de interferon no decurso da infecção. Embora seja necessário aprofundar este dado, verificando sua ocorrência em humanos, a infecção destas células e a consequente rabdomiólise observada justificariam estes sintomas e o aumento de aspartato aminotransferase (AST).

Como mencionado anteriormente, os estudos sobre histopatologia da febre amarela e da reação viscerotrópica vacinal em humanos, não abordam o tecido muscular, tanto no sentido de indicá-lo quanto de excluí-lo como um sítio de infecção. É sabido que outros arbovirus relacionados, com sintomas de mialgia semelhantes à febre amarela, como os vírus Chikungunya (107), Mayaro (108) e Ross River (109), infectam células musculares de humanos e em modelos experimentais. Ainda sobre as células musculares esqueléticas, um padrão de localização do antígeno viral particular foi observado nestas células. Além do padrão perinuclear já mencionado, observamos adensamentos de proteínas virais que acompanhavam as estriações das células, de modo compatível com a localização do retículo sarcoplasmático.

Alterações no pulmão secundárias à febre amarela são raras em humanos e em macacos Rhesus infectados experimentalmente. Em ambos os modelos, o pulmão é ictérico, edemaciado e hemorrágico, denotando reações secundárias à infecção (36, 50). Em Golden Hamster, o acometimento pulmonar é igualmente raro, tendo sido observadas necrose no parênquima e hemorragia (33). Da mesma forma, em nosso estudo encontramos apenas algumas células infectadas no parênquima pulmonar, acompanhadas de figuras de apoptose. Cabe ressaltar que o epitélio da árvore respiratória em formação apresentava também células em mitose, em apoptose, ou exibindo brotamento citoplasmático, eventos que, após a leitura comparativa com diversos embriões controles não infectados, e utilizando a imunofluorescência para comprovar a ausência de componentes virais, mostraram-se fisiológicos do desenvolvimento e não relacionados à infecção.

Em casos humanos graves de febre amarela, as alterações observadas no trato digestório estão diretamente ligadas às disfunções ocorridas na homeostase da coagulação (50). Em nosso modelo, não observamos hemorragia no trato digestório, bem como em nenhum órgão analisado. No entanto, células infectadas foram observadas na parede muscular da moela, de modo que acreditamos que a infecção neste órgão esteja ligada ao tipo celular e não à sua localização. Considerando que a origem embriológica comum entre o pulmão e o intestino, não foi surpresa encontrar o mesmo padrão fisiológico de mitoses, apoptoses e projeções citoplasmáticas no epitélio intestinal, o qual, da mesma forma, tratava-se de evento fisiológico.

Raros fibroblastos esparsos também puderam ser observados infectados em diferentes tecidos do animal. A infecção de fibroblastos em cultura já é conhecida (24), mas aparentemente a susceptibilidade destas células a infecção *in vivo* parece não ser tão expressiva quanto *in vitro*.

Após observar as alterações ocorridas no ponto onde os animais são coletados para produção da vacina (72 horas), sentimos a necessidade de compreender a infecção de maneira cinética. Estudar apenas este ponto não nos permitia compreender como nem quando as células musculares e demais células se infectavam, e mesmo como ocorria a disseminação do vírus no embrião, uma vez que não observávamos qualquer alteração na membrana vitelínica, após 72 horas de infecção.

Neste contexto, no primeiro ponto estudado, após 24 horas de infecção, não foi possível detectar a presença de RNA viral por nested-PCR, nem da proteína viral por imunofluorescência. Da mesma forma, não observamos alterações histopatológicas em nenhuma das amostras estudadas. Acreditamos que o breve período de infecção após a inoculação da amostra no saco vitelínico não tenha gerado título suficiente para a detecção dos componentes virais pelas técnicas empregadas neste trabalho. Cabe ressaltar que, quando observado em cultura, o vírus da Febre Amarela selvagem infecta um número baixo de células após 24 horas, atingindo 100% de infecção apenas após 72 horas (99). Esse comportamento cinético de infecção corrobora nossos resultados. Em seu trabalho, Fox e Laemmert obtiveram efeito neuropático no cérebro de camundongos infectados com extrato embrionário de todo o corpo de embriões infectados por 24 horas com a cepa FA 17D-204 (86), mas a técnica empregada por estes autores não permite distinguir se os vírions estariam sendo produzidos em determinado tecido ou presentes no sangue circulante.

O limite de detecção teórico por *nested-PCR* para YF extraído de cultura celular é de 0,7 PFU/ml (110). Em nosso trabalho, uma quantidade cerca de 1.000 vezes maior (1.000 PFU) foi inoculada em cada embrião estudado. Contudo, é necessário considerar que parte do inóculo possivelmente é perdida antes de atingir os tecidos competentes. Além disso, durante a extração de RNA em amostras fixadas e processadas para parafina, apenas pequenos fragmentos do embrião (20

um de cada bloco) foram utilizados, o que poderia justificar a ausência de detecção no ponto inicial. Um fator limitante no uso de RNA extraído em material parafinado se deve aos efeitos da fixação e do processamento na qualidade e quantidade do material extraído (111). Entretanto, a possibilidade de integrar a análise morfológica com a detecção do material genético viral torna essa ferramenta extremamente valiosa. Além disso, nossas amostras tiveram qualidade suficiente para que fossem sequenciadas, o que confere relativa qualidade ao produto de nossa técnica. É importante ressaltar o emprego desta ferramenta no estudo dos flavivírus, uma vez que, em alguns casos, o material parafinado de uma necropsia é a única fonte de ácido nucléico para estudos moleculares (112).

Em humanos, a infecção natural pelo vírus da Febre Amarela e outros flavivirus, tem início em células dendríticas residentes na pele (8, 27, 39, 40), que são drenadas para os linfonodos, onde os vírus são replicados e lançados na corrente sanguínea gerando a primeira viremia (8, 27, 38, 41, 42). Uma vez na via hematogênica, os vírus atingem os demais órgãos competentes, tais como o fígado, os rins, o coração, o baço e outros (28, 38). Embora desempenhem papel fundamental na fase inicial da infecção, os dados morfológicos disponíveis sobre os efeitos da infecção nos linfonodos nesta fase são escassos e sugerem apenas efeito indireto, manifesto pela hiperplasia folicular e depleção dos linfócitos (43). Ainda em humanos quando há o emprego da vacina, após a inoculação do vírus FA 17DD ocorre baixa replicação nas células dendríticas, que também são drenadas para os linfonodos promovendo a resposta adaptativa humoral e a resposta mediada por células (1). No modelo *Gallus gallus*, embora o vírus vacinal tenha sido inoculado na membrana vitelínica dos embriões, como habitualmente se faz na produção da vacina, não foi possível identificar, por imunofluorescência, a presença do antígeno viral em células da membrana vitelínica, do endotélio da parede de vasos e, mesmo, circulantes no interior de vasos sanguíneos nem após 24 horas de infecção, nem nos demais tempos de infecção estudados. Da mesma forma, também não foi possível identificar o genoma viral nas amostras de membrana vitelínica, por *nested-PCR*, em nenhum dos pontos estudados. Desta maneira, é interessante refletir sobre como os vírions atingem os órgãos que se infectam nos tempos subsequentes. A membrana vitelínica é um órgão extremamente vascularizado, e que nesta fase do desenvolvimento é responsável por grande parte da produção das células sanguíneas circulantes (91). A ausência de indícios de infecção nestas células nos

permite sugerir, que aparentemente o inóculo, uma vez na membrana, é transportado passivamente pela circulação, até atingir os órgãos competentes para produção viral.

A partir de 48 horas de infecção foi possível identificar células infectadas em tecido muscular esquelético e cardíaco. As células infectadas apresentavam padrão mesenquimal, sugestivas de mioblastos. Quando detectadas, o número de células positivas para o antígeno viral era pequeno. Acreditamos que a quantidade de células infectadas não foi suficiente para gerar título capaz de ser detectado por RT-PCR em amostras extraídas do material parafinado. Em nosso estudo, a imunofluorescência foi mais sensível, ao menos no ponto de 48 horas, em detectar os componentes virais do que a técnica de *nested*-PCR em material fixado em formalina e processado para inclusão em parafina. De maneira contrária, um trabalho utilizando Vírus do Oeste do Nilo, observou que a técnica de *nested*-PCR foi mais sensível que a de imunohistoquímica (112). Os aspectos que poderiam justificar essa divergência são múltiplos, tais como a qualidade dos anticorpos empregados, o tipo de recuperação antigênica, o processamento ao qual as amostras foram submetidas, entre outros, o que torna difícil a comparação entre os estudos.

A formação de feixes musculares em embriões de galinha ocorre entre o 8º e o 18º dia do desenvolvimento embrionário (92). Entre o 8º e o 12º dia ocorre um pico de formação de miotubos com conseqüente diminuição de mioblastos no tecido (92, 113). Dentro deste período de desenvolvimento, observamos mioblastos positivos no tecido muscular, e no ponto seguinte (72 horas de infecção/ 12 dias de desenvolvimento), feixes musculares inteiramente infectados. Em alguns campos, mioblastos e feixes musculares infectados foram observados em associação. Já com 96 horas de infecção, apenas fibras musculares foram observadas infectadas. Este fenômeno é interessante uma vez que aparentemente as primeiras células a serem infectadas são os mioblastos ou células mesenquimais, que em seguida dão origem a feixes musculares infectados. Não observamos em animais infectados por 48 horas com 11 dias de desenvolvimento feixes musculares infectados. Como elemento de comparação, o vírus Chikungunya é replicado especificamente em células satélites humanas (107) que são células progenitoras do tecido muscular (114). A importância das células mesenquimais também é expressa quando

observamos positividade para o antígeno viral em outros órgãos do embrião. Identificamos células infectadas na parede muscular da moela, do cordão vitelínico e do parênquima pulmonar. Células fibroblastóides da derme, do pericôndrio e da meninge, que também tem origem mesenquimal, também são positivas. Nossos dados apontam que, embora células de outras origens embrionárias também se infectem, as células de origem mesenquimal parecem ter um papel mais importante na produção do vírus FA 17DD.

Em *Gallus gallus* a expressão de desmina não se restringe às células musculares esqueléticas, mas também às células com padrão mesenquimal. O uso de um anticorpo contra esta proteína auxiliou na detecção de células musculares esqueléticas em diferentes regiões do animal, além de permitir a evidênciação de células mesenquimais infectadas no parênquima pulmonar. Cabe salientar aqui que nenhum marcador específico de célula mesenquimal, além da desmina, foi utilizado neste trabalho. A localização destas células e seu padrão morfológico nos permite inferir que são células imaturas que darão origem a músculo, no caso dos tecidos musculares, ou a fibroblastos no caso dos tecidos conjuntivos. Contudo, qual grau de maturidade essa célula já atingiu não podemos afirmar, por isso optamos por cuidadosamente neste trabalho, tratar destas células como mioblastos com padrão mesenquimal, ou células com padrão mesenquimal, fibroblastóides, dependendo de sua localização.

Em embriões de galinha infectados com a cepa FA 17D-204 ocorre viremia entre 48 e 72 horas de infecção (86). Em nosso trabalho observamos um aumento do número de células e tecidos infectados entre este período. Em adição ao que vimos em 48 horas, com 72 horas pós-infecção o antígeno viral pode ser detectado por imunofluorescência além dos músculos esquelético e cardíaco, também em túbulos renais, camada muscular da moela e do cordão vitelínico, parênquima pulmonar, tecido nervoso, e em células fibroblastóides do tecido conjuntivo da derme, meninges e do pericôndrio, conforme já discutido. Cabe ressaltar novamente que nos locais onde houve positividade por imunofluorescência foi possível observar corpos apoptóticos. Este dado é semelhante ao observado em humanos e hamsters, onde trabalhos mostram que o mecanismo de morte celular predominante na infecção pelo vírus da Febre Amarela selvagem é a apoptose, que pode ter origem intrínseca ou extrínseca (33, 38, 41, 42). Embora neste estudo, não tenhamos

empregado marcadores moleculares de apoptose, a ausência de maturidade do sistema imunológico destes animais, bem como a ausência de reação celular nas regiões infectadas nos permite inferir que o mecanismo de apoptose neste caso é intrínseco. Em geral, a presença de corpos apoptóticos em humanos, primatas não humanos e hamsters é acompanhada de microesteatose nos órgãos afetados (8, 33, 38), o que em nosso modelo não foi observado. Cabe ressaltar que em nenhum dos pontos ou órgãos estudados encontramos indício de microesteatose. Ainda sobre a apoptose, em todos os animais estudados, o número de células infectadas era sempre superior ao número de células em apoptose, que em geral ocorriam em regiões pontuais em um pequeno número de células. Esse dado está diretamente relacionado à biossíntese do vírus da Febre Amarela, a qual induz apoptose tardiamente em células infectadas (99).

Após 96 horas de infecção, o efeito citopático nas células infectadas, manifestado pela presença de corpos apoptóticos, foi mais visível, embora permanecesse raro. Quando comparado com a cinética de FA 17D-204 em embriões de galinha, neste período há uma estabilização do título infeccioso, e há concentração maior de vírions na cabeça e nos músculos dos animais (86). Convergentemente, encontramos aumento do número de células infectadas no cérebro dos animais estudados em nosso trabalho.

A escolha do momento de inoculação bem como o período de infecção para produção da vacina contra febre amarela se baseou na relação ideal entre título viral e mortalidade dos embriões (63, 86, 115). Para Fox e Laemmert o pico de infecção em embriões de galinha infectados pela subcepa FA 17DD ocorria em 72 horas (86). Segundo Penna (115) em seu manual de produção da vacina, o momento ideal de coleta dos embriões era com 72 horas de infecção. Contudo admitia-se um período de 96 horas em alguns laboratórios. Em nosso trabalho, mostramos segundo critérios morfológicos, que aparentemente não há aumento de infecção entre 72 e 96 horas, com exceção das células do sistema nervoso.

Alguns autores acreditam que o vírus FA 17DD não consiste em uma população clonal, e sim em uma mistura de subpopulações (24). Nossas análises por sequenciamento, realizadas para confirmar a especificidade das técnicas de *nested-PCR* e imunofluorescência apresentaram homologia de 100% com a

referência da vacina. Contudo, uma vez que nossas amostras não foram extraídas de cada órgão ou célula separadamente, não podemos descartar a possibilidade de que subpopulações minoritárias sejam produzidas preferencialmente em algum órgão ou tecido. Desse modo, o aumento de células infectadas no cérebro pode ocorrer tardiamente na infecção, em função das células neste órgão dependerem mais tempo na replicação do vírus, ou pelo crescimento de uma subpopulação minoritária que preferencialmente é replicada pelo sistema nervoso. Acreditamos que nossos dados sustentam a escolha de 72 horas de infecção como o melhor momento para coleta do embrião, uma vez que não há benefícios no aumento de partículas virais após esse ponto. Além disso, o uso do embrião com 96 horas de infecção poderia aumentar a chance de inclusão de uma eventual subpopulação que se propagaria preferencialmente no cérebro.

Em conclusão, acreditamos que o conjunto de dados gerados neste trabalho contribui para elucidar aspectos importantes sobre a patologia da febre amarela em embriões de galinha, e elucidar os tecidos e células responsáveis pela produção do vírus FA 17DD nestes embriões. O conjunto de dados aqui apresentados nos permite concluir que a infecção de embriões de *Gallus gallus* é branda e sistêmica, acomete diferentes tecidos e células, com origens embrionárias distintas, embora nem todas as células sejam capazes de propagar o vírus. O tecido muscular é o primeiro a manifestar a infecção. As células imaturas ou mioblastos com padrão mesenquimal, presentes neste tecido, desempenham papel importante no início da infecção e dão origem às fibras musculares, as quais permanecem infectadas e produzindo os componentes do vírus FA 17DD. Por sua extensão no corpo do animal, bem como pela intensidade de marcação das células, o tecido muscular parece ser o principal sítio de produção deste vírus, sendo necessários estudos que aprofundem os aspectos desta infecção, inclusive buscando detectar a presença deste vírus e do vírus selvagem da febre amarela em tecidos musculares de pacientes. Além disso, observamos que há um incremento no número de células infectadas no tecido nervoso após 96 horas de infecção, que associado a outros fatores, sustenta o tempo de 72 horas de infecção como o melhor ponto para coleta dos embriões para confecção da vacina e aponta para uma possível presença de uma subpopulação com maior afinidade neurotrópica. Estes dados podem, inclusive, ser úteis na compreensão e formulação de novas estratégias de produção da vacina, na medida em que uma vacina produzida em um modelo baseado em cultura celular

poderia diminuir consideravelmente a quantidade de proteína de galinha nestas vacinas e que as células musculares se mostraram candidatas a este papel (24, 67).

6. Perspectivas

Considerando que a infecção do vírus vacinal da Febre Amarela 17DD em embriões de galinha é um tema pouco estudado, a presente tese cria a possibilidades de desdobramentos interessantes.

No que tange a infecção da célula muscular, seria importante avaliar a capacidade de infecção destas células *in vitro*. Mioblastos extraídos de embriões de galinha podem ser cultivados em meios enriquecidos com fatores de diferenciação para formação de miotubos e fibras musculares. Em se comprovando a infectividade destas células *in vitro*, a infecção em diferentes fases de diferenciação apontará se os mioblastos são mais suscetíveis à infecção e se as fibras musculares já formadas são capazes de se infectar em cultura. Após determinar o melhor ponto de infecção, este modelo permitirá o desenvolvimento de uma série de trabalhos sobre a característica da infecção nesta célula. Seria possível, por exemplo, aprofundar, por meio de ultraestrutura, a infecção viral no sarcolema. Também seria importante analisar a capacidade de células musculares humanas e de camundongos se infectarem com este vírus. Após aprofundar o conhecimento sobre este modelo, e este se mostrando realmente viável, caberá validar a produção de vacina nestas células, especialmente testando sua virulência e viabilidade de produção. Todas essas análises podem ainda ser testadas em células musculares cardíacas.

Para avaliar se a infecção, pelo vírus selvagem, em células musculares ocorre em humanos e primatas não humanos, seria interessante buscar parcerias em hospitais e no centro de referência de epizootias, onde houvesse necropsias de pacientes ou macacos infectados naturalmente por febre amarela. Nestas, observar se há fragmentos de músculo esquelético colhidos e neles observar por imunofluorescência e nested-PCR se há infecção. Outra abordagem bastante interessante seria analisar amostras de sangue colhidas de pacientes primovacinação, antes da vacinação e após três, seis e quinze dias. A dosagem diferencial de transaminases séricas (AST e ALT) traria indícios se o vírus vacinal da

Febre Amarela 17DD causa danos em células musculares, esqueléticas e cardíacas, após a vacinação.

Seria ainda interessante aprofundar os achados relacionados à infecção no sistema nervoso. Uma abordagem possível seria coletar apenas o cérebro de embriões de galinhas infectados e purificar o vírus deste órgão. Em seguida, fazer passagens seriadas em novos embriões, utilizando sempre amostras extraídas apenas do cérebro. Após isso, avaliar se há mudança de padrão de infecção e seleção de uma amostra na qual predomine a infecção em células do sistema nervoso. Os vírus purificados das amostras de cérebro podem ser comparados com outros purificados de músculo através de técnicas de sequenciamento. Além disso, caberia estudar a composição glicídica presente no envelope das partículas de cada amostra e observar se há diferença nesta composição.

Os dados aqui apresentados podem ainda ser úteis como modelo de referência, para avaliar o padrão de infecção de vírus geneticamente modificados em embriões de galinha. Estes vírus produzidos pelo laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus com a inserção de fragmentos exógenos podem ser comparados em sua capacidade infecciosas com os vírus vacinais FA 17DD não mutados. Ainda o uso de construtos com proteínas fluorescentes (ex. GFP) pode complementar a análise de dispersão viral estudada neste trabalho, podendo ser ferramenta importante principalmente nos pontos mais precoces da infecção, os quais tanto a imunofluorescência quanto o nested-PCR não tiveram sensibilidade para detectar o vírus.

Ainda no modelo apresentado nesta tese, é possível aprofundar o estudo em tempos maiores de infecção avaliando até quando esta persiste, e se há alterações em órgãos diferentes dos aqui apresentados.

Em conjunto, estas abordagens trarão contribuições importantes para o conhecimento da patologia e da fisiopatologia da febre amarela, com possíveis desdobramentos tecnológicos e amplo campo para formação de recursos humanos.

7. Conclusões

Os principais achados neste trabalho são:

1- Não há sinais de infecção detectáveis pelas técnicas utilizadas neste trabalho na membrana vitelínica, espaço onde ocorre a inoculação da amostra viral;

2- A infecção atinge níveis detectáveis, pelas técnicas empregadas neste trabalho, após 48 horas de infecção. Neste ponto, as primeiras células a expressarem a infecção são mioblastos, ou células com padrão mesenquimal no músculo esquelético e cardíaco;

3- Após 72 horas de infecção, ocorre aumento no número de células infectadas que são evidentes em diversos tecidos, como músculo esquelético, músculo cardíaco, epitélio tubular dos rins, tecido nervoso, parênquima pulmonar, células musculares da parede da moela e da parede do cordão vitelínico, tecido conjuntivo dérmico, pericôndrio e meninge;

4- Em embriões de *Gallus gallus domesticus*, não ocorre reação inflamatória aparente nos locais onde foi evidenciada a presença do Vírus da Febre Amarela. Nestes tecidos, são poucas, porém evidentes, figuras de apoptose, que aparentam ser a forma de morte celular que ocorre neste modelo e que colocalizam com a presença do vírus;

5- As regiões infectadas permanecem até pelo menos 96 horas, com destaque para o cérebro, onde, nesse momento, ocorre aumento do número de células infectadas entre 72 e 96 horas após infecção.

6- Em nenhum dos pontos estudados observamos a presença de vírus, ou mesmo quaisquer alterações histopatológicas no fígado.

Podemos concluir que a infecção em *Gallus gallus* é branda e sistêmica, se manifestando nos tecidos por pequenos grupos de células infectadas que sofrem apoptose. Esta infecção inicia sua dispersão de forma aparentemente passiva pela circulação, infectando inicialmente células musculares esqueléticas e cardíacas e em seguida células de diversos tecidos persistindo até pelo menos 96 horas. Não há seletividade entre vísceras e sistema nervoso neste modelo, com destaque para o fígado, principal órgão acometido na infecção de outros modelos que aparentemente não é infectado em embriões de galinha. O músculo esquelético parece ser o principal sítio de replicação do vírus FA 17DD em *Gallus gallus*, sendo um grande candidato à possíveis testes de produção deste vírus em cultura de células.

8. Referências Bibliográficas

1. Barrett AD, Teuwen DE. Yellow fever vaccine—how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? *Current opinion in immunology*. 2009;21(3):308-13.
2. Pastorino B, Nougairède A, Wurtz N, Gould E, de Lamballerie X. Role of host cell factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. *Antiviral research*. 2010;87(3):281-94.
3. Post PR, Carvalho Rd, Freire MdS, Galler R. The early use of yellow fever virus strain 17D for vaccine production in Brazil—a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2001;96(6):849-57.
4. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine*. 2012;30(29):4301-6.
5. Robertson SE, Hull BP, Tomori O, Bele O, LeDuc JW, Esteves K. Yellow fever: a decade of reemergence. *Jama*. 1996;276(14):1157-62.
6. Staples JEG, M.; Fischer, M. Yellow fever vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *MMWR Recomm Rep*. 2010 Jul 30;59(RR-7):1-27.
7. Lown BA, Chen LH, Wilson ME, Sisson E, Gershman M, Yanni E, et al. Vaccine administration decision making: the case of yellow Fever vaccine. *Clinical Infectious Diseases*. 2012;55(6):837-43.
8. Monath TP, Barrett AD. Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever. *Advances in virus research*. 2003;60:343-95.
9. Elmendorf JE, Smith HH. Multiplication of yellow fever virus in the developing chick embryo. *Experimental Biology and Medicine*. 1937;36(2):171-4.
10. Guy B, Guirakhoo F, Barban V, Higgs S, Monath TP, Lang J. Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses. *Vaccine*. 2010;28(3):632-49.

11. Nogueira RT, Nogueira AR, Pereira MC, Rodrigues MM, Galler R, Bonaldo MC. Biological and immunological characterization of recombinant Yellow Fever 17D viruses expressing a Trypanosoma cruzi Amastigote Surface Protein-2 CD8+ T cell epitope at two distinct regions of the genome. *Virology*. 2011;8:127.
12. Bonaldo MC, Sequeira PC, Galler R. The yellow fever 17D virus as a platform for new live attenuated vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2014 05/01;10(5):0--1.
13. Beck A, Guzman H, Li L, Ellis B, Tesh RB, Barrett AD. Phylogeographic Reconstruction of African Yellow Fever Virus Isolates Indicates Recent Simultaneous Dispersal into East and West Africa. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(3):e1910.
14. Barrett AD, Higgs S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. *Annu Rev Entomol*. 2007;52:209-29.
15. Forrester NL, Guerbois M, Seymour RL, Spratt H, Weaver SC. Vector-borne transmission imposes a severe bottleneck on an RNA virus population. *PLoS pathogens*. 2012;8(9):e1002897.
16. Erickson AK, Pfeiffer JK. Dynamic viral dissemination in mice infected with yellow fever virus strain 17D. *Journal of virology*. 2013;87(22):12392-7.
17. Xie H, Cass AR, Barrett AD. Yellow fever 17D vaccine virus isolated from healthy vaccinees accumulates very few mutations. *Virus research*. 1998;55(1):93-9.
18. Tolou H, Nicoli J, Pisano M-R. Homogeneity of yellow fever virus strains isolated during an epidemic and a post-epidemic period in West Africa. *Virus genes*. 1997;14(3):225-34.
19. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Advances in virus research*. 2003;59:23-61.
20. Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *Journal of general virology*. 2006;87(9):2605-14.
21. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*. 2005;3(1):13-22.
22. Yu I-M, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, et al. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science*. 2008;319(5871):1834-7.
23. Khaiboullina SF, Rizvanov AA, Holbrook MR, St Jeor S. Yellow fever virus strains Asibi and 17D-204 infect human umbilical cord endothelial cells and induce novel changes in gene expression. *Virology*. 2005;342(2):167-76.

24. Freire MS, Mann GF, Marchevsky RS, Yamamura AM, Almeida LF, Jabor AV, et al. Production of yellow fever 17DD vaccine virus in primary culture of chicken embryo fibroblasts: yields, thermo and genetic stability, attenuation and immunogenicity. *Vaccine*. 2005;23(19):2501-12.
25. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, et al. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell host & microbe*. 2009;5(4):365-75.
26. Pierson TC. The flavivirus lifecycle http://www.niaid.nih.gov/LabsAndResources/labs/aboutlabs/lvd/ViralPathogenesisSection/pages/default.aspx#niaid_inlineNav_Anchor [cited 2014 28/01/2014].
27. Monath TP. Yellow fever: an update. *The Lancet infectious diseases*. 2001;1(1):11-20.
28. da Costa Vasconcelos PF. Febre amarela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2003;36(2):275-93.
29. Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. 2045 p.
30. Gardner CL, Ryman KD. Yellow fever: a reemerging threat. *Clinics in laboratory medicine*. 2010;30(1):237-60.
31. Franco O. História da Febre-Amarela no Brasil. In: Pública SdCdS, editor. Brasil: Brasil. Ministério da Saúde. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública; 1969.
32. Bearcroft W. The histopathology of the liver of yellow fever-infected rhesus monkeys. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 1957;74(2):295-303.
33. Xiao S-Y, Zhang H, Guzman H, Tesh RB. Experimental yellow fever virus infection in the Golden hamster (*Mesocricetus auratus*). II. Pathology. *Journal of Infectious Diseases*. 2001;183(10):1437-44.
34. Tesh RB, Guzman H, da Rosa APT, Vasconcelos PF, Dias LB, Bunnell JE, et al. Experimental yellow fever virus infection in the Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). I. Virologic, biochemical, and immunologic studies. *Journal of Infectious Diseases*. 2001;183(10):1431-6.
35. Sbrana E, Xiao S-Y, Popov VL, Newman PC, Tesh RB. Experimental yellow fever virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) III. Clinical laboratory values. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2006;74(6):1084-9.

36. Hudson NP. The Pathology of Experimental Yellow Fever in the Macacus Rhesus: II. Microscopic Pathology. *The American journal of pathology*. 1928;4(5):407.
37. Hudson NP. The Pathology of Experimental Yellow Fever in the Macacus Rhesus: III. Comparison with the Pathology of Yellow Fever in Man. *The American Journal of Pathology*. 1928;4(5):419.
38. Quaresma JA, Pagliari C, Medeiros D, Duarte MI, Vasconcelos PF. Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. *Reviews in medical virology*. 2013;23(5):305-18.
39. Barba-Spaeth G, Longman RS, Albert ML, Rice CM. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. *The Journal of experimental medicine*. 2005;202(9):1179-84.
40. Marovich M, Grouard-Vogel G, Louder M, Eller M, Sun W, Wu S-J, et al., editors. Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*; 2001: Nature Publishing Group.
41. Quaresma JAS, Barros VLRS, Fernandes ER, Pagliari C, Guedes F, Vasconcelos PFdC, et al. Immunohistochemical examination of the role of Fas ligand and lymphocytes in the pathogenesis of human liver yellow fever. *Virus research*. 2006;116(1):91-7.
42. Quaresma JA, Barros VL, Pagliari C, Fernandes ER, Guedes F, Takakura CF, et al. Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF- β , TNF- α and NK cells activity. *Virology*. 2006;345(1):22-30.
43. Klotz O, Belt T. The pathology of the spleen in yellow fever. *The American journal of pathology*. 1930;6(6):655.
44. Quaresma JA, Duarte MI, Vasconcelos PF. Midzonal lesions in yellow fever: A specific pattern of liver injury caused by direct virus action and in situ inflammatory response. *Medical hypotheses*. 2006;67(3):618-21.
45. Klotz O, Belt T. The Pathology of the Liver in Yellow Fiver. *The American journal of pathology*. 1930;6(6):663.
46. Quaresma JAS, Barros VLRS, Fernandes ER, Pagliari C, Takakura C, da Costa Vasconcelos PF. Reconsideration of histopathology and ultrastructural aspects of the human liver in yellow fever. *Acta tropica*. 2005;94(2):116-27.
47. Ross MH, Wojciech P. *Histologia: texto e atlas. Em correlação com a biologia celular e molecular*. 5^o ed: Guanabara Koogan; 2008. 908 p.

48. Quaresma JA, Barros VL, Pagliari C, Fernandes ER, Andrade Jr HF, Vasconcelos PF, et al. Hepatocyte lesions and cellular immune response in yellow fever infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007;101(2):161-8.
49. Monath TP. Yellow fever vaccine. 2005.
50. Strode GK. Yellow Fever. London: McGraw-Hill Book Company, INC.; 1951.
51. De Brito T, Siqueira S, Santos R, Nassar E, Coimbra T, Alves V. Human fatal yellow fever: immunohistochemical detection of viral antigens in the liver, kidney and heart. *Pathology-Research and Practice*. 1992;188(1):177-81.
52. Noisakran S, Onlamoon N, Hsiao H-M, Clark KB, Villinger F, Ansari AA, et al. Infection of bone marrow cells by dengue virus in vivo. *Experimental hematology*. 2012;40(3):250-9. e4.
53. Saúde FNd. Manual de vigilância epidemiológica da febre amarela. In: Saúde FNd, editor. Brasilia1999. p. 60.
54. Soper FL. Jungle Yellow Fever: A New Epidemiological Entity in South America. *Revista de Hygiene e Saúde Pública*. 1936;10:107 - 44.
55. Garske T, Kerkhove MDV, Yactayo S, Ronveaux O, Lewis RF, Erin J, et al. Yellow fever burden estimation: Summary2013.
56. (GAR) GAaR. Yellow fever in Paraguay - update 2 http://www.who.int/csr/don/2008_03_07/en/index.html2008 [cited 2014 17/01/2014].
57. MS SdVeS-. Emergências em Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN) de Febre Amarela Silvestre em São Paulo e no Rio Grande do Sul e a Situação Epidemiológica Atual no Brasil (2008/2009). In: Saúde MdS-SdVe, editor. 2009.
58. Moreno ES, Spinola R, Tengan CH, Brasil RA, Siciliano MM, Coimbra TLM, et al. Yellow fever epizootics in non-human primates, São Paulo state, Brazil, 2008-2009. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2013;55(1):45-50.
59. Dutary BE, Leduc JW. Transovarial transmission of yellow fever virus by a sylvatic vector, *Haemagogus equinus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1981;75(1):128.
60. Beaty BJ, Tesh RB, Aitken T. Transovarial transmission of yellow fever virus in *Stegomyia* mosquitoes. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1980;29(1):125-32.

61. Aitken T, Tesh RB, Beaty BJ, Rosen L. Transovarial transmission of yellow fever virus by mosquitoes (*Aedes aegypti*). *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1979;28(1):119-21.
62. Mondet B, Vasconcelos P, Travassos da Rosa A, Travassos da Rosa E, Rodrigues S, Travassos da Rosa J, et al. Isolation of yellow fever virus from nulliparous *Haemagogus* (*Haemagogus*) *janthinomys* in Eastern Amazonia. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. 2002;2(1):47-50.
63. Benchimol JL. Febre amarela: a doença ea vacina, uma história inacabada; Yellow fever: the disease and the vaccine, an unfinished history: Fiocruz; 2001.
64. Frierson JG. The yellow fever vaccine: a history. *The Yale journal of biology and medicine*. 2010;83(2):77.
65. Theiler M, Smith HH. The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. *The Journal of experimental medicine*. 1937;65(6):787-800.
66. Pulendran B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. *Nature Reviews Immunology*. 2009;9(10):741-7.
67. Rutkowski K, Ewan P, Nasser S. Administration of Yellow Fever Vaccine in Patients with Egg Allergy. *International archives of allergy and immunology*. 2013;161(3):274-8.
68. Jonker EF, Visser LG, Roukens AH. Advances and controversies in yellow fever vaccination. *Therapeutic Advances in Vaccines*. 2013;1(4):144-52.
69. Kengsakul K, Sathirapongsasuti K, Punyagupta S. Fatal myeloencephalitis following yellow fever vaccination in a case with HIV infection. *Chot Mai Het Thang Phaet*. 2002;85(1):131-4.
70. Azevedo L, Lasmar E, Contieri F, Boin I, Percegon L, Saber L, et al. Yellow fever vaccination in organ transplanted patients: is it safe? A multicenter study. *Transplant Infectious Disease*. 2012;14(3):237-41.
71. Poland J, Calisher CH, Monath T, Downs W, Murphy K. Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bulletin of the World Health Organization*. 1981;59(6):895.
72. Miller JD, van der Most RG, Akondy RS, Glidewell JT, Albott S, Masopust D, et al. Human Effector and Memory CD8⁺ T Cell Responses to Smallpox and Yellow Fever Vaccines. *Immunity*. 2008;28(5):710-22.
73. Santos APd, Bertho ÁL, Dias DC, Santos JR, Marcovistz R. Lymphocyte subset analyses in healthy adults vaccinated with yellow fever 17DD virus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005;100(3):331-7.

74. da Costa Neves PC, de Souza Matos DC, Marcovitz R, Galler R. TLR expression and NK cell activation after human yellow fever vaccination. *Vaccine*. 2009;27(41):5543-9.
75. Bonaldo MC, Martins MA, Rudersdorf R, Mudd PA, Sacha JB, Piaskowski SM, et al. Recombinant yellow fever vaccine virus 17D expressing simian immunodeficiency virus SIVmac239 gag induces SIV-specific CD8+ T-cell responses in rhesus macaques. *Journal of virology*. 2010;84(7):3699-706.
76. Rowland M, Plackett TP, Smith R. Yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease. *Military Medicine*. 2012;177(4):467-9.
77. Vasconcelos PF, Luna EJ, Galler R, Silva LJ, Coimbra TL, Barros VL, et al. Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases. *The Lancet*. 2001;358(9276):91-7.
78. Stern CD. The chick embryo – past, present and future as a model system in developmental biology. *Mechanisms of Development*. 2004 9//;121(9):1011-3.
79. Wolpert L. Much more from the chicken's egg than breakfast – a wonderful model system. *Mechanisms of Development*. 2004 9//;121(9):1015-7.
80. Bellairs R, Osmond M. *Atlas of chick development*: Academic Press; 2005.
81. Rous P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *The Journal of experimental medicine*. 1911;13(4):397-411.
82. Murphy JB, Rous P. The behavior of chicken sarcoma implanted in the developing embryo. *The Journal of experimental medicine*. 1912;15(2):119-32.
83. Woodruff AM, Goodpasture EW. The susceptibility of the chorio-allantoic membrane of chick embryos to infection with the fowl-pox virus. *The American journal of pathology*. 1931;7(3):209.
84. Burnet FM. *The Use of the Developing Egg in Virus Research*. Med Res Council Spec Rep Ser No 220. 1936.
85. Jadin J. Culture du virus de la fièvre jaune sur la membrane chorio-allantoidienne de l'embryon de poulet. *Ann Soc beige Med trop*. 1937;17(27):1937.
86. Fox JP, Jr HWL. The cultivation of yellow fever virus II. Observations on the infection of developing chick embryos. *The American journal of Hygiene*. 1947;46(1):21 -40.
87. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics*. 1992;195(4):231-72.

88. Gilbert SF, Bitondi MMG, Simoes ZLP. *Biologia do desenvolvimento: Sociedade Brasileira de Genética*; 1994.
89. Romanoff AL. *The avian embryo. Structural and functional development. The avian embryo Structural and functional development.* 1960.
90. Vargas A, Zeisser-Labouèbe M, Lange N, Gurny R, Delie F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the *in vivo* evaluation of drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2007;59(11):1162-76.
91. Guedes PT, de Abreu Manso PP, Caputo LFG, Cotta-Pereira G, Pelajo-Machado M. Histological Analyses Demonstrate the Temporary Contribution of Yolk Sac, Liver, and Bone Marrow to Hematopoiesis during Chicken Development. *PloS one.* 2014;9(3):e90975.
92. Zhou Z, DelProposto Z, Wu L, Xu J, Hua J, Zhou Y, et al. In ovo serial skeletal muscle diffusion tractography of the developing chick embryo using DTI: feasibility and correlation with histology. *BMC developmental biology.* 2012;12(1):38.
93. Martinsen BJ. Reference guide to the stages of chick heart embryology. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists.* 2005 Aug;233(4):1217-37. PubMed PMID: 15986452. Epub 2005/06/30. eng.
94. Wakai S, Hirokawa N. Development of the blood-brain barrier to horseradish peroxidase in the chick embryo. *Cell and tissue research.* 1978;195(2):195-203.
95. Diaz-Ruiz C, Perez-Tomas R, Cullere X, Domingo J. Immunohistochemical localization of transforming growth factor- α and epidermal growth factor-receptor in the mesonephros and metanephros of the chicken. *Cell and tissue research.* 1993;271(1):3-8.
96. Douarin N. An experimental analysis of liver development. *Medical biology.* 1975;53(6):427-55.
97. Maina J. Developmental dynamics of the bronchial (airway) and air sac systems of the avian respiratory system from day 3 to day 26 of life: a scanning electron microscopic study of the domestic fowl, *Gallus gallus* variant domesticus. *Anatomy and embryology.* 2003;207(2):119-34.
98. Gillespie LK, Hoenen A, Morgan G, Mackenzie JM. The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. *Journal of virology.* 2010;84(20):10438-47.
99. Marianneau P, Steffan A-M, Royer C, Drouet M-T, Kirn A, Deubel V. Differing infection patterns of dengue and yellow fever viruses in a human hepatoma cell line. *Journal of Infectious Diseases.* 1998;178(5):1270-8.

100. Davison T. The immunologists' debt to the chicken. *British poultry science*. 2003;44(1):6-21.
101. Lowenthal J, Connick TE, McWaters PG, York JJ. Development of T cell immune responsiveness in the chicken. *Immunology and cell biology*. 1994;72(2):115-22.
102. Engelmann F, Josset L, Girke T, Park B, Barron A, Dewane J, et al. Pathophysiologic and Transcriptomic Analyses of Viscerotropic Yellow Fever in a Rhesus Macaque Model. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(11):e3295.
103. Kanai M, Murata Y, Herbert DC, Soji T. Uptake behavior of embryonic chick liver cells. *The Anatomical Record*. 2007;290(7):862-74.
104. Domingo C, Yactayo S, Agbenu E, Demanou M, Schulz AR, Daskalow K, et al. Detection of yellow fever 17D genome in urine. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(2):760-2.
105. McMahon AW, Eidex RB, Marfin AA, Russell M, Sejvar JJ, Markoff L, et al. Neurologic disease associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of 15 cases. *Vaccine*. 2007;25(10):1727-34.
106. Martins RdM, Pavão ALB, de Oliveira PMN, dos Santos PRG, Carvalho SMD, Mohrdieck R, et al. Adverse events following yellow fever immunization: Report and analysis of 67 neurological cases in Brazil. *Vaccine*. 2014.
107. Ozden S, Huerre M, Riviere J-P, Coffey LL, Afonso PV, Mouly V, et al. Human muscle satellite cells as targets of Chikungunya virus infection. *PLoS One*. 2007;2(6):e527.
108. Shawn F. Taylor MD, Paresh R. Patel MD, Thomas J.S. Herold MD. Recurrent Arthralgias in a Patient With Previous Mayaro Fever Infection. *Southern Medical Journal*. 2005 04/01
2005/04/01;98(4):484-5.
109. Seay AR, Griffin DE, Johnson RT. Experimental viral polymyositis Age dependency and Immune responses to Ross River virus infection in mice. *Neurology*. 1981;31(6):656-.
110. Sánchez-Seco M, Rosario D, Domingo C, Hernandez L, Valdes K, Guzmán M, et al. Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *Journal of virological methods*. 2005;126(1):101-9.
111. Foss RD, Guha-Thakurta N, Conran RM, Gutman P. Effects of fixative and fixation time on the extraction and polymerase chain reaction amplification of RNA

from paraffin-embedded tissue: comparison of two housekeeping gene mRNA controls. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1994;3(3):148-55.

112. Bhatnagar J, Guarner J, Paddock CD, Shieh W-J, Lanciotti RS, Marfin AA, et al. Detection of West Nile virus in formalin-fixed, paraffin-embedded human tissues by RT-PCR: a useful adjunct to conventional tissue-based diagnostic methods. *Journal of clinical virology*. 2007;38(2):106-11.

113. Tokuyasu K, Maher PA, Singer S. Distributions of vimentin and desmin in developing chick myotubes in vivo. I. Immunofluorescence study. *The Journal of cell biology*. 1984;98(6):1961-72.

114. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*. 1961;9(2):493-5.

115. Penna H, Smithburn KC, Duriex C, Koerber R, Penna HA, Dick GWA, et al. Production of 17D yellow fever vaccine. *YF Vaccination Monograph Series*. 1956 (30):67-8.