

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

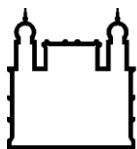
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

ESTUDO DE MUTAÇÕES NAS PROTEÍNAS VIRAIS E, NS3 E NS4B
NO GENOMA DO VÍRUS VACINAL DA FEBRE AMARELA 17D

NATHALIA DIAS FURTADO

Rio de Janeiro

2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

NATHALIA DIAS FURTADO

Estudo de mutações nas proteínas virais E, NS3 e NS4B no genoma do vírus vacinal da Febre Amarela 17D

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

Orientadora: Prof. Dr^a. Myrna Cristina Bonaldo

RIO DE JANEIRO

2018

Furtado, Nathalia Dias .

Estudo de mutações nas proteínas virais E, NS3 e NS4B no genoma do vírus vacinal da Febre Amarela 17D. / Nathalia Dias Furtado. - Rio de Janeiro, 2018.

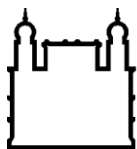
CXXXII, 132f. f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientadora: Myrna Cristina Bonaldo.

Bibliografia: f. 85-94

1. Mutagênese Sítio-Dirigida. 2. Vírus da Febre Amarela 17D. 3. Vetor Viral de Expressão Gênica. 4. Plataforma Vacinal. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

NATHALIA DIAS FURTADO

ESTUDO DE MUTAÇÕES NAS PROTEÍNAS VIRAIS E, NS3 E NS4B NO GENOMA DO VÍRUS VACINAL DA FEBRE AMARELA 17D

ORIENTADORA: Prof. Dr^a. Myrna Cristina Bonaldo

Aprovada em: 08 / 03 / 2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Pedro Paulo de Abreu Manso (IOC) – Presidente

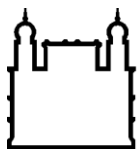
Prof. Dr. Ernesto Raúl Caffarena (PROCC)

Prof. Dr. Ronaldo da Silva Mohana Borges (UFRJ)

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira (IOC)

Prof^a. Dr^a. Leila de Mendonça Lima (IOC)

Rio de Janeiro, 08 de março de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

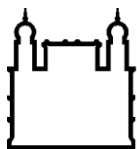
ESTUDO DE MUTAÇÕES NAS PROTEÍNAS VIRAIS E, NS3 E NS4B NO GENOMA DO VÍRUS VACINAL DA FEBRE AMARELA 17D

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Nathalia Dias Furtado

A Febre Amarela (FA) é uma doença infecciosa não contagiosa, causada por um arbovírus e objeto de preocupação sanitária mundial. A principal medida de controle é a vacinação com o vírus atenuado da FA, cepa 17D, que é capaz de induzir resposta imune protetora a longo prazo com administração em dose única. Vírus atenuados são potentes vetores de expressão, pois disseminam o antígeno no hospedeiro e induzem resposta imune protetora, contribuindo para o desenvolvimento de vacinas recombinantes. Diversas estratégias foram desenvolvidas para expressão de genes heterólogos pelo vírus vacinal FA 17D. Entretanto, a inserção induz proliferação viral e imunogenicidade reduzidas. Neste trabalho foi utilizado o vírus vacinal FA 17D recombinante expressando a proteína repórter *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) para avaliar o impacto de mutações específicas que possam modular a replicação viral. Mutações nas proteínas E, NS3 e NS4B foram descritas por aumentarem a proliferação viral em cultura de células e em camundongos, no genoma do vírus da dengue, sorotipos 1 e 2. As mutações em E₄₀₀ (F→L), E₄₀₃ (T→I), NS₃₄₃₉ (V→S) e NS_{4B54} (L→F) foram inseridas no genoma do vírus FA/EGFP, com a finalidade de caracterizar o seu efeito na proliferação viral e na indução de resposta imune humoral. O cDNA do genoma viral FA/EGFP foi utilizado para gerar vírus recombinantes carreando uma, duas ou três mutações. O estudo de proliferação viral foi realizado por cinética de infecção de células das linhagens Vero, Huh7 e C6/36. Os resultados mostram que os vírus da FA recombinantes se proliferam menos que o vírus vacinal FA 17DD. Além disso, a infectividade dos vírus mutantes em células de mamífero é diferente da infectividade em células de mosquito. Os vírus que carregam as mutações em E₄₀₀/NS₃₄₃₉ e E₄₀₀/NS₃₄₃₉/NS_{4B54} tem a proliferação viral significativamente prejudicada em células de mamífero. Os vírus que carregam a mutação em E₄₀₀ apresentaram aumento de proliferação viral em comparação com o vírus FA/EGFP original, em células de mosquito. As diferenças entre os tipos celulares podem ter sido causadas pelas características fisiológicas das células durante a infecção viral e pelas diferenças de propriedades das proteínas virais ocasionadas pela inserção das mutações. Não foi possível recuperar partículas virais infecciosas carreando a mutação em E₄₀₃. A modelagem molecular das proteínas virais mostrou diferenças discretas de carga, volume de superfície proteica e propriedade físico-química induzidas pelas mutações. Nenhuma das mutações influenciou nas interações intramoleculares. A imunogenicidade foi avaliada por imunização de camundongos das linhagens C57BL/6 e BALB/c com os vírus carreando mutações únicas e os soros foram analisados por PRNT e ELISA para obter os títulos de anticorpos neutralizantes para FA e anticorpos para GFP, respectivamente. Os soros dos camundongos imunizados com os vírus recombinantes apresentam menores títulos de anticorpos neutralizantes em comparação ao grupo imunizado com o vírus vacinal, porém não houveram alterações na indução de anticorpos para GFP. De maneira geral, as mutações em E₄₀₀ e E₄₀₃ produziram maiores efeitos sobre a proliferação viral e as mutações NS₃₄₃₉ e NS_{4B54}, na imunogenicidade.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTUDO DE MUTAÇÕES NAS PROTEÍNAS VIRAIS E, NS3 E NS4B NO GENOMA DO VÍRUS VACINAL DA FEBRE AMARELA 17D

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Nathalia Dias Furtado

Yellow Fever (YF) is a non-contagious infectious disease, caused by an arbovirus, and the subject of public health concern worldwide. The main measure of control is the vaccination with the attenuated YF virus, strain 17D, which is capable of inducing protective long-term immunity in a single dose. Attenuated viruses are potent expression vectors, for they proliferate in living organisms, disseminating antigen in several tissues and inducing protective immune response. Therefore, these viruses consist in an interesting approach for the development of recombinant vaccines. Several strategies have been employed for the expression of heterologous genes by the YF 17D vaccine virus. However, viruses bearing an insertion display reduced viral proliferation and immunogenicity. In this work the recombinant YF 17D virus expressing an enhanced green fluorescent reporter protein (EGFP) was used to evaluate the impact of specific mutations that can modulate viral replication. Mutations in the E, NS3 and NS4B proteins of dengue virus serotypes 1 and 2 were described as capable of increasing viral proliferation in cell culture and in mice. The mutations E₄₀₀ (F → L), E₄₀₃ (T → I), NS3₄₃₉ (V → S) and NS4B₅₄ (L → F) were inserted into the recombinant YF/EGFP virus genome, with the purpose of characterizing its effect on viral proliferation and the induction of humoral immune response. The cDNA of the viral genome YF/EGFP was used to generate recombinant viruses carrying one, two or three mutations. The study of viral proliferation was carried out by kinetics of infection in Vero, Huh7 and C6/36 cell lines. The results show that recombinant YF viruses proliferate less than the vaccine virus 17DD. In addition, the infectivity of mutant viruses in mammalian cells is different from infectivity in mosquito cells. Viruses that carry mutations in E₄₀₀/NS3₄₃₉ and E₄₀₀/NS3₄₃₉/NS4B₅₄ have significantly impaired viral proliferation in mammalian cells. Viruses that carry a mutation in E₄₀₀ showed increased viral proliferation compared to the original YF/EGFP virus in mosquito cells. Differences between cell lines may have been caused by the physiological characteristics of the cells during viral infection and by properties of the viral proteins caused by the mutations. It was not possible to recover infectious viral particles carrying the mutation in E₄₀₃. Molecular modeling of viral proteins showed discrete changes in charge, volume of protein surface and physicochemical property induced by mutations. No mutation influenced on intramolecular interactions. Immunogenicity was assessed by immunization of C57BL/6 and BALB/c mice with the viruses carrying single mutations and sera were analyzed by PRNT and ELISA to obtain the titers of YF neutralizing antibody and titer of antibodies directed to GFP, respectively. Sera from the mice immunized with the recombinant viruses have lower titers of neutralizing antibodies compared to the group immunized with the vaccine virus, but there were no changes in the induction of antibodies to GFP. In general, the mutations in E₄₀₀ and E₄₀₃ produced the strongest effects on viral proliferation, and the mutations in NS3₄₃₉ and NS4B₅₄, on the immunogenicity.

Agradecimentos

A conclusão da dissertação de mestrado é mais uma etapa de um longo caminho de capacitação. Em grande parte, essas etapas definem quem eu sou e quem me tornarei. Portanto, as pessoas envolvidas na conclusão de mais esta fase tem participação na construção dos fundamentos da minha vida acadêmica. Não posso deixar de agradecer a quem contribuiu para meu crescimento no desenvolvimento dessa dissertação.

Por ter consciência de que o universo é regido por um poder absoluto, agradeço a Deus por me levar além do que eu poderia ser capaz, apesar das minhas limitações. Por me colocar sempre nos melhores caminhos dentro das minhas próprias escolhas, me guiando por momentos surpreendentes ao longo da vida.

Agradeço profundamente à minha família, começando pelos meus pais que me prepararam, e ainda me preparam, para enfrentar a vida, contornando adversidades, com muita coragem e sempre seguindo em frente. Aos outros, muitos, membros da família que sempre me apoiam com muito carinho, mesmo quando tiveram que se abster da minha presença em diversos momentos.

Agradeço às preciosas amigas da graduação que estão sempre presentes: Victor, Bruno, Juan, Aline, Hugo, Igor, Pedro, que me ajudaram com discussões científicas ou apenas me levaram para passear, em Ilha Grande ou na Ilha do Fundão mesmo, quando eu precisei. Agradeço principalmente à Paolla que me acompanha desde a graduação, mas se tornou essencial na minha vida acadêmica durante a pós-graduação, passando por muitos momentos de nervoso comigo, mas por muitas alegrias também. Obrigada pelo apoio, mesmo quando na maioria das vezes estamos em posição de competir.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Myrna Bonaldo, por ter me aceitado na equipe do Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, e me orientado desde a graduação. Aprendi muito nesses anos, e boa parte da minha capacidade devo aos incentivos e orientações dela.

Agradeço aos amigos do LABMOF, especialmente à Dr^a. Ieda Ribeiro que acompanhou este trabalho desde o início. Me guiou ao longo dos experimentos e da redação de infinitos relatórios, e resumos de congressos, se tornando minha revisora oficial. Com ela, aprendi a organização e a confiança de sempre mostrar o melhor que posso fazer.

À Stephanie Cruz pelas longas discussões científicas que muito acrescentaram, além da ajuda nos experimentos com animais. E aos demais colegas de laboratório, pelo companheirismo, encorajamento e colaboração.

Agradeço aos colaboradores que trouxeram uma nova perspectiva ao trabalho, Dr^a. Ana Carolina Guimarães, pelas orientações em modelagem molecular e Dr. Marcelo Ribeiro Alves, pelo apoio nas análises estatísticas.

Agradeço também aos professores e ao programa da pós-graduação em Biologia Celular e Molecular. A organização do curso e o desempenho dos professores contribuíram para que esses dois anos de estudo decorressem de maneira agradável, possibilitando o aprendizado.

“Um cientista em um laboratório não é um mero técnico: ele também é uma criança que confronta fenômenos naturais que o impressionam como se fossem contos de fada.”
Marie Curie

Índice

1. Introdução	1
1.1 Flavivírus e o vírus da febre amarela: doenças humanas no passado e no presente ...	1
1.2 A vacina da febre amarela: eficácia no controle de epidemias e indução do sistema imunológico	2
1.3 Genética reversa na virologia.....	4
1.4 O vírus vacinal da febre amarela como vetor viral.....	5
1.5 Marcadores de virulência em flavivírus.....	10
1.6 A função das proteínas E, NS3 e NS4B no ciclo replicativo viral	13
1.7 Justificativa.....	17
2. Objetivos	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3. Metodologia	20
3.1 Certificados.....	20
3.2 Construção dos vírus recombinantes mutados.....	20
3.2.1 Mutagênese sítio-dirigida.....	23
3.3 Eletroforese em gel de agarose.....	25
3.4 Titulação por ensaio de placas	25
3.5 Extração de RNA e <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>	27
3.6 Sequenciamento nucleotídico	28
3.7 Cultura de células.....	29
3.8 Infecção viral em células Vero, C6/36 e Huh7 e curvas de proliferação	30
3.9 Microscopia de fluorescência	31
3.10 Experimento com animais	31
3.10.1 Controle dos inóculos preparados para imunização	33
3.11 Titulação de anticorpos neutralizantes por <i>Plaque Reduction Neutralization Test</i>	33
3.12 Titulação de anticorpos para GFP por <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	36
3.13 Modelagem molecular comparativa	40
3.14 Análises estatísticas	41
3.14.1 Curvas de proliferação.....	41
3.14.2 PRNT e ELISA	42
4. Resultados	43
4.1 Obtenção de vírus FA recombinantes mutados.....	43
4.2 Estudos de proliferação viral em cultura de células	44

4.3	Imunogenicidade viral em camundongos.....	51
4.4	Estudo da mutação em E ₄₀₃	55
4.5	Alterações estruturais induzidas pelas mutações nas proteínas do vírus FA	57
5.	<i>Discussão</i>	72
5.1	Considerações finais.....	82
6.	<i>Conclusões</i>	83
7.	<i>Perspectivas</i>	84
	<i>Referências</i>	85
	<i>ANEXO I – Lista de meios e soluções</i>	95
	<i>ANEXO II – Análises estatísticas do estudo de proliferação viral</i>	99
	Figura A1 – Curvas de proliferação ajustadas ao modelo linear misto.....	99
	Tabela A1 – Diferenças significativas entre os vírus FA controles e mutantes nas linhagens celulares e nos tempos pós infecção, determinadas pelo ajuste em modelo linear misto .	100
	Figura A2 – Análise de área sob a curva das curvas de proliferação dos vírus FA controles nas três linhagens celulares.....	105
	Tabela A2 – Comparação da área sob a curva entre os vírus FA controles em cada linhagem celular	106
	<i>ANEXO III – Análise de qualidade das estruturas tridimensionais das proteínas E e NS3</i>	107
	Estrutura molde 5IRE.....	107
	Figura A3 – Gráfico dos valores de ERRAT por resíduo da estrutura molde 5IRE da proteína E.	107
	Figura A4 – Gráfico de Ramachandran da estrutura molde 5IRE da proteína E.	108
	Estrutura da proteína E de referência.....	108
	Figura A5 – Gráfico dos valores de ERRAT por resíduo da estrutura da proteína E de referência.	109
	Figura A6 – Gráfico de Ramachandran da estrutura da proteína E de referência.	109
	Estrutura da proteína E ₄₀₀	109
	Figura A7 – Gráfico dos valores de ERRAT por resíduo da estrutura da proteína E ₄₀₀	110
	Figura A6 – Gráfico de Ramachandran da estrutura da proteína E ₄₀₀	110
	Estrutura da proteína E ₄₀₃	111
	Figura A8 – Gráfico dos valores de ERRAT por resíduo da estrutura da proteína E ₄₀₃	111
	Figura A9 – Gráfico de Ramachandran da estrutura da proteína E ₄₀₃	111
	Figura A10 - Gráficos comparativos do DOPE <i>score</i> da estrutura molde e das estruturas modeladas da proteína E.....	113
	Estrutura molde 1YKS.....	114
	Figura A11 – Gráfico dos valores de ERRAT por resíduo da estrutura molde 1YKS do domínio helicase da proteína NS3.	114

Figura A12 – Gráfico de Ramachandran da estrutura molde 1YKS da proteína NS3_{hel}.	115
Estrutura da proteína NS3 de referência	115
Figura A13 – Gráfico dos valores de ERRAT por resíduo da estrutura do domínio helicase da proteína NS3 de referência.	115
Figura A14 – Gráfico de Ramachandran da estrutura da proteína NS3_{hel} de referência.	116
Estrutura da proteína NS3₄₃₉.....	116
Figura A15 – Gráfico dos valores de ERRAT por resíduo da estrutura do domínio helicase da proteína NS3₄₃₉.	117
Figura A16 – Gráfico de Ramachandran da estrutura do domínio helicase da proteína NS3₄₃₉.	117
Figura A17 - Gráficos comparativos do DOPE <i>score</i> da estrutura molde e das estruturas modeladas da proteína NS3_{hel}.	118
<i>ANEXO IV – Medidas das áreas superficiais acessíveis por resíduo da proteína E</i>	<i>119</i>
Tabela A3 – Medidas de SASA dos aminoácidos da α-hélice H1 das estruturas das proteínas E de referência e E₄₀₀.	119

Índice de Figuras

<i>Figura 1.1 - Organização do genoma e processamento da poliproteína do vírus da FA.</i>	<i>7</i>
<i>Figura 1.2 - Mudanças conformacionais da proteína E que medeiam a fusão das membranas viral e celular.</i>	<i>14</i>
<i>Figura 1.3 - Conformações da proteína E durante a maturação da partícula viral.</i>	<i>16</i>
<i>Figura 3.1 - Fluxograma da obtenção de cDNA infeccioso recombinante.</i>	<i>22</i>
<i>Figura 3.2 - Diluição seriada da suspensão viral.</i>	<i>26</i>
<i>Figura 3.3 - Cronograma de imunização com vírus FA vacinal e recombinantes.</i>	<i>32</i>
<i>Figura 3.4 - Diluição seriada dos soros para PRNT.</i>	<i>35</i>
<i>Figura 3.5 - Cálculo de título de anticorpos neutralizantes.</i>	<i>36</i>
<i>Figura 3.6 - Desenho das placas de ELISA para titulação de anticorpos dirigidos a GFP de soros de camundongos imunizados com vírus vacina FA 17D e recombinantes.</i>	<i>38</i>
<i>Figura 3.7 - Cálculo do título de anticorpos específicos para GFP.</i>	<i>39</i>
<i>Figura 4.1 - Histogramas de proliferação viral ao longo do tempo nas três linhagens celulares.</i>	<i>47</i>
<i>Figura 4.2 - Efeito das mutações na proliferação viral em cada tempo pós infecção nas três linhagens celulares, pelo ajuste dos dados em modelo linear misto.</i>	<i>50</i>
<i>Figura 4.3 - RT-PCR dos vírus 120 h pós infecção em células Huh7.</i>	<i>50</i>
<i>Figura 4.4 - Diferenças de proliferação entre vírus FA controles.</i>	<i>51</i>
<i>Figura 4.5 - Indução de anticorpos neutralizantes para o vírus FA 17DD.</i>	<i>53</i>
<i>Figura 4.6 - Indução de anticorpos específicos à GFP.</i>	<i>54</i>
<i>Figura 4.7 - Estudo do construto mutante II-GFP/E₄₀₃.</i>	<i>57</i>
<i>Figura 4.8 - Predição de estruturas secundárias das proteínas E, NS3 e NS4B.</i>	<i>58</i>
<i>Figura 4.9 - Alinhamento da proteína E de diferentes flavivírus.</i>	<i>60</i>
<i>Figura 4.10 - Localização da mutação em E₄₀₀ e comparação das superfícies moleculares.</i>	<i>63</i>
<i>Figura 4.11 - Área ocupada pelo resíduo 400 na estrutura da proteína E de referência e na estrutura da proteína E mutada em E₄₀₀.</i>	<i>64</i>
<i>Figura 4.12 - Localização da mutação em E₄₀₃ e comparação das superfícies moleculares.</i>	<i>66</i>
<i>Figura 4.13 - Localização da mutação em NS3₄₃₉.</i>	<i>68</i>
<i>Figura 4.14 - Comparação das superfícies moleculares.</i>	<i>69</i>
<i>Figura 4.15 - Localização do resíduo 54 da NS4B do vírus FA.</i>	<i>71</i>

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1.1 - Mutações em E e NS3 no DENVI e seus efeitos</i>	<i>11</i>
<i>Tabela 3.1 - Sequências dos oligonucleotídeos de mutagênese</i>	<i>23</i>
<i>Tabela 3.2 - Oligonucleotídeos iniciadores e condições de ciclagem da PCR</i>	<i>24</i>
<i>Tabela 3.3 - Reações de RT-PCR.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabela 3.4 - Grupos experimentais imunizados com vírus FA vacinal e recombinantes.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabela 4.1 - Moldes de cDNA obtidos e regeneração de partículas virais.</i>	<i>43</i>
<i>Tabela 4.2 - Títulos virais dos estoques de segunda passagem.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabela 4.3 - Resumo das diferenças significativas determinadas pela análise de variância ANOVA e pós-teste de Dunnett.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabela 4.4 – Resumo das diferenças significativas estabelecidas entre as curvas do vírus controle FA II-GFP e dos vírus mutantes pelo modelo linear misto.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 4.5 - Avaliação da qualidade dos modelos tridimensionais das proteínas</i>	<i>60</i>

Lista de siglas e abreviaturas

cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CMC	Carboximetil cellulose
CMV	Citomegalovírus
CPE	Efeito citopático
DENV	Virus da dengue
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's Minimal Essential Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPE	<i>Discrete Optimized Protein Energy</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFP	Proteína verde fluorescente melhorada (do inglês, <i>Enhanced green fluorescent protein</i>)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (do inglês, <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>)
EYE	Programa de eliminação da febre amarela: <i>Eliminate Yellow Fever Epidemics</i>
FA	Febre amarela
FMDV	Vírus da febre aftosa
GFP	Proteína verde fluorescente (do inglês, <i>Green fluorescent protein</i>)
HIV	Virus da imunodeficiência humana
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
JEV	Virus da encefalite japonesa
Kb	Quilobases
LB	Luria-Bertani
MOI	Multiplicidade de infecção (relação virus/células)
NS	Proteínas não estruturais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PFU	Unidades formadoras de placas
PRNT	Teste de neutralização por redução de placas
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
SASA	Área superficial acessível (do inglês, <i>Solvent Accessible Surface Area</i>)
TAE	Tampão acetato tris-EDTA
TBEV	Virus da encefalite transmitido por carrapatos
TGN	Rede trans do Golgi
UPR	Resposta a proteínas mal enoveladas
WNV	Virus do Oeste do Nilo
YFV	Virus da febre amarela
ZIKV	Virus da zika

1. Introdução

1.1 Flavivírus e o vírus da febre amarela: doenças humanas no passado e no presente

O gênero *Flavivirus* pertence à família *Flaviviridae*, assim como os gêneros *Hepacivirus* e *Pestivirus*. Os flavivírus eram agrupados com a família *Togaviridae* até o início da década de 80, quando foram descobertas diferenças na estrutura, na sequência genômica e na estratégia de replicação. Desde então diversos estudos foram realizados identificando estrutura, genoma e biologia dos flavivírus (1).

Os flavivírus são interessantes objetos de estudo por serem vírus que circulam em diferentes hospedeiros, na sua maioria, primatas não humanos, humanos, aves e insetos. Portanto, precisam ter características biológicas de adaptação aos organismos pelos quais circulam. A variedade de vetores também favorece a introdução desses vírus em novos ambientes. A distribuição geográfica dos flavivírus mostra que existem áreas endêmicas de flavivírus distribuídas no mundo inteiro (2).

Diversos flavivírus são considerados patógenos humanos, causando doenças brandas a graves através do tempo. Alguns dos vírus de importância clínica que pertencem ao gênero são: vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus do Oeste do Nilo (WNV), vírus da encefalite transmitido por carrapatos (TBEV), o vírus da Zika (ZIKV), o vírus da Dengue (DENV) e o vírus da Febre Amarela (YFV) (3).

Na classificação dos flavivírus, existem dois grupos principais: os vírus transmitidos por mosquitos e os vírus transmitidos por carrapatos. Estudos avaliam que a origem dos flavivírus data de aproximadamente 100.000 anos atrás, e que os vírus se separaram nestes dois grupos há 40.000 anos. Os flavivírus transmitidos por carrapatos pertencem a um mesmo grupo monofilético, enquanto os vírus transmitidos por mosquito apresentam maior diversidade (4).

Os flavivírus que são transmitidos por mosquitos podem ser também classificados pelos principais mosquitos vetores da forma urbana das doenças que esses vírus causam, os mosquitos dos gêneros *Culex* e *Aedes*. A transmissão por *Culex* spp. está geralmente associada a vírus neurotrópicos e a transmissão por *Aedes* spp. está mais relacionada com vírus que causam doença viscerotrópica ou hemorrágica (2).

A febre amarela (FA) é uma doença causada pelo vírus da FA transmitida para humanos pelo mosquito *Aedes aegypti*, na forma urbana da doença (5). A FA causou um número extenso de mortes no século XVII, com as principais manifestações clínicas de febre e icterícia. O Brasil foi atingido pela primeira vez no final do século XVII por uma epidemia devastadora no nordeste

do país. No século XVIII não houve registros de epidemias de FA, mas no século seguinte, a doença ressurgiu sob forma epidêmica e endêmica (6).

A infecção pelo vírus da FA pode se manifestar de forma assintomática, leve ou moderada, grave e maligna (7). No caso da forma maligna, o desenvolvimento da doença ocorre em três fases: a fase de infecção, a fase de remissão e a fase de intoxicação. Na primeira fase, a doença se manifesta em sintomas similares aos da gripe, com dores musculares, febre e mal-estar. A fase de remissão é inexistente em alguns casos, mas quando ocorre é caracterizada por um período curto de 2 a 24 horas onde os sintomas parecem desaparecer. Após essa fase, o período de intoxicação evolui para falência hepática e renal, icterícia, náusea e vômito negro, e outras manifestações hemorrágicas. Pacientes terminais ainda podem apresentar sinais de comprometimento neurológico, incluindo alucinações, convulsões e coma. Os sintomas neurológicos são provavelmente ocasionados pela resposta inflamatória generalizada e vazamento vascular no cérebro (8).

A circulação da FA, a partir do início do século XX, passou a ficar em evidência nos estados de Goiás e do Pará (9). Em 2008 e 2009 a propagação do vírus atingiu outros estados da região central do Brasil, da região sudeste e até o estado do Rio Grande do Sul. No estado de São Paulo foram reportados 28 casos, com 11 mortes em 2009 em áreas onde não era recomendada a vacinação, distantes de apenas 100 km da cidade de São Paulo com população próxima a 20 milhões de pessoas, sendo a maioria não vacinada. Um estudo molecular mostrou uma nova linhagem do vírus circulante neste período, a linhagem moderna 1E (10).

Em 2017, o Brasil viveu maior surto de FA nos últimos 70 anos, com a maioria dos casos relatados no estado de Minas Gerais e Espírito Santo, e alguns casos no estado do Rio de Janeiro, afetando assim, o sudeste do país da maneira mais intensa desde o surgimento da vacinação. Outros estudos moleculares identificaram que o vírus circulante se agrupa com a linhagem descrita em 2008, a linhagem moderna 1E, porém apresenta alterações únicas em proteínas virais (11, 12), sugerindo que a assinatura molecular identificada também seja um dos fatores de disseminação viral pelo país (13).

1.2 A vacina da febre amarela: eficácia no controle de epidemias e indução do sistema imunológico

A febre amarela é uma doença para a qual não existe tratamento eficiente com antivirais e, após o estabelecimento da doença, podem ser aplicadas apenas terapias para amenização dos sintomas. Atualmente, a principal medida de controle da doença é a prevenção pela vacinação

com o vírus FA atenuado (14). A vacinação foi extensamente utilizada para controlar surtos em regiões endêmicas e, mediante as epidemias recorrentes na América do Sul e na África, a Organização Mundial da Saúde estabeleceu um programa de vacinação para eliminar as epidemias de FA, EYE (do inglês, *Eliminate Yellow fever Epidemics*) (15).

A vacina da febre amarela foi desenvolvida a partir da cepa Asibi atenuada por pesquisadores da Fundação Rockefeller, Nova Iorque, em 1937 (16). O processo de atenuação foi iniciado por diversas passagens do vírus selvagem em embriões de camundongos. A partir do 18º subcultivo, o vírus passou a ser cultivado em embriões de galinha. Após 58 passagens em embriões de galinha e 128 passagens em embriões de galinha sem tecido nervoso, o vírus atenuado, denominado então 17D, foi propagado em embriões de galinha para a produção da vacina (17).

A linhagem 17D foi identificada na 176ª passagem em tecido de embrião de galinha e sua atenuação viral é caracterizada pela perda de viscerotropismo e neurotropismo. As vacinas utilizadas atualmente são as subcepas 17D-204, fabricada principalmente na França, a 17D-213 produzida na Rússia, e a 17DD, fabricada no Brasil (18). As subcepas diferem minimamente na sequência genômica, mas não na capacidade de indução de resposta imune protetora. Em relação à cepa Asibi, a cepa 17D difere de 20 aminoácidos e 4 nucleotídeos na região não codificante (17).

A vacina da FA é muito segura, tem uma alta taxa de soroconversão e uma frequência baixa de efeitos adversos (19). A imunização com o vírus FA 17D produz uma infecção viral aguda com baixa viremia, e pico entre o primeiro e o sétimo dia pós vacinação (20). O mecanismo pelo qual a vacina induz proteção é através do *clearance* viral pela imunidade inata e adaptativa após a vacinação com o vírus FA 17D (21). A proteção é devida principalmente à ativação de células T CD4⁺ e produção de anticorpos neutralizantes (22), além da expansão de células T CD8⁺, indução de perfil de resposta balanceada T_{H1} e T_{H2} (23, 24). O estímulo da resposta imune por células T CD8⁺ depende da carga viral inicial administrada aos indivíduos imunizados (25).

A resposta humoral específica ocorre simultaneamente ao pico de viremia, com produção de IgM que persiste até 18 meses após a vacinação. A classe de anticorpos IgG é produzida tardiamente, com o pico de anticorpos 4 a 6 semanas pós vacinação, e perduram por muito tempo (19). De fato, os anticorpos neutralizantes podem persistir por 40 anos após uma única dose da vacina (18, 26, 27).

A vacina é a principal ferramenta no controle de surtos de FA. Entretanto, mesmo com a disponibilidade e a facilidade de produção da vacina, ainda ocorrem surtos com casos de morte por FA em diferentes países endêmicos com recomendação de vacinação já instalada. Esses casos são devidos a viajantes não vacinados e às restrições de administração da vacina, como a faixa

etária, ou indivíduos imunocomprometidos, que mais provavelmente apresentariam doença decorrente de efeitos adversos pós vacinação (28-30).

1.3 Genética reversa na virologia

As inovações metodológicas em engenharia genética permitiram novas abordagens para o estudo da genética molecular. A partir do desenvolvimento do sequenciamento de Sanger e da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi possível estabelecer estudos de correlação entre um determinado fenótipo e uma alteração genética. Esses estudos podem iniciar em duas perspectivas: do fenótipo ao gene ou do gene ao fenótipo (31).

Quando se pretende determinar ou isolar um gene modificado que reflete um fenótipo observado, a abordagem é denominada *forward genetics*. Nesta situação, o fenótipo observado pode ocorrer naturalmente ou ser induzido por agentes mutagênicos e então os genes que podem estar envolvidos com o fenótipo são investigados. Por outro lado, quando se pretende direcionar o estudo para um determinado gene e os efeitos de alterações específicas, o gene é manipulado e expresso para observação do fenótipo resultante. Essa abordagem foi denominada *reverse genetics* ou genética reversa (31, 32).

A aplicação da genética reversa desempenhou um papel importante na biotecnologia e no estudo de genes. A partir desta tecnologia, foi possível nocautear genes e introduzir mutações gerando organismos geneticamente modificados. Como por exemplo, animais imunodeficientes, com genes da imunidade inata nocauteados, ou plantas menos susceptíveis a parasitas, com a introdução de genes de resistência (31).

Na virologia, a genética reversa se tornou uma ferramenta amplamente utilizada para a engenharia molecular de genomas virais. Antes do surgimento da genética reversa, a abordagem para o desenvolvimento de vacinas era apenas a *forward genetics*, onde os vírus eram atenuados por diversas passagens em organismos vivos ou cultura de células, ou eram inativados. As alterações genômicas induzidas pelas passagens em diferentes hospedeiros, tecidos ou células de linhagem não podem ser controladas. Portanto, a genética reversa fornece direcionamento e restrição das alterações genômicas, com potencial de aumentar a eficiência da atenuação viral. Além disso, a genética reversa permitiu estudos para descoberta de marcadores de patogênese e proliferação viral (33).

A tecnologia da genética reversa aplicada a vírus com genoma de RNA consiste na obtenção do DNA complementar (cDNA) do genoma viral. O cDNA contendo o genoma viral completo pode ser clonado em plasmídeo bacteriano possibilitando a introdução de mutações no

genoma viral e a observação do fenótipo resultante. A regeneração de partículas virais a partir do cDNA pode ocorrer pela transfecção ou eletroporação em células eucarióticas do cDNA sob controle de um promotor de transcrição viral, como o do citomegalovírus (CMV). Nesse caso, a transcrição e posterior tradução do genoma viral depende unicamente da maquinaria celular. A eficiência da recuperação de vírus em cultura de células pode ser aumentada pela transfecção do RNA genômico viral transcrito previamente *in vitro* por reagentes comerciais, utilizando um promotor de transcrição de bacteriófagos como T7 ou SP6 (33, 34).

A recuperação de partículas virais a partir de um clone de cDNA contendo o genoma viral é denominada metodologia do clone infeccioso. O primeiro clone infeccioso foi desenvolvido em 1981 por Racaniello e Baltimore para gerar o poliovírus (35). Desde então, essa metodologia tem sido empregada para a obtenção de clones infecciosos das principais famílias de vírus (33).

O primeiro clone infeccioso do gênero *flavivirus* foi desenvolvido para o vírus vacinal da febre amarela (FA) 17D por Rice *et al.* em 1989 (36). Em contraste com a metodologia empregada para o poliovírus, a clonagem do genoma completo do vírus FA se mostrou instável em bactérias *Escherichia coli*. A solução encontrada para contornar esse obstáculo foi a distribuição do genoma viral em dois plasmídeos para a clonagem e *E. coli*. Após extração do DNA plasmidial de clones carregando um ou o outro construto, os dois plasmídeos foram tratados com enzimas de restrição e fusionados, regenerando a integridade do cDNA do genoma viral (36).

A partir desse momento, diversos clones infecciosos foram desenvolvidos para outros flavivírus, como para o vírus da encefalite japonesa (37), o vírus da dengue (38-42), o Kunjin vírus (43), o Murray Valley vírus (44), o vírus do Oeste do Nilo (45), o vírus da encefalite transmitida por carrapatos (46), além do clone infeccioso para o vírus da Zika (47-51).

Esses construtos permitiram estudos de relevância de componentes genômicos em diferentes aspectos da infecção viral e na especificidade do hospedeiro (52-54). Ainda, considerando a baixa variabilidade genética dos vírus obtidos por clones infecciosos, o efeito de mutações pontuais, deleções ou inserções, na replicação viral ou nas características de virulência foi estudado com maior precisão (55-61). Também foram desenvolvidos clones infecciosos carregando genes repórteres para detecção de partículas virais *in vitro* e *in vivo* (62, 63).

1.4 O vírus vacinal da febre amarela como vetor viral

A metodologia do clone infeccioso foi aplicada para engenharia de vírus vacinais atenuados, no sentido de torná-los potentes vetores de expressão de proteínas heterólogas *in vivo*.

Alguns vírus atenuados são considerados bons vetores virais, como o adenovírus (64), o vírus vaccínia (65) ou o vírus da estomatite vesicular (66). O que os torna potenciais vetores em modelos animais é a sua capacidade de proliferação no organismo hospedeiro e consequente disseminação dos antígenos virais e heterólogos, estimulando resposta imune polivalente (67).

A vacina da FA é considerada uma das mais seguras e eficazes na atualidade. Apesar de ter sido desenvolvida há 80 anos, a vacina é a principal medida de controle contra a febre amarela, como dito anteriormente. A vacina da FA 17D promove proteção de longa duração com administração em única dose, estimulando a resposta imune inata e adaptativa, com produção de anticorpos neutralizantes e de células T de memória central e efetora (19, 27).

A segurança e imunogenicidade oferecidas pelo vírus vacinal FA 17D, tornou-o um potencial vetor viral para desenvolvimento de protótipos vacinais. Nesse sentido, a metodologia do clone infeccioso do vírus FA 17D foi amplamente aplicada à produção de vírus quiméricos e recombinantes no intuito de pesquisar novas vacinas humanas (67). Diferentes abordagens foram desenvolvidas para inserção de epítomos ou proteínas inteiras no genoma do vírus vacinal FA 17D. A organização do genoma viral do vírus FA 17D foi avaliada para as diferentes estratégias de expressão. Todas as abordagens foram planejadas para induzir menor perturbação possível no ciclo replicativo viral, acomodando as inserções em regiões estratégicas do genoma do vírus FA 17D (67).

O genoma viral é constituído por uma fita simples de RNA de polaridade positiva e possui um único quadro aberto de leitura. A tradução do RNA genômico gera uma poliproteína viral que é processada co- e pós-traducionalmente pela protease viral ou pelas proteases celulares, liberando as proteínas virais que desempenharão sua função no ciclo replicativo viral (68). A figura 1.1 representa a organização do genoma viral do vírus FA e as principais regiões escolhidas para introdução de genes heterólogos.

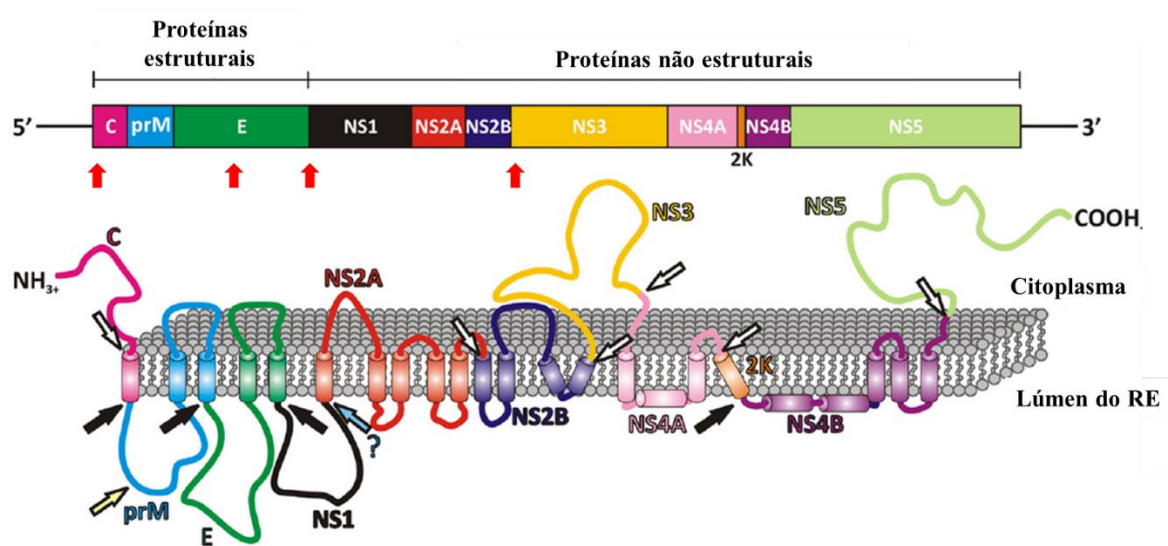


Figura 1.1 - Organização do genoma e processamento da poliproteína do vírus da FA.

Na parte superior da figura, está representada a organização do genoma do vírus FA. As setas vermelhas indicam as principais regiões selecionadas para inserção de genes heterólogos. Na parte inferior, está representada a topologia da poliproteína viral na membrana do retículo endoplasmático antes do processamento. As setas pretas indicam os sítios de clivagem pela *signal peptidase* celular; as setas sem preenchimento mostram os sítios de clivagem pela protease viral NS2B/NS3; a seta com preenchimento amarelo indica o sítio de clivagem pela furina celular. Adaptada de Assenberg *et al.* **Journal of Virology**, 2009 (68).

Primeiramente, o vírus FA 17D foi utilizado para construção de vírus quiméricos, onde as proteínas estruturais prM/M e E foram substituídas pelas proteínas estruturais de outros flavivírus. Especificamente, o vírus da encefalite japonesa (JEV) (69, 70), o vírus do Oeste do Nilo (WNV) (71, 72) e os quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV) (73, 74). Essa abordagem é possível por conta da similaridade entre essas proteínas virais dos flavivírus e de seu papel na proliferação viral dos vírus deste gênero. Apesar da estabilidade dos vírus quiméricos, algumas mutações foram detectadas nas proteínas estruturais, decorrentes da adaptação destas proteínas à proteína do capsídeo do vírus FA 17D durante a montagem viral (75). Outras mutações também foram mapeadas nos genes codificantes para as proteínas não estruturais, representando adaptação dos vírus à proliferação em cultura de células (75). Estes construtos quiméricos tiveram êxitos diferentes em relação ao desenvolvimento de vacinas seguras e eficazes.

O vírus quimérico FA17D-JEV contém a substituição dos genes codificantes para as proteínas estruturais prM e E do vírus atenuado JE SA14-14-2, e os demais genes correspondem ao genoma do vírus FA 17D. Os ensaios clínicos mostraram que esse vírus quimérico é seguro e imunogênico induzindo imunidade de longa duração contra cepas selvagens do JEV (76-80). A partir desses dados, esse vírus constituiu a vacina Imojev produzida pela Sanofi-Pasteur que foi lançada em 2012 na Austrália.

O vírus quimérico FA17D-WNV também foi promissor e chegou a fase clínica de testes. Este vírus foi testado em humanos e se mostrou imunogênico nos grupos de diferentes faixas etárias (81). Entretanto, a vacina equina baseada nesta tecnologia induziu efeitos adversos, incluindo letalidade de cavalos vacinados e foi suspensa em 2010 (82).

Vírus quiméricos FA 17D-DENV, com as proteínas prM e E dos quatro sorotipos do vírus da dengue foram obtidos e testados quanto à imunogenicidade em humanos e capacidade de infectar mosquitos vetores (83). Esses vírus foram geneticamente e fenotipicamente estáveis, mais atenuados em comparação ao vírus FA 17D e incapazes de infectar mosquitos. Os resultados da fase II dos testes clínicos mostraram que a proteção contra o sorotipo 2 do DENV foi baixa. Após a fase III, a vacina Dengvaxia foi aprovada e lançada no Brasil em dezembro de 2015. Entretanto, no final do ano de 2017, o acompanhamento de longo prazo de pessoas vacinadas mostrou diferenças de desempenho da vacina em pessoas que eram soronegativas no momento da vacinação, e que foram posteriormente infectadas naturalmente pelo vírus da dengue, com risco de exacerbação da doença. Portanto, a vacina passou a ser recomendada somente para pessoas que já foram expostas alguma vez a qualquer sorotipo do vírus da dengue (81, 84-89).

Quando se trata de utilizar o vírus FA 17D para expressão de epítopos heterólogos de outras origens que não flavivírus, diversas estratégias de expressão foram desenvolvidas. Inicialmente, as regiões da poliproteína que são alvos de clivagem pelas proteases viral e celular foram consideradas ideais para inserções heterólogas. Essa estratégia parte do princípio que o gene heterólogo será flanqueado pelos sítios de clivagem entre as proteínas NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A e NS4A-NS4B. A expressão de epítopos pequenos na junção NS2B-NS3 não interferiu majoritariamente na proliferação viral, enquanto que a expressão nas demais junções impediu recuperação de partículas virais viáveis (90). Esta estratégia de expressão foi empregada para um epítipo de células T CD8⁺ de *Plasmodium yoelii*, e o vírus foi viável com capacidade replicativa comparável ao vírus FA 17D original. Além disso, a imunização de camundongos com esse vírus recombinante induziu proteção contra o parasita (91). Em contraste com estes resultados, o vírus FA 17D recombinante, carreando um epítipo de células T CD8⁺ da proteína de superfície ASP-2 de *Trypanosoma cruzi* na região intergênica NS2B-NS3 não induziu a proteção em desafio de camundongos imunizados (92).

Outra abordagem para a aplicação do vírus FA 17D como vetor viral foi a expressão de epítopos na superfície viral. Esta estratégia se baseia na propriedade da proteína de envelope (E) de induzir resposta imune humoral. Dessa forma, a resposta imune contra a inserção poderia induzir a produção de anticorpos além da resposta celular. Para isso, um estudo estrutural foi conduzido para identificar a região que melhor acomodaria uma inserção na proteína E (93, 94). A partir desse estudo, foram construídos alguns vírus recombinantes expressando epítopos

relacionados à resposta humoral e à resposta celular de *Plasmodium spp.* Esses vírus foram estáveis e induziram anticorpos para *Plasmodium falciparum* em camundongos e primatas não humanos (94). Apesar da indução de resposta imune, os vírus recombinantes apresentaram atenuação e redução de proliferação viral (95).

A inserção de fragmentos maiores, como proteínas inteiras, permite a expressão de um painel de antígenos que aumenta a probabilidade de indução de resposta imune polivalente. Algumas estratégias foram exploradas para inserção de genes codificantes para proteínas inteiras. Uma das alternativas é a inserção no gene do capsídeo do vírus FA 17D. Esta estratégia se baseia na presença de estruturas secundárias de RNA presentes no gene do capsídeo (C) que é necessária para a replicação viral (96). A inserção é flanqueada pelos 75 primeiros nucleotídeos do gene C e pelas sequências da ubiquitina de mamíferos e do peptídeo 2A do vírus da febre aftosa (FMDV) para garantir a clivagem do genoma do vírus FA (97). Um fragmento da proteína de *Plasmodium yoelii* e da proteína p24 do HIV foram expressas no vírus FA 17D no gene do capsídeo (97, 98). Estudos de imunogenicidade em camundongos imunizados com os vírus recombinantes mostraram que ambos os vírus foram capazes de induzir resposta imune humoral e celular contra os agentes patogênicos em questão. Por outro lado, os vírus recombinantes não foram estáveis após passagens seriadas em cultura de células (97, 98).

A estratégia que apresentou maior estabilidade e possibilitou a expressão de inserções com até 2,0 kb de comprimento, foi a expressão na região intergênica entre E e NS1. Essa região representa a mudança dos genes codificantes das proteínas estruturais, para as não estruturais e pode acomodar fragmentos maiores com perturbações mínimas no ciclo replicativo. Os cassetes de expressão, nesse caso, devem ser flanqueados pela sequência codificante para o motivo de clivagem pela *signal peptidase* entre as proteínas E e NS1. Fragmentos dos genes *gag*, *vif* e *nef* do vírus da imunodeficiência símia, o gene codificante para a proteína ASP-2 de *T. cruzi*, a proteína p24 de HIV e proteínas do vírus Lassa foram expressas pelo vetor FA 17D, na região intergênica entre E e NS1. Em todos os casos, com algumas alterações de regime vacinal, os vírus recombinantes induzem resposta imune celular específica ao antígeno expresso em modelo animal. Entretanto, a resposta imune humoral e proliferação viral *in vitro* é reduzida (98-103).

Os antígenos expressos na região E/NS1 do vírus FA 17D permanecem associados ao retículo endoplasmático (RE) da célula hospedeira. Essa retenção é devida à presença de domínios transmembrana da proteína E que foram duplicados para flanquear o cassete de expressão, e que ancoram a proteína heteróloga na membrana celular (104). Além disso, a presença majoritária do antígeno no RE pode induzir preferencialmente a resposta imune celular.

O vírus recombinante expressando o gene repórter EGFP (do inglês, *enhanced green fluorescent protein*) na região intergênica E/NS1 foi obtido (105) e utilizado para estudos de

aprimoramento do vetor FA 17D para expressão de genes heterólogos. Alterações na região do genoma viral onde é clonado o cassete de expressão foram capazes de promover a secreção da proteína EGFP no meio extracelular. A combinação dessas duas plataformas virais de expressão, com retenção e com a secreção do antígeno heterólogo, podem induzir imunogenicidade balanceada entre resposta celular e humoral (106).

Entretanto, até o presente momento, não foram desenvolvidas soluções para contornar a menor proliferação viral e imunogenicidade dos vírus recombinantes FA 17D encontrada em modelos celulares e animais quando comparada ao vírus FA original. Uma das soluções para a alteração dessas características dos vírus FA 17D recombinantes é a inserção de mutações específicas no genoma do vírus FA 17D que modulem a proliferação viral e incrementem a imunogenicidade em modelo animal.

1.5 Marcadores de virulência em flavivírus

O vírus da febre amarela é o vírus protótipo do gênero *Flavivirus* (família *Flaviviridae*). Como protótipo do gênero, o vírus da FA é o modelo utilizado para elucidar a organização genômica e a estratégia de replicação dos flavivírus, assim como para estudos sobre a base molecular das estruturas, funções antigênicas e virulência. Os flavivírus compartilham características na morfologia do vírion, organização genômica e estratégias de replicação, porém apresentam propriedades biológicas distintas. No entanto, algumas características de virulência e patogenicidade podem ser compartilhadas entre os flavivírus (3).

Estudos no vírus da dengue, sorotipos 1 e 2 (DENV 1 e DENV2), identificaram alguns marcadores de neurovirulência que aumentaram a proliferação viral em cultura de células e em tecido de camundongos (107, 108).

Com o objetivo de identificar marcadores moleculares de neurovirulência do DENV1, a cepa FGA/89 foi adaptada ao sistema nervoso central de camundongos suíços. Duas cepas neuroadaptadas foram derivadas desse estudo, e apresentaram substituições de aminoácidos nas proteínas E e NS3, em comparação à cepa original FGA/89 (109-111). A cepa neuroadaptada FGA/NA d1d carrega as mutações localizadas nos resíduos 405 (T → I) da proteína E, e no resíduo 435 (L → S) da proteína NS3. Na cepa FGA/NA P6 foram identificadas as mutações no resíduo 402 (F → L) da proteína E, e nos resíduos 209 (V → I) e 480 (L → S) da proteína NS3 (107).

O papel dessas mutações na neuropatogênese foi investigado utilizando um clone infeccioso da cepa do DENV1 não virulenta BR/90, pBACDV1, onde foram inseridas mutações individualmente ou em combinação (107). Os vírus recuperados foram caracterizados quanto à

letalidade em camundongos suíços neonatos, quanto à proliferação em tecido cerebral desses animais e quanto à proliferação em células Huh7.5 e C6/36. Finalmente, os níveis da expressão de genes da imunidade estimulada pela infecção dos diferentes vírus mutantes no tecido cerebral dos camundongos foram medidos. A tabela 1.1 resume os principais resultados coletados nesse estudo. De maneira geral, os vírus com duas ou três mutações apresentaram maior efeito nas características testadas, exceto pelo duplo mutante pBAC-E₄₀₂/NS₃₂₀₉ (107).

Tabela 1.1 - Mutações em E e NS3 no DENV1 e seus efeitos

DENV1 mutantes	Letalidade em camundongos / sinais da doença	Proliferação viral em tecido cerebral	Proliferação viral em cultura de células	Expressão de genes da imunidade
pBAC-E ₄₀₂	0 % / sem sinais	-	-	NA
pBAC-E ₄₀₅	0 % / brandos	-	-	NA
pBAC-NS ₃₂₀₉	0 % / brandos	-	-	NA
pBAC-NS ₃₄₃₅	29 % / severos	-	-	-
pBAC-NS ₃₄₈₀	61 % / severos	-	-	-
pBAC-E ₄₀₅ /NS ₃₄₃₅	73 % / severos	↑	↑	↑
pBAC-E ₄₀₂ /NS ₃₂₀₉	0 % / sem sinais	-	-	NA
pBAC-E ₄₀₂ /NS ₃₄₈₀	100 % / severos	↑	↑	↑
pBAC-E ₄₀₂ / NS ₃₂₀₉ /NS ₃₄₈₀	100 % / severos	↑	↑	↑

*Tabela baseada nos dados do trabalho de Borba *et al.* **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2012 (107).

**Os sinais “-” indicam que não houveram alterações significativas.

*** “NA” indica que esses vírus não foram testados.

A partir desses resultados, pode-se concluir que os marcadores E₄₀₂, E₄₀₅, NS₃₄₃₅ e NS₃₄₈₀ de virulência apresentam mais efeito quando combinados. A mutação NS₃₂₀₉ não aparenta ter maiores efeitos sobre a letalidade ou proliferação viral, mesmo em combinação com a mutação E₄₀₂, sugerindo que a mutação em 480 é o principal fator de virulência associado à proteína NS3 no triplo mutante E₄₀₂/NS₃₂₀₉/NS₃₄₈₀ (107).

Outro estudo de virulência e patogenicidade do DENV2 identificou uma cepa não adaptada a camundongos D2Y98P que infecta camundongos depletados dos receptores de interferon AG129, com alta taxa de letalidade e comprometimento de órgãos viscerais (112). Os determinantes de virulência da cepa D2Y98P em camundongos foram investigados em um estudo posterior (108). Nesse estudo, os autores compararam a sequência da cepa não virulenta

D2MY00-22563 com a sequência da cepa D2Y98P e identificaram apenas 7 diferenças de aminoácidos na poliproteína viral. Essas diferenças foram investigadas por uma abordagem de mutagênese sítio-dirigida para estabelecer a correlação entre as substituições de aminoácidos e o fenótipo virulento da cepa D2Y98P (108).

O clone infeccioso com o genoma do vírus D2Y98P foi obtido e utilizado para as mutagêneses sítio-dirigidas. Os resíduos foram mutados para o aminoácido encontrado na mesma posição no genoma da cepa não virulenta D2MY00-22563. Os mutantes foram inicialmente testados quanto à apresentação de sinais de doença e mortalidade. Apenas os camundongos que foram inoculados com o vírus carregando a mutação F → L na posição 52 da proteína NS4B apresentaram 100 % de sobrevivência durante o tempo do estudo, e nenhum dos camundongos apresentou sinais de doença (108). A carga viral no sangue e em alguns órgãos foi comparada entre os camundongos infectados com as cepas D2Y98P, D2MY00-22563 e com o vírus D2Y98P mutante em NS4B₅₂. Os resultados mostram que o vírus mutante possui as mesmas características de virulência que o vírus D2MY00-22563, indicando que a substituição NS4B₅₂ (F → L) rescinde completamente a virulência do vírus D2Y98P (108).

A proliferação viral em células Vero, BHK-21 e C6/36 do mutante NS4B₅₂ foi avaliada. A proliferação em células de mamífero (Vero e BHK-21) foi reduzida em comparação ao vírus original D2Y98P, enquanto que em células de mosquito a proliferação viral não apresentou diferenças significativas (108).

Para confirmar o efeito do resíduo de fenilalanina da posição NS4B₅₂ na virulência do DENV2, a mutagênese sítio-dirigida do resíduo de leucina nesta posição foi realizada na cepa não virulenta TSV01, empregando a metodologia do clone infeccioso. O vírus TSV01 carregando a mutação em NS4B₅₂ (L → F) apresentou aumento de proliferação viral em células de mamífero (Vero, BHK-21 e A549) e não alterou significativamente a proliferação em células C6/36. Além disso, o monitoramento da replicação viral em cultura de células demonstrou que a presença do aminoácido fenilalanina na posição NS4B₅₂ induz a maior síntese de RNA em células de mamífero (108).

Considerando a necessidade de aprimoramento do vírus FA 17D como vetor de expressão em modelo animal, mutações que modulam a replicação em cultura de células e em camundongos são interessantes, desde que não estabeleçam um fenótipo virulento ao vírus atenuado. As mutações descritas nas proteínas E, NS3 e NS4B nos genomas de DENV1 e DENV2 podem ser potenciais intensificadores de proliferação viral de vírus FA 17D recombinantes. As diferenças biológicas entre os DENV e o vírus FA podem diminuir as chances dessas mutações provocarem um fenótipo virulento no vírus atenuado FA 17D.

1.6 A função das proteínas E, NS3 e NS4B no ciclo replicativo viral

As proteínas nas quais foram identificadas mutações capazes de modular a proliferação viral *in vitro* e *in vivo* em DENV desempenham funções essenciais para o ciclo replicativo viral (3, 113).

O ciclo replicativo inicia na interação da proteína E com a membrana plasmática da célula hospedeira que induz a internalização do vírion. Essa primeira etapa envolve a ligação entre um receptor de superfície da célula hospedeira com um ligante da proteína E. Os sítios de ligação que estão presentes no domínio III do ectodomínio da proteína se ligam aos receptores celulares (114). Quando há reconhecimento da superfície celular, a ligação entre a proteína E e a membrana celular se fortalece pela quantidade de interações receptores-ligantes. A adsorção da partícula viral sinaliza a endocitose da mesma através da invaginação da membrana celular, mediada pela reorganização das clatrin intracelulares (115).

A partícula viral infectiva é envelopada por homodímeros da proteína E, dispostos sobre a membrana lipídica viral. Após a internalização da partícula viral, o pH da vesícula endossomal diminui ao longo do transporte intracelular. O pH baixo induz a protonação de alguns resíduos de histidinas específicos, levando à dissociação dos dímeros e expondo o peptídeo de fusão (58).

Os monômeros sofrem um rearranjo, onde há rotação do domínio III que se liga à lateral do domínio I, facilitando a proximidade de três monômeros de maneira que os três peptídeos de fusão interajam com a membrana endossomal na mesma região (116). A trimerização é mediada pela interação entre as α -hélices da região de haste com o sulco formado pelos os domínios II adjacentes. O N-terminal da α -hélice H1 inicia essas interações que produzem uma dinâmica de *zippering* (117). Este mecanismo foi analisado por estudos de mutações para determinar os resíduos de contato da α -hélice H1 com o domínio II da proteína E que medeiam a trimerização (117). A figura 1.2A mostra os sítios da proteína E que formam o *pocket* hidrofóbico formado pela junção de domínios II na conformação trimérica fusogênica, onde se inicia a interação com a α -hélice H1, desencadeando o *zippering*.

O término do *zippering* resulta no alinhamento do domínio haste-âncora com o peptídeo de fusão, aproximando a membrana viral à do hospedeiro e desencadeando a sua fusão (116, 117). A figura 1.2B resume as mudanças conformacionais da proteína E durante a etapa da infecção da célula hospedeira, desde a internalização da partícula viral até a fusão das membranas lipídicas celular e viral.

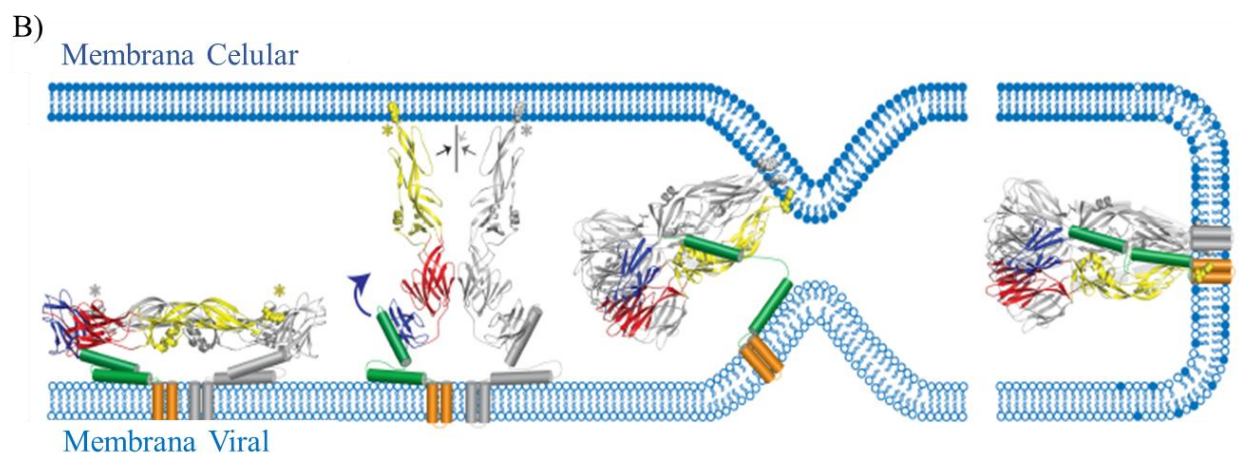
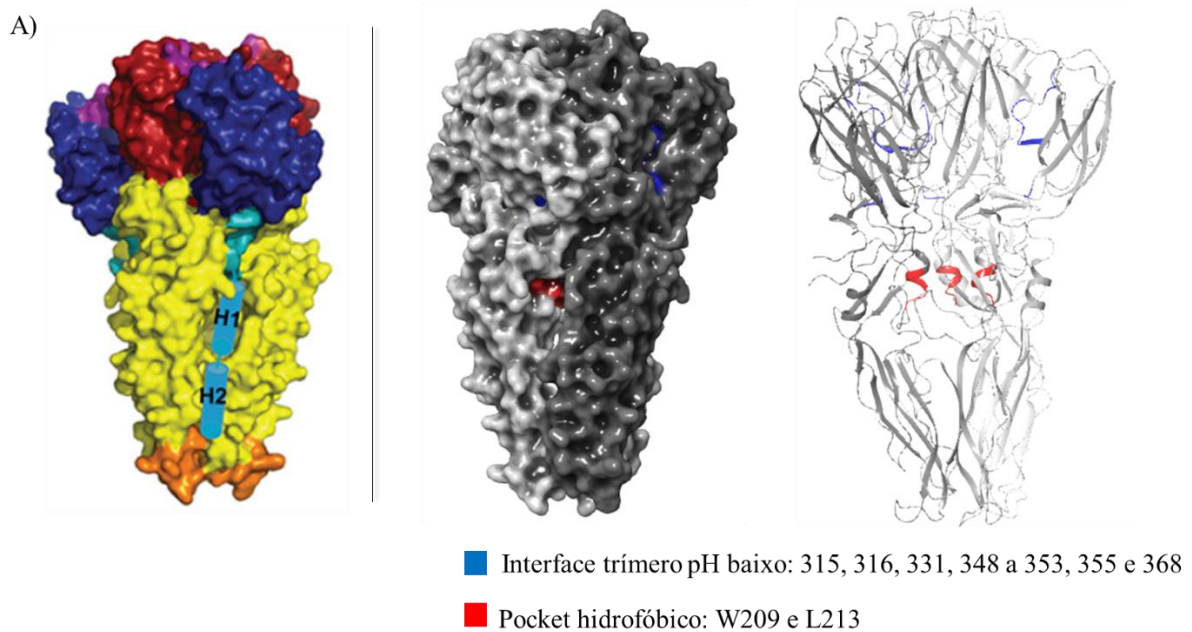


Figura 1.2 - Mudanças conformacionais da proteína E que medeiam a fusão das membranas viral e celular.

A) A esquerda, encontra-se o esquema da interação das hélices da haste, H1 e H2, na estrutura tridimensional do trímtero de proteína E no estado conformacional fusogênico. O ectodomínio da proteína E está representado em cores: vermelho para o domínio I, amarela para o domínio II e azul para o domínio III (Adaptado de Pangerl *et al.* **Journal of Virology**, 2011(117)). A direita, está representada a proteína E do vírus FA no estado fusogênico e a superfície molecular com os resíduos essenciais para a interação entre ectodóminios (em azul) e os resíduos que formam o *pocket* hidrofóbico (em vermelho). B) Da esquerda para a direita: homodímero de proteína E na partícula viral infectiva; dissociação dos dímeros induzida por pH baixo e interação do peptídeo de fusão com a membrana celular; início da trimerização mediada pela α -hélice H1; conformação trimérica final e fusão das membranas. Os domínios da proteína estão coloridos em laranja (hélices transmembrana), verde (hélices da haste), azul (domínio III), amarelo (domínio II) e vermelho (domínio I). Adaptada de: Klein *et al.* **Journal of Virology**, 2013 (116).

A fusão entre as membranas permite a penetração do nucleocapsídeo no citoplasma do hospedeiro. Após a entrada do nucleocapsídeo, ele é degradado e ocorre a tradução imediata do

genoma viral. Essa tradução utiliza fatores de iniciação do hospedeiro, e dá origem à poliproteína precursora das proteínas virais. O processamento da poliproteína ocorre por meio de clivagens sequenciais mediadas por proteases virais e da célula hospedeira (118, 119).

A proteína NS3 possui dois domínios funcionais: o domínio protease que utiliza a proteína NS2B como cofator e atua no processamento da poliproteína viral, e o domínio helicase que é parte do complexo replicativo e atua desfazendo a dupla fita de RNA formada durante a polimerização do RNA genômico (120). O domínio helicase da proteína ainda tem atividade de 5' RNA trifosfatase modulada pela RNA polimerase viral NS5 (121, 122).

Após o processamento da poliproteína viral, o complexo replicativo composto por proteínas não estruturais do vírus é montado na membrana do retículo endoplasmático (RE) (3). O ancoramento do complexo replicativo na membrana do RE é mediado pelas proteínas NS2B, NS4A e NS4B. Além disso, para proteger o RNA viral e o processo de replicação da resposta imune do hospedeiro, essas proteínas remodelam a membrana celular, causando invaginações para o lúmen do RE (123-126).

O complexo replicativo reconhece estruturas secundárias na extremidade da região 3' do genoma viral, e a proteína NS5 sintetiza cópias de fitas de RNA de polaridade negativa, utilizando como molde o RNA genômico de polaridade positiva (127, 128).

Essa fita de RNA de polaridade negativa é utilizada como molde para polimerização das fitas de RNA genômico e é encontrada em dupla fita, complexada ao RNA genômico nascente. Logo, a síntese de novas fitas de RNA de polaridade positiva necessita da separação da dupla fita e reutilização do RNA de polaridade negativa como molde (129, 130). Esse processo é dependente da atividade helicase da proteína NS3 e polimerase da proteína NS5 (131).

A montagem de partículas virais imaturas ocorre no RE onde a proteína do capsídeo (C) é complexada ao RNA genômico. A proteína C tem uma porção hidrofóbica que facilita a interação com a membrana do RE na formação do nucleocapsídeo. O decorrer desse processo é coordenado com a heterodimerização da prM e da E na membrana do RE, formando simultaneamente o envelope viral (113). A partícula viral imatura montada é envelopada com heterodímeros de proteína E com a proteína prM. Esses heterodímeros interagem entre si formando trímeros de heterodímeros. Durante o transporte pela rede trans do Golgi, a prM sofre uma clivagem por furina, mas permanece associada até a liberação da partícula viral no meio extracelular com pH neutro (132, 133) (Figura 1.3).

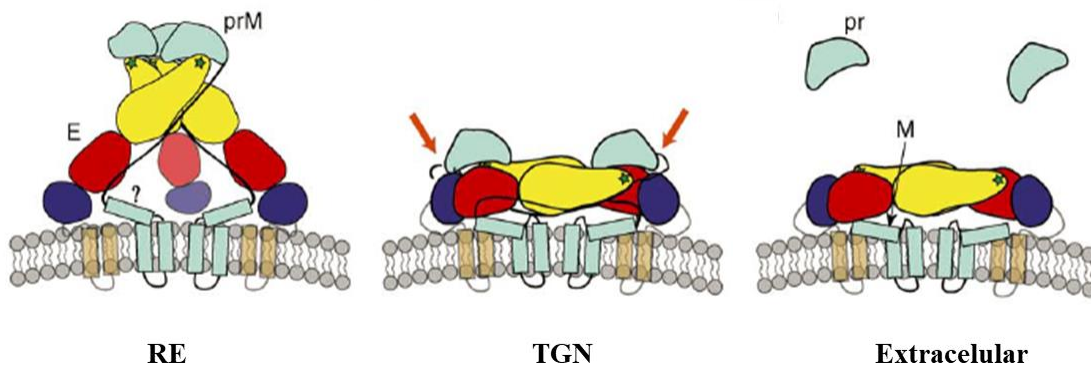


Figura 1.3 - Conformações da proteína E durante a maturação da partícula viral.

Da esquerda para a direita: trímero de heterodímeros de proteína E e prM, na partícula imatura formada no retículo endoplasmático (RE); homodímeros da proteína E após a clivagem da prM, durante o transporte pela rede trans do Golgi (TGN); homodímeros da proteína na partícula viral infectiva no meio extracelular. Os domínios da proteína E estão coloridos em laranja (hélices transmembrana), azul escuro (domínio III), amarelo (domínio II) e vermelho (domínio I); e em azul claro estão representadas as hélices e o ectodomínio da proteína prM. Adaptada de: Li *et al. Science*, 2008 (132).

Além das funções no ciclo replicativo, a atuação das proteínas NS3 e NS4B pode influenciar com a homeostase da célula hospedeira. Como dito anteriormente, o processo de replicação ocorre no lúmen do retículo endoplasmático (RE) com o complexo replicativo ancorado à membrana (126). A modulação da concentração de cálcio intracelular é efetuada pelo retículo endoplasmático, e o rearranjo da membrana do RE para abrigar o complexo replicativo, induz a liberação de cálcio em resposta ao estresse celular (134). A concentração não homeostática de cálcio durante a infecção viral induz a via intracelular de sinalização em resposta a proteínas mal enoveladas (UPR, do inglês *unfolded protein response*) através da ativação de cinases do RE (134). A ativação da UPR pode resultar em duas situações: a indução da síntese de membranas internas e aumento da eficiência da replicação viral, e por outro lado, a ativação de mecanismos de resposta imune e morte celular (135).

A atividade de helicase da proteína NS3 é dependente da hidrólise de ATP presente no RE. A concentração de ATP aumenta no lúmen quando o RE libera cálcio para o meio intracelular (136), aumentando a eficiência da atividade helicase (137). A proteína NS4B modela a membrana do RE e ancora o complexo replicativo. Além disso, interfere na UPR modulando duas vias de sinalização da resposta de maneira a induzir um quadro proviral e a sobrevivência da célula hospedeira (138). A regulação da UPR é diferente em células de mosquito e células de mamífero durante a infecção por flavivírus. Em células de mosquito, o equilíbrio das vias de resposta antiviral e de sobrevivência da UPR é mais inclinado para a autofagia e sobrevivência

celular. Em mamíferos, o destino da apoptose é mais recorrente, o que contribui para a patogênese em hospedeiros vertebrados (139).

As proteínas E, NS3 e NS4B são elementos chave para a montagem e replicação viral. Portanto, mutações nessas proteínas podem produzir efeitos drásticos no ciclo replicativo, e promissores no sentido de aumento de proliferação viral, como foi demonstrado para os DENV1 e DENV2.

1.7 Justificativa

O projeto desenvolvido pretende aprimorar a plataforma vacinal de FA 17D para que em estudos futuros, o sistema de clone infeccioso FA 17D possa ser empregado para expressão heteróloga de proteínas antigênicas. Se a plataforma vacinal mantiver uma capacidade replicativa viral comparável ao vírus vacinal FA 17D, a resposta imunológica induzida pelo antígeno expresso poderá ser intensificada, abrindo perspectiva para desenvolvimento de vacinas humanas eficazes.

As mutações em DENV aumentaram a proliferação viral *in vitro* e *in vivo*. O aumento de proliferação viral é interessante no contexto da plataforma vacinal de FA 17D, uma vez que se hipotetiza que a replicação viral *in vivo* esteja associada à imunogenicidade em modelo animal.

Previamente ao desenvolvimento deste projeto, as mutações descritas foram analisadas por alinhamento entre as sequências de aminoácidos das proteínas E e NS3 do vírus FA 17D e DENV1. Da mesma forma foi analisada a sequência de aminoácidos da proteína NS4B de DENV2 e de FA 17D para determinar o sítio de mutação correspondente no genoma do vírus FA 17D (140).

Observamos na proteína E, que as mutações estão inseridas em duas posições conservadas entre os flavivírus, no domínio haste-âncora H1. A hélice H1 da região de haste da proteína E é de extrema importância para o sucesso do ciclo replicativo viral. Portanto, estudar o efeito dessas mutações pode, não apenas resultar no aprimoramento da plataforma vacinal, mas também pode agregar conhecimento relacionado ao papel desses resíduos na estrutura da proteína E.

Na proteína NS3 de DENV1 foram descritas três mutações, nas posições 209, 435 e 480. O estudo das mutações em DENV1 sugere que a mutação na posição 209 não provoca alterações na proliferação viral em cultura de células e em tecido cerebral de camundongos. Verificamos também que o aminoácido correspondente à posição 480 no vírus da febre amarela é serina, que é o aminoácido substituinte da leucina no DENV 1 mutante. Portanto o estudo foi direcionado apenas para a mutação em NS3₄₃₅, localizada no subdomínio II do domínio helicase da proteína

NS3. Esse motivo da proteína forma a fenda de ligação ao RNA durante a replicação do genoma viral, dessa forma, alterações nessa região podem gerar efeitos impactantes na proliferação viral.

A substituição na proteína NS4B de DENV2 ocorre na posição 52, onde há troca de uma leucina para uma fenilalanina, localizada no domínio transmembrana TM1. A substituição de uma leucina por uma fenilalanina conferiu virulência em consequência do aumento da síntese de RNA viral a uma cepa de DENV 2 não virulenta, a TSV01 (108).

As substituições observadas em DENV foram inseridas no genoma do vírus FA 17D recombinante, expressando EGFP, obtido anteriormente por genética reversa (104). Os resíduos mutados estão localizados em E₄₀₀ (F → L), E₄₀₃ (T → I), NS3₄₃₉ (V → S) e NS4B₅₄ (L → F) no genoma do vírus da FA 17D. Os vírus FA recombinantes carregando mutações únicas ou combinadas foram avaliados quanto à proliferação em cultura de células de mamífero e de mosquito, e quanto a imunogenicidade em camundongos BALB/c e C57BL/6. Além disso, as mudanças estruturais provocadas pelas mutações nas proteínas E e NS3 foram estudadas por modelagem molecular.

Os resultados do presente trabalho poderão abrir possibilidades de estudo da relação entre proliferação e imunogenicidade em modelo murino, e identificar novos marcadores de viabilidade viral do vírus FA17D. Em perspectiva, o aprimoramento da plataforma vacinal FA17D pela inserção de mutações pode ser caracterizado imunologicamente em organismos complexos, abrindo perspectivas para pesquisa de vacinas recombinantes humanas baseadas no vírus FA 17D.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Caracterizar o efeito de mutações específicas com potencial de modular a proliferação viral e imunogenicidade do vírus FA 17D recombinante, expressando a EGFP na região intergênica E/NS1.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as mutações simples na proteína de envelope, em E₄₀₀ e E₄₀₃, na proteína NS3, em NS3₄₃₉, e na proteína NS4B, em NS4B₅₄, assim como diferentes combinações entre elas: E₄₀₀/E₄₀₃, E₄₀₀/NS3₄₃₉, E₄₀₀/NS4B₅₄, E₄₀₃/NS3₄₃₉, NS3₄₃₉/NS4B₅₄, E₄₀₀/E₄₀₃/NS3₄₃₉, E₄₀₀/NS3₄₃₉/NS4B₅₄ e E₄₀₀/E₄₀₃/NS3₄₃₉/NS4B₅₄. Utilizando a plataforma recombinante do vírus vacinal FA expressando a EGFP.
- Avaliar a proliferação viral em ensaios com células Vero, C6/36 e Huh7 por titulação de partículas virais infectivas e quantificação de cópias do genoma viral ao longo do tempo.
- Estudar o efeito destas mutações na resposta imunológica pós-vacinal em modelo murino.
- Estudar as alterações estruturais desencadeadas por essas mutações na estrutura tridimensional das proteínas envolvidas.

3. Metodologia

3.1 Certificados

As etapas de construção e clonagem de genomas virais em *Escherichia coli*, obtenção de moldes de cDNA dos vírus recombinantes e caracterização dos vírus da FA 17D foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus (LABMOF), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular na unidade IOC da FIOCRUZ. Este laboratório obteve junto à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança a licença para trabalhar com Organismos Geneticamente Modificados (OGM) nível 2 (CTNBio – CQB 0105/99).

Os experimentos com camundongos estão certificados pela CEUA da Fiocruz com protocolo (CEUA/IOC-046-2015) e licença L-001/2016 intitulado “Construção e avaliação de vírus vacinais da Febre Amarela 17D recombinantes, que expressam antígenos do vírus da Imunodeficiência Símia (SIV) e vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)”, sob a responsabilidade de Myrna C. Bonaldo.

3.2 Construção dos vírus recombinantes mutados

Os clones de cDNA infeccioso foram obtidos através de um sistema de dois plasmídeos previamente estabelecido pela equipe do LABMOF, do Instituto Oswaldo Cruz (95). O plasmídeo pT3 carrega a parte central do cDNA do genoma viral (posição genômica: 1374 a 9425), e o plasmídeo pG1.2 carrega as extremidades 5' e 3' fusionadas (posições genômicas: 1 a 2271 e 8275 a 10862, respectivamente). Em síntese, os dois plasmídeos são fusionados, respeitando a integridade genômica do vírus, através de tratamento com enzimas de restrição, gerando o cDNA molde do genoma viral. O construto resultante é transcrito *in vitro*, gerando o RNA genômico. Finalmente, o RNA transcrito é transfectado por eletroporação em células Vero para posterior recuperação de partículas virais infecciosas (Figura 3.1).

A primeira etapa da construção de cDNA molde é o tratamento com as enzimas de restrição *Nsi* I e *Sal* I (Promega), que tem sítios únicos em ambos os plasmídeos, em uma reação com duração de 3 horas a 37 °C. Os fragmentos de interesse são ligados pela reação com a enzima *T4 DNA Ligase* (New England Biolabs) com 200 ng do plasmídeo pG1.2 e 300 ng do plasmídeo pT3, que ocorre durante a noite a 4 °C. O DNA circular resultante é tratado com a enzima *Xho* I (Promega), que está presente em sítio único no cDNA molde, durante 3 horas a 37 °C para linearização e exposição do sítio promotor de transcrição SP6. Finalmente, a última etapa antes

da transfecção em células Vero para posterior regeneração de vírus é a transcrição *in vitro* com a *SP6 RNA Polymerase* (“mMESSAGE mMACHINE kit”, Ambion), segundo as instruções do fabricante. Todas as etapas da construção de clones infecciosos são analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8 % (m/v) (seção 3.3).

A etapa de regeneração de vírus a partir do cDNA molde consiste na transfecção de células Vero com o transcrito do cDNA molde. As células Vero foram dissociadas dos frascos de cultura com tripsina e lavadas com PBS-DEPC (ANEXO I). Em seguida, foram eletroporadas com o RNA transcrito pelo equipamento “Gene PulserXCell” (Bio-Rad), sob as seguintes condições: voltagem 200 v; capacitância 850 mf; resistência ∞ ; cubeta 4 mm. As células que passaram pelo pulso elétrico foram incubadas por 10 minutos em gelo úmido e, finalmente, semeadas com densidade de 40.000 células/cm² em frascos de cultura de 25 cm² com 12 mL de meio Earle’s 199 completo (ANEXO I). Os frascos de cultura foram mantidos em estufa a 37 °C, com ambiente úmido e 5 % de CO₂ até aparecimento de efeito citopático (CPE, do inglês *cytopathic effect*). O sobrenadante deste cultivo celular, denominado 1P (primeira passagem), foi coletado e armazenado a -80 °C. Os vírus 1P foram amplificados por infecção de novas células Vero, gerando uma suspensão viral de segunda passagem (2P) que é utilizada para os experimentos posteriores.

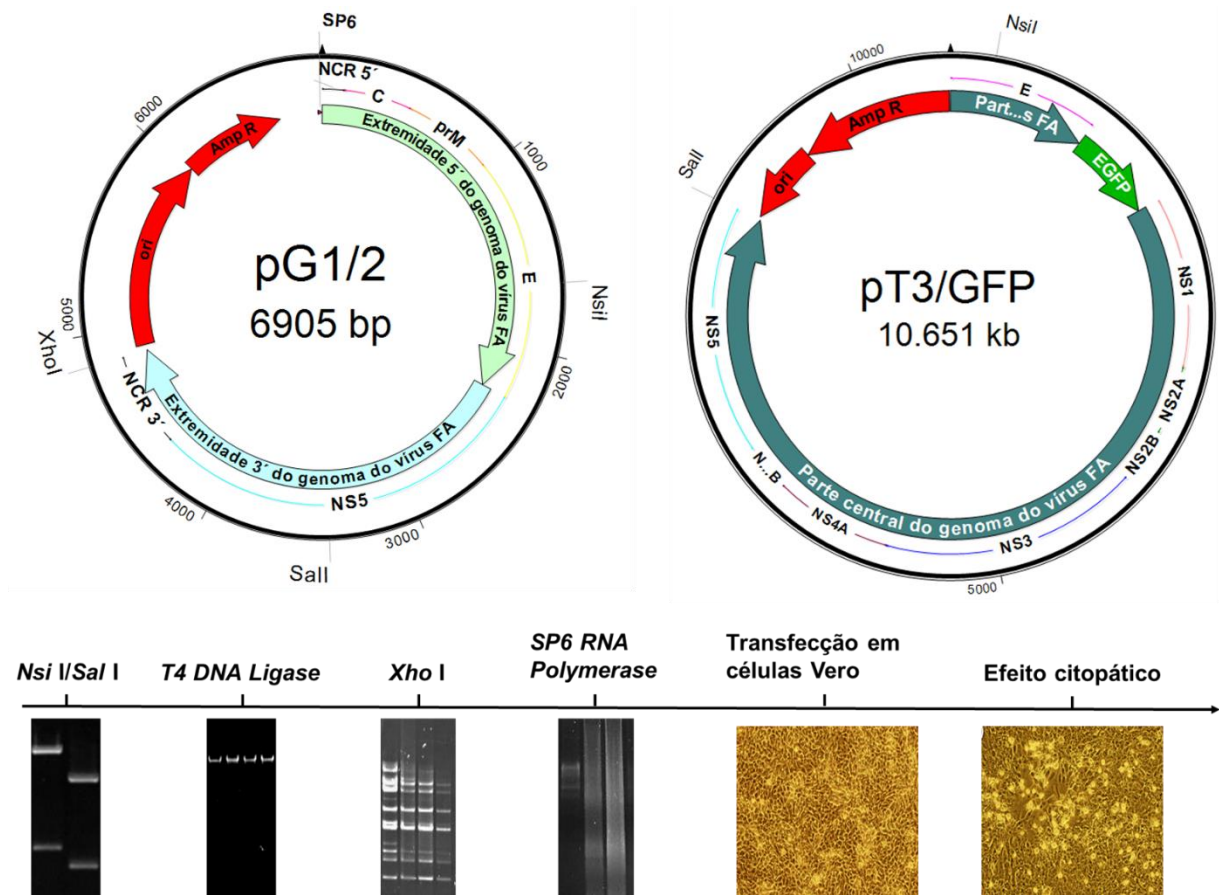


Figura 3.1 - Fluxograma da obtenção de cDNA infeccioso recombinante.

Os plasmídeos pG1.2/T3 e pT3/GFP foram tratados com as enzimas de restrição *Nsi* I e *Sal* I e os fragmentos com maior peso molecular de ambos os plasmídeos foram ligados para compor o cDNA genômico viral em um único plasmídeo. Portanto, após a digestão com as enzimas de restrição *Nsi* I e *Sal* I, o fragmento do pG1.2 contendo os genes plasmidiais e as extremidades do genoma, e o fragmento do pT3/GFP carreando a parte central do genoma foram ligados pela enzima *T4 DNA Ligase*. O DNA circular resultante foi tratado com a enzima de restrição *Xho* I para linearizar o DNA e expor o sítio promotor para a transcrição *in vitro*. A transcrição foi realizada pela enzima *SP6 RNA Polymerase* e o RNA transcrito foi transfectado em células Vero por eletroporação. O surgimento de efeito citopático após 72 a 96 horas de incubação indica regeneração de partículas virais infectivas. O perfil eletroforético de cada etapa após tratamento enzimático do cDNA e o aspecto da monocamada de células Vero pós transfecção estão representados na parte inferior da figura.

Todos os vírus recuperados por este processo foram submetidos à sequenciamento nucleotídico para verificar a sequência do RNA viral, para a presença das mutações que foram inseridas e a integridade do inserto de EGFP dos vírus recombinantes estudados.

O efeito das mutações foi estudado no vírus recombinante, carreando o inserto recombinante de EGFP na região intergênica E/NS1. Este vírus foi obtido anteriormente por Trindade *et al.* (104), no qual o inserto foi integrado ao plasmídeo pT3 (posição genômica: 1108,

gene NS1), dando origem ao vírus da plataforma vacinal II-GFP. As etapas de construção de cDNA molde foram repetidas para cada mutagênese do plasmídeo pT3/GFP.

3.2.1 Mutagênese sítio-dirigida

Os nucleotídeos substituídos foram escolhidos de forma a compor os códons que expressem com maior frequência os aminoácidos em questão, no genoma do vírus da Febre Amarela (Codon Usage Database: <http://www.kazusa.or.jp/>). Os oligonucleotídeos de mutagênese estão listados na tabela 3.1.

As mutações E₄₀₀ (F → L), E₄₀₃ (T → I), NS₃₄₃₉ (V → S) e NS_{4B54} (L → F) foram inseridas no plasmídeo pT3/GFP por mutagênese sítio-dirigida. A metodologia utilizada para realizar as mutagêneses foi a recomendada pelo fabricante do “QuikChange XL II Site-directed Mutagenesis Kit” (Agilent).

Após a reação de mutagênese, os plasmídeos foram submetidos à digestão com a enzima *Dpn* I para degradação do plasmídeo original metilado. A presença do plasmídeo mutado foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,8 % (m/v) (seção 3.3).

Tabela 3.1 - Sequências dos oligonucleotídeos de mutagênese

Iniciador	Sequências (5' → 3')	Substituições (posição na poliproteína/ posição genômica)
E ₄₀₀ senso	GAAGCTCAATAGGAAAG TTG TTGACTCAGACCATGAAAG	685 (2073)
E ₄₀₀ reverso	CTTTCATGGTCTGAGTCAA CAA CTTTCCTATTGAGCTTC	F (TTC) → L (TTG)
E ₄₀₃ senso	GAAAGTTGTTCACTCAG ATC ATGAAAGGCGTGGAACG	688 (2181)
E ₄₀₃ reverso	CGTTCCACGCCTTTCAT GAT CTGAGTGAACAACCTTC	T (ACC) → I (ATC)
NS ₃₄₃₉ senso	CGGCTTTTAAGCCTGTGCTT TCA GATGAAGGGAGGAAGGTGGC	1923 (5885-5887)
NS ₃₄₃₉ reverso	GCCACCTTCCTCCCTTCATC TGA AAGCACAGGCTTAAAAGCCG	V (GTG) → S (TCA)
NS _{4B54} senso	TACAATGCTCTCTCCAATG TTC CACCACTGGATC	2310 (7048)
NS _{4B54} reverso	GATCCAGTGGTG GAA CATTGGAGAGAGCATTGTA	L (TTG) → F (TTC)

*As trincas de nucleotídeos em destaque representam os códons que foram modificados para a troca de aminoácidos. Os nucleotídeos em vermelho foram os substituídos para compor o códon de interesse.

Os plasmídeos mutados foram transformados em bactérias eletrocompetentes *Escherichia coli* da cepa *Sure* para amplificação do número de cópias plasmidiais. A transformação foi realizada por eletroporação no equipamento “Gene PulserXCell” (Bio-Rad), sob as seguintes condições: voltagem 2500 v; capacitância 25 mf; resistência 200 Ω; cubeta 2 mm. Após o pulso elétrico, as bactérias foram recuperadas em meio SOC (Invitrogen) a 37 °C com agitação de 200 rpm, durante 1 hora. Por último, foram plaqueadas em meio LB sólido (ANEXO I) contendo 25 µg/mL de ampicilina e incubadas a 37 °C durante a noite.

No dia seguinte, colônias isoladas foram repicadas e colocadas em meio LB líquido (ANEXO I) com ampicilina para crescimento, por até 16 horas. A seleção das colônias contendo o plasmídeo foi realizada por PCR. As culturas de bactéria foram concentradas por centrifugação de 16.000 g durante 1 minuto, e aos precipitados foi adicionado o *mix* de PCR para amplificação das regiões mutadas. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8 % (m/v) (seção 3.3) e os que apresentaram o perfil de migração esperado foram purificados utilizando o “QIAquick PCR Purification Kit” (Qiagen). As condições das reações de PCR e os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão descritos na tabela 3.2. Os produtos purificados foram submetidos a sequenciamento nucleotídico para verificar a presença das mutações introduzidas.

Tabela 3.2 - Oligonucleotídeos iniciadores e condições de ciclagem da PCR

Iniciador	Sequência (5' → 3')	TM (°C)	Região de amplificação (posição genômica / tamanho do amplicon)
P3F	TGACACTCAAGGGGACATCCTA	57,2	Gene E (1842 - 2639)
RG19	GGGAGTCAACTGAATTTAGGC	58,0	1878 pb
S6BF	TGTTCAAACGGACATACCCA	54,1	Gene NS3 (5587 - 6215)
P6R	AAACGGGCAGGTCACAATTC	56,0	629 pb
P8F	TCATTATTGGCATCCTGACG	52,6	Gene NS4B (6846 - 8253)
P8R	TCCTCAAACCGCCTTGTC	57,7	1407 pb

Reagentes	Volume (µL)	Condições de ciclagem da reação		
		Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
GoTaq Master Mix Green	12,5	95°C	5'	1
Iniciador senso	0,5	95°C	40''	
Iniciador reverso	0,5	95°C	40''	
Água livre de RNase	10,5	52°C / 53°C*	40''	30
Precipitado		72°C	40'' / 2'*	
Volume final	25	72°C	10'	1
		4°C	∞	

*A temperatura de anelamento e o tempo de extensão foram determinados de acordo com os oligonucleotídeos utilizados e com o tamanho dos fragmentos amplificados.

As colônias de bactérias que continham os plasmídeos mutados, confirmados por sequenciamento, foram amplificadas para obtenção de maior massa de DNA plasmidial. Essas colônias foram colocadas em cultura com 150 mL de meio LB líquido (ANEXO I) com ampicilina e mantidas a 37 °C com agitação de 200 rpm por até 16 horas. A extração do DNA plasmidial foi realizada através do “HiSpeed Plasmid Midi Kit” (Qiagen), segundo as instruções do fabricante, e confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,8 % (m/v) (seção 3.3). A concentração dos plasmídeos foi aferida pelos reagentes de quantificação e pelo fluorômetro Qubit (Invitrogen). Uma alíquota de cada colônia de bactérias utilizadas na construção de cDNA mutados foi congelada em solução de 50% de glicerol (ANEXO I), para manutenção de um banco de estoque. Os plasmídeos pT3/GFP que carregam as mutações foram submetidos à metodologia do clone infeccioso para obtenção de vírus recombinantes II-GFP mutados.

3.3 Eletroforese em gel de agarose

Os plasmídeos e fragmentos de DNA foram diluídos em tampão de amostra 6X (ANEXO I) e aplicados ao gel de agarose 0,8 % (ANEXO I) em tampão TAE 1 X (ANEXO I), submetidos a eletroforese com 85 volts por 2 h. Para controle do tamanho dos fragmentos foram aplicados, paralelamente às amostras, os marcadores 1Kb Plus (Invitrogen) para análise de produtos de PCR ou o *lambda hind III* (Promega) para análise de plasmídeos. Os géis foram corados em solução 0,5 µg/mL de brometo de etídio (Bio-Rad) (ANEXO I), seguido de lavagem com água, e as bandas foram visualizadas e fotografadas através do fotodocumentador Gel-Doc XR (Bio-Rad), utilizando-se o programa *Image Lab*.

3.4 Titulação por ensaio de placas

A titulação por ensaio de placas é uma técnica utilizada para quantificar partículas virais infecciosas. A técnica consiste na quantificação de placas de lise formadas por partículas virais a partir de uma diluição seriada das suspensões virais de interesse.

As células Vero foram semeadas em placas de 24 poços, com densidade de 50.000 células/cm² em meio Earle’s 199 completo (ANEXO I), e mantidas na estufa de atmosfera úmida com 5 % de CO₂, a 37 °C no dia anterior a infecção com as suspensões virais.

A partir de 100 μL da suspensão viral, foram realizadas diluições seriadas com fator de diluição de 10 (Figura 3.2). As placas de cultivo são identificadas de maneira a especificar o vírus analisado e a diluição utilizada para infectar a monocamada de cada poço. Dessa forma, o resultado da revelação das placas de lise exibirá um padrão gradativo, segundo a concentração de partículas infecciosas nas suspensões utilizadas para infectar a monocamada dos poços.

O meio da cultura de células foi retirado e 100 μL de suspensão de cada diluição foram aplicados ao respectivo poço com monocamada celular semi-confluyente. A placa foi incubada na estufa a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO_2 por uma hora, com agitação a cada 15 minutos, para evitar o ressecamento dos poços. Em seguida, o excesso de suspensão viral foi retirado e a monocamada foi coberta com 1 mL de meio CMC completo (ANEXO I). A placa foi incubada novamente por um período de 7 dias, ao término do qual as células foram fixadas com formaldeído 10 % (v/v) (ANEXO I). Após 24 horas, a revelação foi realizada pelo corante cristal violeta 0,04 % (v/v) (ANEXO I).

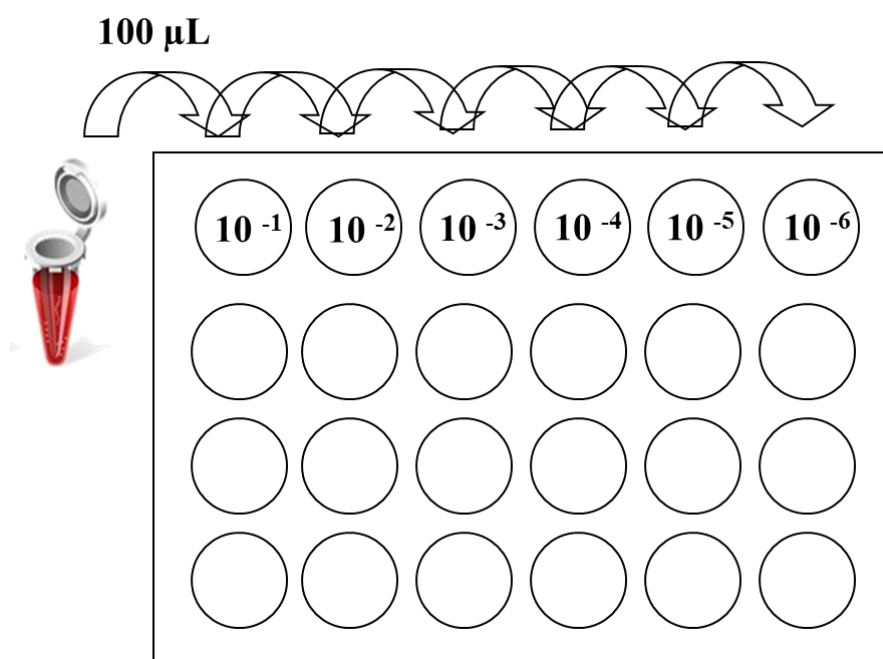


Figura 3.2 - Diluição seriada da suspensão viral.

Meio Earle's 199 completo (ANEXO I) é distribuído em uma placa de 24 poços (900 μL). A suspensão viral (100 μL) é adicionada ao primeiro poço resultando em uma diluição com proporção de 1:10. Em seguida 100 μL dessa diluição é retirada e adicionada ao próximo poço. Essa transferência é repetida até alcançar a proporção de 1:1000000.

O número de placas de lise das duas últimas diluições que apresentaram placas após a revelação pelo corante cristal violeta foi contado. O título do vírus foi determinado de acordo com a Equação 3.1.

Equação [3.1] – Cálculo do título viral

$$T = M \times ID \times FC$$

Onde:

T = título expresso em PFU/mL (do inglês, *Plaque Forming Unit*)

M = média do n° de placas de lise contadas em uma determinada diluição

ID = Inverso da diluição onde as placas de lise foram contadas

FC = fator de correção do inóculo para mL. O inóculo corresponde a 100 µL, que é a décima parte de 1 mL, FC = 10.

O título de cada suspensão viral é dado pela média entre três experimentos independentes de titulação, em que o desvio padrão dos títulos expressos em log₁₀ seja menor do que 0,5. Os títulos dos estoques virais de segunda passagem (2P) e dos sobrenadantes coletados para as curvas de proliferação foram obtidos através desta metodologia.

3.5 Extração de RNA e *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

A confirmação da integridade das sequências e da presença das diferentes mutações nos recombinantes foi realizada pela extração de RNA viral a partir das alíquotas do estoque pós-infecção, amplificação por *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) e sequenciamento. A análise das sequências tem o objetivo de correlacionar as mutações com o aparecimento de CPE.

O RNA viral foi extraído a partir de 140 µL de uma alíquota da suspensão viral, segundo o protocolo do “QIAamp Viral RNA Mini Kit” (Qiagen). O RNA foi eluído em 60 µL de AVE (Qiagen) e estocado a -80 °C em alíquotas de 20 µL para evitar repetidos ciclos de congelamento-descongelamento e conseqüente degradação do RNA.

A obtenção de cDNA foi realizada com a enzima transcriptase reversa SuperScript III (Thermo Fisher Scientific) e com os iniciadores reversos específicos para o vírus febre amarela que amplificam os fragmentos de interesse (Tabela 3.2). O cDNA foi amplificado segundo as reações na tabela 3.3.

Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificados para posterior sequenciamento na plataforma multiusuário de sequenciamento de DNA (RPT01A) da FIOCRUZ (PDTIS). Confirmamos a presença das mutações por análise das sequências geradas com o software SeqMan da suíte Lasergene 11 (DNASTar).

A mesma metodologia de RT-PCR foi utilizada para detecção de RNA viral em monocamada de células Vero transfectadas com o construto que não induziu efeito citopático. O par de oligonucleotídeos iniciadores utilizado para a amplificação foi P3F e RG19.

Tabela 3.3 - Reações de RT-PCR

A)

Reagentes	Volume (µL)	Condições da reação
RNA	4	65°C por 15 minutos seguidos de 1 minuto de incubação em gelo úmido.
Iniciador reverso (20ng/ µL)	1	
dNTP	1	
Água livre de RNase	7	
Volume final	13	

B)

Reagentes	Volume (µL)	Condições da reação	
		Temperatura	Tempo
5X First-Strand Buffer	4	25°C	5'
0.1 DTT	1	55°C	60'
Água livre de RNase	1	70°C	15'
SuperScript III	1	4°C	∞
Volume Final	7		

C)

Reagentes	Volume (µL)	Condições de ciclagem da reação		
		Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
GoTaq Master Mix Green	25	95°C	5'	1
Iniciador +	1	95°C	40''	
Iniciador -	1	52°C / 53°C	40''	30
Água livre de RNase	19	72°C	40'' / 2'	
cDNA	4	72°C	10'	1
Volume final	50	4°C	∞	

3.6 Sequenciamento nucleotídico

O sequenciamento nucleotídico foi realizado com os produtos das reações de PCR previamente analisados por eletroforese, que foram purificados utilizando-se o “QIAquick PCR Purification Kit” (Qiagen).

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o “BigDye Terminator v31 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems). Foram utilizados os mesmos oligonucleotídeos descritos para a reação de PCR da tabela 3.2. As reações de sequenciamento foram preparadas em placas de 96 poços e a leitura foi realizada pela plataforma multiusuário de sequenciamento de DNA

(RPT01A) da FIOCRUZ (PDTIS). As sequências obtidas foram analisadas no programa “SeqMan” (DNASar Lasergene 11), e alinhadas com as sequências de referência desenhadas previamente.

3.7 Cultura de células

As células que foram utilizadas neste estudo são células de linhagem epiteliais de rim de macaco verde (Vero), de homogenato de larvas de mosquitos *Aedes albopictus* (C6/36) e de hepatoma humano (Huh7). O LABMOF mantém um estoque destas células congeladas em nitrogênio líquido, que são eventualmente descongeladas em frascos de cultura descartáveis de 25 cm² e propagadas em frascos de 150 cm².

As células Vero são cultivadas em meio de cultura Earle’s 199 completo (ANEXO I) e mantidas em estufa de atmosfera úmida com 5 % de CO₂, a 37 °C. A cada 3-4 dias as células são dissociadas dos frascos de cultura com solução de tripsina/EDTA 0,05 % (Gibco) e incubadas por 5 minutos a 37 °C na estufa, seguida de inativação da tripsina com igual volume de meio Earle’s 199 completo (ANEXO I). As células são diluídas 1:4 e transferidas para novos frascos de cultura para manutenção, ou contadas em câmara de Neubauer para preparação de frascos, placas ou lâminas com determinada densidade celular para experimentos.

As células C6/36 são cultivadas em meio de cultura Leibovitz’s L-15 (Sigma) completo (ANEXO I). As células são mantidas em estufa a 28 °C, em frascos totalmente vedados. A cada 4 dias as células são dissociadas mecanicamente dos frascos com o auxílio de um “scraper” e diluídas em 10 mL de meio Leibovitz’s completo (ANEXO I). A suspensão celular é diluída 1:4 e transferida para um novo frasco de cultura para manutenção, ou as células são contadas para preparo de frascos com densidade determinada para experimentos.

As células Huh7 são cultivadas em meio DMEM (LGC) completo (ANEXO I). As culturas são mantidas em estufa com atmosfera úmida e 5 % de CO₂ a 37 °C. A cada 5 dias as células são dissociadas com tripsina, da mesma maneira que descrito para as células Vero, diluídas 1:4 e passadas para novos frascos de cultura, ou contadas em câmara de Neubauer para preparo de frascos com densidade celular específica para experimentos.

3.8 Infecção viral em células Vero, C6/36 e Huh7 e curvas de proliferação

A primeira etapa da caracterização dos efeitos das mutações estudadas consiste na avaliação da capacidade de infecção e da taxa de proliferação dos vírus mutados em células Vero, C6/36 e Huh7 em comparação ao vírus parental. Portanto, essas células foram infectadas com os vírus mutantes e controle, e a carga viral dos sobrenadantes das culturas foi aferida ao longo do tempo.

As células são cultivadas em frascos de 25 cm² no dia anterior ao procedimento de infecção, com densidade de 62.500 células/cm² para células Vero, 80.000 células/cm² para células C6/36 e 40.000 células/cm² para Huh7. As densidades celulares foram padronizadas de forma que as células possam ser mantidas por até 120 horas sem serem repicadas e que estejam em quantidade ideal para proliferação viral.

A quantidade de vírus utilizada foi padronizada para cada tipo celular de maneira a não carregar o sistema com excesso de vírus ou com baixa carga viral. O excesso de vírus pode mascarar a real capacidade proliferativa dos vírus, e infectar com pouca quantidade de partículas virais infecciosas pode levar à morte celular por saturação do meio e inibição por contato antes que os vírus atinjam o pico de proliferação. Desta forma, cada sistema celular foi infectado com um MOI específico (do inglês, *Multiplicity of Infection*), que indica a quantidade de unidades formadoras de placas (PFU) em relação à densidade celular (Equação 3.2). Portanto, todos os vírus estudados, tanto mutados quanto controles, foram utilizados em mesma quantidade de PFU para infectar cada tipo celular. Em células Vero, a MOI utilizada foi de 0,02 e em células C6/36 e Huh7, a MOI foi de 1.

O procedimento de infecção é o mesmo para todos os tipos celulares, variando somente o meio de cultura utilizado. As células foram semeadas no dia anterior à infecção em frascos de cultura de 25 cm². No dia da infecção, as monocamadas de células estavam com 90 % de confluência. Os inóculos virais foram preparados em meio de cultura adequado para cada tipo celular, com volume final de 1 mL e com a quantidade de PFU calculada para cada MOI. O sobrenadante das culturas foi descartado e substituído pelo inóculo viral. Os frascos são mantidos em estufa (28 °C para C6/36; 37°C para Vero e Huh7) durante 1 hora com agitação a cada 15 minutos. Após a incubação de 1 hora, os inóculos são descartados e são adicionados os meios de cultura específicos para cada tipo celular. As células são mantidas em estufa até o final do tempo das coletas de sobrenadante para as curvas de proliferação.

Equação [3.2] – Cálculo do MOI

$$MOI = \frac{\text{Título viral} \left(\frac{PFU}{mL} \right) \times \text{Volume (mL)}}{\text{Número total de células}}$$

As curvas de proliferação são construídas a partir da quantificação de PFU recolhidas no sobrenadante de cada cultura celular infectada pelos vírus mutantes e controle. Após a infecção das células, alíquotas do sobrenadante são coletadas a cada 24 horas até 120 horas. A quantificação de partículas virais infecciosas foi realizada por titulação por ensaio de placas (Seção 3.4). As curvas de proliferação foram realizadas em triplicata para validação estatística.

3.9 Microscopia de fluorescência

Câmaras de 8 poços (Lab-Tek Chamber Slides, Nunc) foram semeadas com células Vero (30.000 células/cm²) na primeira passagem pós transfecção com diferentes concentrações de RNA para o vírus controle II-GFP e para o vírus recombinante E₄₀₃ (1,5µg e 3,0 µg). As câmaras foram incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ e visualizadas em microscópio invertido Olympus (IX51) nos aumentos de 200 e 400 X em intervalos de tempo definidos pós-transfecção, de todos os poços infectados pelo vírus recombinante, vírus controle, e com a lâmina mock, com o objetivo de comparar o aparecimento de efeito citopático e a expressão de GFP.

3.10 Experimento com animais

A segunda etapa proposta neste projeto para caracterização das mutações específicas é a avaliação da capacidade de estimulação da resposta imune humoral pelos vírus mutantes. Portanto, camundongos C57BL/6 e BALB/c foram imunizados com os vírus mutantes e controle para titulação de anticorpos neutralizantes direcionados ao vírus FA 17DD e anticorpos para a proteína GFP.

Os animais foram imunizados com os vírus mutantes e controle por via subcutânea no coxim plantar, com seringa de 30 unidades e agulha de dimensões 8 mm x 0,3 mm (comprimento x diâmetro; BD Ultra-Fine II). Foram administradas uma dose de 10⁵ PFU e uma dose de reforço, com intervalo de 15 dias entre as imunizações (Figura 3.3). Os inóculos foram preparados com

volume final de 1 mL em meio Earle's 199 completo (ANEXO I), dos quais 60 μ L foram utilizados para imunizar os animais (30 μ L em cada pata) e 100 μ L para titulação paralela para controle de inóculo. Portanto, a concentração do inóculo preparado foi 10^5 PFU/60 μ L.

Após 30 dias da última dose, os camundongos sofreram eutanásia e o sangue foi coletado por punção cardíaca (Figura 3.3). A eutanásia foi realizada com administração intraperitoneal de uma formulação composta por cloridrato de quetamina (75,4 mg/mL) e cloridrato de xilazina (3,9 mg/mL). Após a perda de reflexo dos camundongos, o sangue foi coletado por punção cardíaca com seringa de 50 unidades (500 μ L) e agulha de 8 mm x 0,3 mm (comprimento x diâmetro; BD Ultra-Fine II). O tempo de coleta após imunização foi determinado pelos dados da literatura que indicam o pico da produção de anticorpos neutralizantes para o vírus FA em 4-6 semanas após a vacinação (19).



Figura 3.3 - Cronograma de imunização com vírus FA vacinal e recombinantes.

Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram imunizados com regime vacinal de duas doses de 10^5 PFU e intervalo de 15 dias. Após 30 dias da última dose, os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado para titulação de anticorpos.

O sangue dos camundongos foi coletado em tubos de 1,5 mL e processado para obtenção de soro. Os tubos com sangue foram incubados a 37 °C por 1 hora e depois submetidos à dois ciclos de centrifugação a 2.500 g por 10 minutos. O soro recuperado foi aquecido a 56 °C por 20 minutos para inativação de proteínas do sistema complemento. Por fim, os soros foram aliquotados e armazenados a - 20 °C.

Os animais foram separados em grupos de 5, sendo cada grupo imunizado com um vírus mutante, controle ou mock (Tabela 3.4). Os experimentos foram reproduzidos 3 vezes para cada linhagem de camundongo para a validação estatística do efeito das mutações na indução de anticorpos para FA e para GFP.

Tabela 3.4 - Grupos experimentais imunizados com vírus FA vacinal e recombinantes.

Grupo	Número de camundongos	Vírus
1	5	Mock
2	5	17DD
3	5	G1.2/T3
4	5	II-GFP
5	5	II-GFP/E ₄₀₀
6	5	II-GFP/NS ₃₄₃₉
7	5	II-GFP/NS _{4B54}
Total:	35	

3.10.1 Controle dos inóculos preparados para imunização

Simultaneamente à imunização, os inóculos foram titulados de forma a confirmar a dose administrada aos animais. Células Vero foram semeadas em placas de 6 poços com densidade de 50.000 células/cm² no dia anterior ao controle de inóculo. Após o preparo do inóculo, 100 µL foram utilizados para obter três diluições com o objetivo de infectar com 200 PFU, 100 PFU e 50 PFU respectivamente por poço, em duplicata, em uma placa de 6 poços. O sobrenadante da cultura de células de cada poço foi removido e 200 µL de suspensão viral com 50, 100 ou 200 PFU foi adicionado aos respectivos poços das replicatas. As placas foram incubadas em estufa de atmosfera úmida, com 5 % de CO₂, a 37 °C por 1 hora com agitação a cada 10 minutos para evitar o ressecamento dos poços. Após o tempo de infecção, as diluições virais foram descartadas e 3 mL de meio CMC completo (ANEXO I) foram adicionados aos poços e então, as placas foram mantidas na estufa por 7 dias. Ao final do tempo de incubação, as células foram fixadas com formaldeído 10,0 % (v/v) (ANEXO I) e, após 24 horas, coradas com cristal violeta 0,04 % (v/v) (ANEXO I). As placas de lise formadas foram contadas para cada duplicata, e a média foi utilizada para verificar a dose administrada aos animais em PFU.

3.11 Titulação de anticorpos neutralizantes por *Plaque Reduction Neutralization Test*

O *Plaque Reduction Neutralization Test* (PRNT) foi utilizado para quantificar o título de anticorpos neutralizantes para FA presentes nos soros dos camundongos imunizados. O teste baseia-se na capacidade de neutralização do vírus da FA 17DD pelos anticorpos presente nos soros dos camundongos imunizados.

Inicialmente, os soros foram diluídos em placas de cultura de 96 poços de fundo chato (MICROTEST Tissue Culture Plate, Falcon) com meio diluente (ANEXO I) por diluição seriada

de fator 2, iniciando em 1:10 até 1:1280 (Figura 3.4). O meio diluente foi distribuído em 50 µL em todos os poços das placas, exceto na linha H, onde o volume de meio diluente foi de 90 µL. Aos poços da linha H, foram adicionados 10 µL dos soros a serem testados segundo os desenhos das placas. Então a diluição seriada foi realizada transferindo 50 µL entre as linhas das placas, iniciando da linha H e terminando na linha A. Os 50 µL finais depois da transferência para a linha A são descartados. O soro fetal bovino (Gibco) foi utilizado como controle negativo em cada placa e o resultado do título de anticorpos neutralizantes foi baseado na quantificação de placas de lise desses poços.

O vírus vacinal da FA 17DD foi diluído em 1:7000 com meio diluente (ANEXO I) e 50 µL da suspensão foi adicionado aos poços. A concentração final de partículas virais infectivas após a diluição 1:7000 é de 1500 PFU/mL, resultando na distribuição de 75 PFU por poço. As placas foram incubadas a temperatura ambiente durante 1 hora, para a etapa de neutralização. Em seguida, células Vero foram dissociadas por tripsinização de um frasco de cultura, preparado previamente como descrito na seção 3.7 e distribuídas com densidade de $1,6 \times 10^5$ células/poço. As placas foram incubadas por 3 horas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida e 5 % CO₂, durante as quais as células aderiram aos poços e foram infectadas pelas partículas virais que não foram neutralizadas. Ao término da incubação, o sobrenadante dos poços foi retirado e substituído por 100 µL de meio CMC completo (ANEXO I). As placas foram mantidas na estufa durante 7 dias, após os quais, as células foram fixadas com 150 µL de formaldeído 10,0 % (v/v) (ANEXO I) durante 3 horas e coradas com cristal violeta 0,04 % (v/v) (ANEXO I) por 30 minutos.

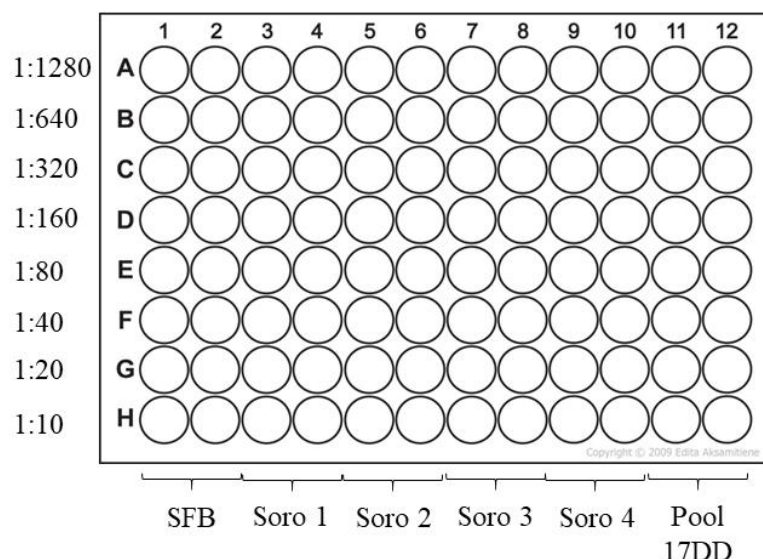


Figura 3.4 - Diluição seriada dos soros para PRNT.

Os soros dos camundongos foram testados individualmente. Como controle negativo, foi utilizado o soro fetal bovino (SFB) e como controle positivo, um pool dos soros dos camundongos imunizados com o vírus da FA 17DD. A diluição seriada dos soros foi realizada a partir de uma diluição inicial de 1:10 na linha H das placas, seguida de diluições 1:2 até a linha A.

As placas de lise formadas foram contadas e, a partir da média de placas nos poços do controle negativo SFB, foi estabelecida a quantidade de placas que representam o limiar de neutralização de 50 % das PFU presentes no sistema (Figura 3.5 A). As diluições dos soros com contagens de placas de lise que abrangem o limiar são utilizadas para prever a diluição exata na qual os soros neutralizam 50 % das PFU (Figura 3.5 B). Esse cálculo é realizado pela fórmula PREVISÃO da ferramenta *Excel*, que interpreta os dados das contagens como uma função dependente das diluições dos soros (Figura 3.5 C). Esta previsão é utilizada para funções lineares, por isso, os fatores de diluição são transformados em logaritmos com base de 10 para os cálculos de títulos. Consequentemente, os títulos obtidos estarão representados em logaritmo com base de 10 e devem ser calculados utilizando o inverso do logaritmo, segundo a equação 3.3.

Equação [3.3] – Título de anticorpos a partir da previsão

$$Titulo = 10^{previsão}$$

A figura 3.5 apresenta um exemplo de cálculo de título de anticorpos neutralizantes do soro X pela técnica de PRNT. Os títulos de camundongos do mesmo grupo foram utilizados para cálculo de média e erro médio padrão, que são parâmetros utilizados para análise comparativa.

A)

SFB	SFB	Soro X	Soro X	Diluição	Log ₁₀ (diluição)
16	21	24	29	1280	3,107
25	28	26	29	640	2,806
29	32	30	25	320	2,505
19	28	19	23	160	2,204
28	30	14	27	80	1,903
27	28	15	15	40	1,602
20	27	3	11	20	1,301
20	16	2	7	10	1,000

Média SFB: 24,63

50 %: 12,31

B)

Log ₁₀ (diluição)	Nº de placas	Previsão	Média	Título
1,602	15	1,534642	1,4672	29,32
1,301	3			
1,602	15	1,399805		
1,301	11			

C)

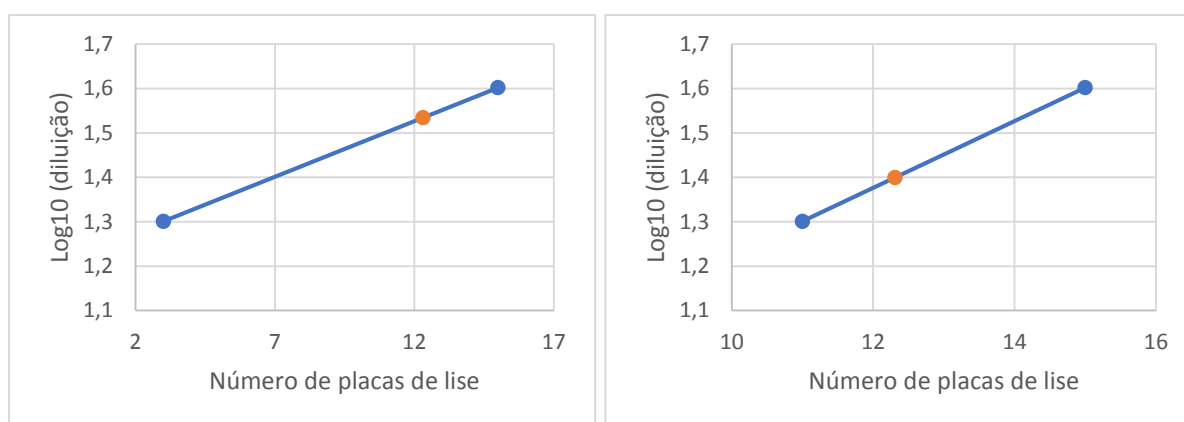


Figura 3.5 - Cálculo de título de anticorpos neutralizantes.

A) Contagem de placas de lise dos poços do controle negativo SFB e do soro X, e determinação do limiar de neutralização de 50 % de PFU. B) Cálculo do título de anticorpos neutralizantes no soro X. C) Gráficos ilustrando a interpretação da fórmula PREVISÃO do Excel. Esses gráficos não são gerados durante a análise. Foram obtidos apenas para ilustrar o racional do cálculo dos títulos. Os pontos em azul, que determinam a reta, representam os títulos conhecidos, obtidos pelas contagens de placas de lise. O ponto laranja representa o título resultante da aplicação da fórmula, portanto, o título de anticorpos neutralizantes presentes no soro X.

3.12 Titulação de anticorpos para GFP por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

Os soros dos camundongos imunizados com vírus recombinantes, que carregam o inserto codificante para a proteína GFP, foram testados por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) para titular os anticorpos específicos para GFP. Este ensaio se baseia na capacidade dos anticorpos presentes nos soros de se ligarem à proteína GFP aderida nos poços de uma placa.

O ELISA foi realizado em placas de 96 poços de fundo chato de alta afinidade de EIA/RIA (Costar 3690). As placas foram sensibilizadas com 100 ng/poço de proteína

recombinante GFP (Clontech), preparada em tampão carbonato/bicarbonato (ANEXO I), por incubação durante a noite a 4 °C para adesão da proteína aos poços. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T (ANEXO I) e bloqueadas com 150 µL de tampão de bloqueio (ANEXO I) por 2 horas a temperatura ambiente, para evitar a adsorção de anticorpos nos espaços onde a proteína não aderiu.

As placas foram lavadas 5 vezes com PBS-T (ANEXO I) e a solução de bloqueio (ANEXO I) foi distribuída para a diluição das amostras. Os soros foram inicialmente diluídos 1:20 e em seguida foi realizada uma diluição seriada com fator 2, até 1:2560. As placas foram incubadas com os soros durante 1 hora a temperatura ambiente, para a etapa de ligação dos anticorpos séricos à proteína GFP.

As placas foram lavadas novamente com PBS-T (ANEXO I) e foram adicionados aos poços 50 µL de anticorpo de detecção (Anti-Mouse IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody from sheep, Amersham) diluído 1:500 em solução de bloqueio (ANEXO I). A ligação do anticorpo de detecção aos anticorpos para GFP presentes nos soros ocorreu durante 1 hora a temperatura ambiente.

Finalmente, as placas foram lavadas com PBS-T (ANEXO I) e 50 µL do substrato da peroxidase TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, Sigma) preparado em DMSO com adição de uréia (ANEXO I) e diluído em tampão citrato/fosfato (ANEXO I) foram adicionados aos poços. A reação foi realizada em um tempo de incubação de 15 minutos após os quais, foi interrompida com 25 µL de ácido sulfúrico 1M.

Todas as lavagens foram realizadas com auxílio da lavadora automática de placas AquaMax 4000 (Molecular Devices). A leitura da absorbância foi realizada pelo equipamento VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices) com o auxílio do programa SoftMax® Pro Data Acquisition & Analysis Software (Molecular Devices) em comprimento de onda de 450 nm.

Os soros foram testados individualmente, e o título foi calculado a partir do *cut-off* estabelecido pela absorbância dos poços com o pool de soros do grupo mock de cada experimento (Figura 3.6).

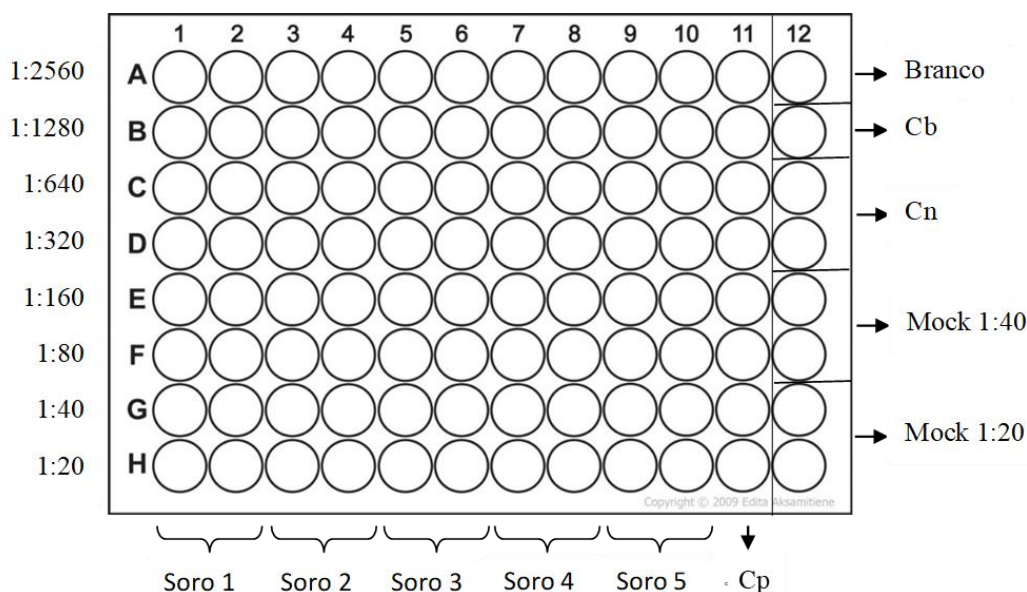


Figura 3.6 - Desenho das placas de ELISA para titulação de anticorpos dirigidos a GFP de soros de camundongos imunizados com vírus vacina FA 17D e recombinantes.

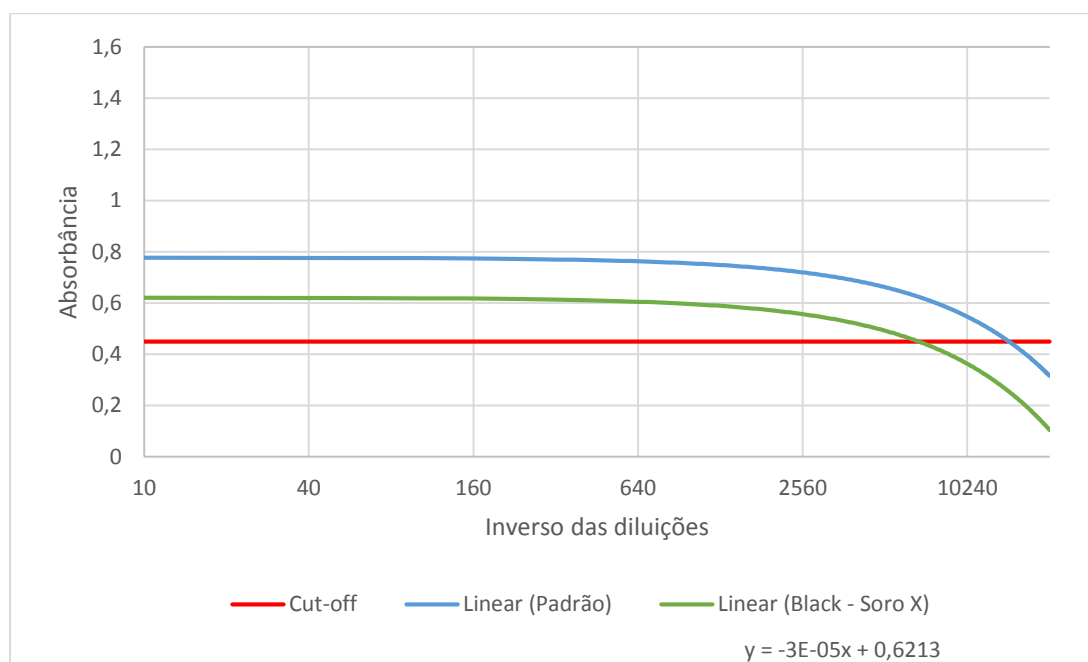
Os soros são diluídos em duplicata na placa EIA/RIA (Costar 3690) de maneira seriada com fator 2, até 1:2560. A penúltima coluna foi utilizada como controle positivo (Cp), onde há diluição de anticorpo monoclonal anti-GFP comercial (3E6). A última coluna foi utilizada para diferentes controles negativos: duas diluições de pool dos soros dos camundongos do grupo mock, 1:20 e 1:40; um controle onde não houve adição de anticorpo secundário (Cn); um controle para o bloqueio, sem sensibilização com GFP, e apenas solução de bloqueio e anticorpo de detecção (Cb); e o branco da placa com adição de nenhum reagente.

Os soros dos camundongos foram testados individualmente. Como controle negativo da imunização, foi utilizado um pool de soros dos camundongos mock nas duas primeiras diluições testadas. Para eliminar o máximo de ligações inespecíficas foram feitos 3 tipos de controles: o branco da placa, no qual só são adicionados o anticorpo de detecção e o substrato da peroxidase; o controle do bloqueio (Cb), sendo um poço só foi incubado com solução de bloqueio e anticorpo de detecção, sem sensibilização com GFP; e o controle negativo da placa (Cn), que são poços onde não foi adicionado nenhum soro teste, apenas proteína recombinante GFP, bloqueio e o anticorpo de detecção. A coluna 11 foi separada para diluição de um anticorpo comercial monoclonal anti-GFP (3E6, Invitrogen), como controle positivo do experimento (Cp).

O cálculo dos títulos foi realizado aplicando regressão linear às curvas geradas pelos valores de absorbância em cada diluição dos soros. As equações das regressões podem ser aplicadas quando o valor da absorbância for igual ao *cut-off* estabelecido, resultando no valor da maior diluição na qual os soros são positivos para GFP (Figura 3.7). Os cálculos foram realizados com o *Excel*.

Inicialmente, a média dos valores de absorbância dos controles branco, controle de bloqueio (Cb) e controle negativo (Cn) foi calculada e subtraída dos valores dos demais poços

das placas. Em seguida, as médias das duplicatas de cada diluição dos soros foram calculadas e plotadas em um gráfico de dispersão onde o eixo das ordenadas representa os valores de absorvância, e o eixo das abscissas, as diluições. As regressões lineares de cada curva gerada foram obtidas e, a partir das equações da reta, foi possível calcular os títulos de anticorpos para GFP. O *cut-off* para determinação do limite de positividade foi calculado obtendo a média das absorvâncias dos poços com os soros mock e adicionando-a ao desvio padrão das mesmas. Finalmente, na equação da reta, generalizada por $y = ax + b$, podemos substituir o y pelo valor do *cut-off* e calcular o x , que representa o título dos anticorpos para GFP presentes nos soros testados.



$$\text{Cut-off} = 0,44995$$

$$x = \frac{(0,44995 - 0,6213)}{-0,00003} \quad x = 5711,67$$

Figura 3.7 - Cálculo do título de anticorpos específicos para GFP.

Exemplo de cálculo para determinado soro (soro X). A regressão linear da curva formada a partir dos valores de absorvância em cada diluição foi obtida e o *cut-off* foi calculado segundo os valores de absorvância dos controles negativos. O título de anticorpos para GFP foi interpretado como a interseção entre a regressão linear e o *cut-off*.

Neste exemplo (Figura 3.7), a amostra testada é o soro de um camundongo C57BL/6 imunizado com o vírus II-GFP. O gráfico representa as regressões lineares das curvas geradas pelas absorvâncias do soro e do controle positivo. A equação da reta para o soro X torna possível calcular o título de anticorpos para GFP presentes no soro. Substituindo o “ y ” da equação da reta

pelo valor do *cut-off* e ajustando a equação, pode-se calcular o “x”, que representa a maior diluição na qual o soro é considerado positivo.

3.13 Modelagem molecular comparativa

As proteínas virais foram modeladas para estudar as alterações estruturais induzidas pelas mutações e sugerir os potenciais efeitos nas funções dessas proteínas. Primeiramente, as sequências de referência e as sequências contendo as mutações E₄₀₀ (F → L), E₄₀₃ (T → I), NS₃₄₃₉ (V → S) e NS_{4B54} (L → F) foram submetidas à diferentes servidores de predição de estrutura secundária, disponíveis no portal ExPASy (<https://www.expasy.org/>), com o objetivo de avaliar se as mutações poderiam afetar as estruturas secundárias dessas proteínas. O consenso foi representado neste trabalho pelos resultados da ferramenta PSIPRED.

Em seguida, com as sequências das proteínas, foi feita uma busca por similaridade contra proteínas do banco de dados PDB que possuem estruturas tridimensionais resolvidas experimentalmente. Foram selecionadas as proteínas que obtiveram similaridade maior que 60 % e identidade maior que 40 %, com cobertura da sequência maior que 99 %. A partir destes resultados, a estrutura tridimensional da proteína E foi obtida utilizando como molde a estrutura da proteína sob identificador 5IRE (141), referente à proteína E do vírus da Zika. Já para a proteína NS3, foi utilizada como molde a estrutura do domínio helicase da proteína NS3 do vírus da Febre Amarela (PDB ID: 1YKS; (142)). A proteína NS4B não tem estrutura tridimensional resolvida, portanto, essa análise não foi aplicada.

A modelagem comparativa foi realizada com o programa Modeller 9.18. Foram gerados 50 modelos para cada proteína e o modelo com menor energia avaliada pelo *DOPE score* (do inglês, *Discrete Optimized Protein Energy*) foi selecionado para o estudo. As estruturas foram minimizadas em 200 passos, utilizando o software USCF Chimera 1.11.2.

Os modelos foram avaliados quanto à sua qualidade pelos programas ERRAT (disponível em: <http://services.mbi.ucla.edu/ERRAT/>) e MolProbity (disponível em: <http://molprobity.biochem.duke.edu/>). A pontuação concedida aos modelos pelo ERRAT considera os erros baseados nas estatísticas das interações átomo-átomo não-ligadas nas estruturas, em comparação com um banco de dados de estruturas confiáveis de alta resolução. O *MolProbity score* considera sobreposições estéricas desfavoráveis de átomos, conformações de cadeias laterais classificadas como rotâmeros discrepantes e conformações de *backbone* em regiões não permitidas do gráfico de Ramachandran.

A visualização e análise das estruturas foram feitas pela interface Maestro 11.1 do software Schrödinger 2017-1.

3.14 Análises estatísticas

Os experimentos de curva de proliferação, PRNT e ELISA foram analisados estatisticamente para validar o resultado e comparar os vírus mutantes com o vírus recombinante controle. O tratamento dos dados foi adaptado para cada experimento.

3.14.1 Curvas de proliferação

Os títulos das replicatas das curvas foram calculados, e uma curva foi montada com a média e o desvio padrão dos pontos de coleta. Os títulos em cada intervalo de tempo foram colocados em histograma para análise das principais diferenças entre os vírus testados e os vírus controle. O histograma foi montado no software GraphPad Prism 6.0. Os valores foram analisados pelo teste de variância ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Dunnett, no qual os grupos de vírus mutantes foram comparados com o grupo controle II-GFP.

Os dados também foram ajustados em modelos lineares mistos pelo método de máxima verossimilhança. Os títulos virais (\log_{10} -transformados) foram modelados em função dos efeitos fixos dados pelo tempo de proliferação observado (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h pós-infecção), ou em polinômios de maior ordem do tempo de proliferação observado. Os títulos virais também foram modelados pelo grupo de mutação viral (17DD, G1.2/T3, II-GFP, E₄₀₀, NS₃₄₃₉, NS_{4B54}, E₄₀₀/NS₃₄₃₉, E₄₀₀/NS_{4B54}, NS₃₄₃₉/NS_{4B54} e E₄₀₀/NS₃₄₃₉/NS_{4B54}), pela linhagem celular usada no cultivo viral (Vero, C6/36 e Huh7), e pelos efeitos aleatórios dados pelo ensaio de infecção viral e pelo grupo de mutação viral. Interações de primeira e segunda ordens entre os efeitos fixos foram testadas.

Os modelos aninhados foram comparados através de análises de *deviance* por testes F com aproximações de Kenward-Roger. Os contrastes foram obtidos a partir do modelo final ajustado para comparação das médias ajustadas das titulações de vírus (\log_{10} -transformadas) entre grupos de mutação viral por linhagem celular ao longo do tempo. Os graus de liberdade para os efeitos ajustados foram aproximados pelo método de Satterthwaite. Ajustes de comparações múltiplas foram obtidos pelo método de Tukey.

Para a comparação da cinética do crescimento viral completa entre os diferentes grupos de mutação nas diferentes linhagens celulares usadas no cultivo viral, os valores de área sob a curva de titulação (\log_{10} -transformados) ao longo do tempo de observação (96 horas) foram aproximados pelo método de aproximação trapezoidal da integral da curva/cinética. Modelos lineares de efeitos fixos foram ajustados pelo método ordinário de mínimos quadrados tendo as áreas aproximadas modeladas em função do grupo de mutação viral e da linhagem celular usada no cultivo viral. Interações de primeira ordem entre os efeitos fixos foram testadas. Os modelos aninhados foram comparados através de análises de variância por testes F. Os contrastes foram obtidos a partir do modelo final ajustado para comparação das médias das áreas aproximadas da curva de crescimento viral entre diferentes grupos de mutação em diferentes linhagens celulares. Ajustes de comparações múltiplas foram obtidas pelo método de Tukey.

Todas as análises foram realizadas no programa R v.3.4.3, usando as bibliotecas 'nlme', 'lme4', 'lsmeans', 'effects' e 'pbkrtest'.

3.14.2 PRNT e ELISA

Os títulos de anticorpos obtidos pelas técnicas de PRNT e ELISA foram tratados para eliminação de valores discrepantes. O teste de Thompson-Tau foi aplicado para detecção de *outliers* e as amostras discrepantes foram submetidas novamente às técnicas. Assim, o comportamento de *outlier* foi confirmado ou descartado como erro de execução da técnica.

A análise de *outliers* foi realizada no *Excel* com consulta dos valores de Tau, quando disponíveis, da tabela acessível *online* no link: <http://www.mne.psu.edu/cimbala/me345/Exams/Modified_Thompson_tau_table.pdf> (Visitado em: 03/11/2017). Quando o valor de Tau não estava disponível na tabela, o valor foi calculado.

Os dados limpos foram analisados com teste de normalidade Shapiro-Wilk para determinar se a distribuição dos dados era normal. Em seguida, os dados foram submetidos ao teste de variância ANOVA e ao teste de comparações múltiplas de Dunnett. Essas análises foram realizadas no software GraphPad Prism 6.0.

4. Resultados

4.1 Obtenção de vírus FA recombinantes mutados

O efeito das mutações introduzidas nos genes E, NS3 e NS4B foi avaliado em vírus FA recombinantes expressando a proteína EGFP. Portanto, a metodologia do clone infeccioso descrita na seção 3.2 foi empregada para a obtenção dos vírus FA II-GFP mutados. As mutações foram inseridas por mutagênese sítio-dirigida no plasmídeo pT3/GFP, que foi subsequentemente fusionado ao plasmídeo pG1.2/T3 para obter o cDNA do genoma completo dos vírus mutados. Foram gerados doze cDNA viral FA II-GFP carregando uma, duas, três ou quatro mutações. Após a transcrição *in vitro* e transfecção do RNA viral em células Vero, foi observado efeito citopático (CPE) induzido por vírus em sete das doze variantes (Tabela 4.1). A regeneração de partículas virais foi confirmada por RT-PCR do RNA extraído do sobrenadante das culturas. As amostras foram sequenciadas para conferir a presença das mutações inseridas. Nenhuma variante que carrega a mutação em E₄₀₃ induziu efeito citopático ou teve positividade para o procedimento de RT-PCR indicando que não houve regeneração de partículas virais infecciosas.

Tabela 4.1 - Moldes de cDNA obtidos e regeneração de partículas virais.

Número de mutações	Clone recombinante FA	CPE	RT-PCR
Uma	II-GFP/E ₄₀₀	+	+
	II-GFP/E ₄₀₃	-	-
	II-GFP/NS3 ₄₃₉	+	+
	II-GFP/NS4B ₅₄	+	+
Duas	II-GFP/E ₄₀₀ /E ₄₀₃	-	-
	II-GFP/E ₄₀₀ /NS3 ₄₃₉	+	+
	II-GFP/E ₄₀₀ /NS4B ₅₄	+	+
	II-GFP/E ₄₀₃ /NS3 ₄₃₉	-	-
	II-GFP/NS3 ₄₃₉ /NS4B ₅₄	+	+
Três	II-GFP/E ₄₀₀ /E ₄₀₃ /NS3 ₄₃₉	-	-
	II-GFP/E ₄₀₀ /NS3 ₄₃₉ /NS4B ₅₄	+	+
Quatro	II-GFP/E ₄₀₀ /E ₄₀₃ /NS3 ₄₃₉ /NS4B ₅₄	-	-

O sobrenadante das culturas de células infectadas com os vírus que induziram efeito citopático foi coletado e utilizado para preparo de um estoque viral de segunda passagem. Os vírus estoque foram titulados por ensaio de placas. Os títulos obtidos foram utilizados para os

cálculos de MOI e de dose para imunização. Na tabela 4.2 estão os títulos dos vírus mutantes e dos vírus controle utilizados em todos os ensaios.

Tabela 4.2 - Títulos virais dos estoques de segunda passagem

Vírus FA	Título [PFU/mL]
17DD	$1,05 \times 10^7$
G1.2/T3	$2,08 \times 10^7$
II-GFP	$1,45 \times 10^7$
II-GFP/E ₄₀₀	$6,83 \times 10^6$
II-GFP/NS ₃₄₃₉	$6,64 \times 10^6$
II-GFP/NS _{4B54}	$3,73 \times 10^6$
II-GFP/E ₄₀₀ /NS ₃₄₃₉	$6,5 \times 10^6$
II-GFP/E ₄₀₀ /NS _{4B54}	$6,88 \times 10^6$
II-GFP/NS ₃₄₃₉ /NS _{4B54}	$7,19 \times 10^6$
II-GFP/E ₄₀₀ /NS ₃₄₃₉ /NS _{4B54}	$6,01 \times 10^6$

Os vírus controles utilizados para os ensaios de infecção em células e imunização em camundongos foram: o vírus vacinal FA 17DD; a plataforma viral de expressão de proteínas heterólogas, vírus FA G1.2/T3 e a plataforma vacinal recombinante para EGFP, vírus FA II-GFP. O primeiro controle foi o vírus vacinal atenuado 17DD produzido por Bio-Manguinhos, na FIOCRUZ/RJ (Lote: 12-3VFC021Z). O segundo vírus controle foi o vírus G1.2/T3, obtido pela metodologia do clone infeccioso, fusionando os plasmídeos pG1.2 e pT3, sem carrear o inserto de EGFP. O terceiro controle foi o vírus II-GFP proveniente do construto pG1.2 e pT3, carreando o inserto de EGFP. Os vírus mutantes foram derivados do vírus controle II-GFP. Portanto, esse vírus controle é o mais próximo dos vírus estudados, com quase 100 % de identidade. Os efeitos das mutações foram inicialmente avaliados em comparação ao controle II-GFP.

4.2 Estudos de proliferação viral em cultura de células

A caracterização inicial das variantes virais foi realizada pela análise da taxa de proliferação em células Vero, C6/36 e Huh7. As células foram infectadas com os vírus mutantes e controles. Os vírus controle utilizados foram: (1) vírus vacinal FA 17DD, (2) vírus gerado pela metodologia do clone infeccioso, sem mutações nem inserto, FA G1.2/T3 e (3) vírus gerado pela metodologia do clone infeccioso com inserto da proteína GFP, sem mutações, o vírus FA II-GFP.

A concentração de partículas infectivas em PFU/mL foi medida para cada dia pós infecção pela titulação por ensaio de placas.

As quantificações foram colocadas em gráfico, gerando curvas de proliferação viral para cada mutante e vírus controle. Os títulos virais foram representados em histogramas para cada tempo pós infecção e tipo celular para analisar as diferenças de proliferação em todos os pontos das curvas de 24 a 120 horas pós-infecção, entre os vírus mutantes e o vírus II-GFP (Figura 4.1).

As principais diferenças entre vírus mutantes e o vírus controle II-GFP foram observadas em 48 h e 72 h pós infecção em células Vero. As diferenças significativas representaram redução de partículas virais infectivas dos vírus mutantes II-GFP/E₄₀₀, II-GFP/E₄₀₀/NS₃₄₃₉ e II-GFP/E₄₀₀/NS₃₄₃₉/NS_{4B54} em relação ao vírus II-GFP.

Em células Huh7, as principais diferenças foram observadas nos tempos de 72 h e 96 h. Assim como em células Vero, as diferenças foram relativas ao decréscimo da concentração de partículas virais dos mutantes II-GFP/E₄₀₀, II-GFP/E₄₀₀/NS₃₄₃₉ e II-GFP/E₄₀₀/NS₃₄₃₉/NS_{4B54} em relação ao vírus II-GFP.

Finalmente, em células C6/36 as diferenças foram evidentes no tempo inicial de 24 h. Ao contrário do que foi observado nos demais tipos celulares, essas diferenças se referem ao aumento da quantidade de partículas virais dos mutantes II-GFP/E₄₀₀/NS_{4B54} e II-GFP/E₄₀₀/NS₃₄₃₉/NS_{4B54} em comparação ao vírus II-GFP.

A tabela 4.3 apresenta um resumo das diferenças significativas entre os títulos em cada intervalo de tempo encontradas na análise ANOVA com pós-teste de Dunnett.

Tabela 4.3 - Resumo das diferenças significativas determinadas pela análise de variância ANOVA e pós-teste de Dunnett

Linagem celular \ Horas pós infecção	24	48	72	96	120
Vero	-	E ₄₀₀ /NS ₃₄₃₉ ↓ E ₄₀₀ /NS ₃₄₃₉ /NS _{4B54} ↓	E ₄₀₀ ↓ E ₄₀₀ /NS ₃₄₃₉ ↓ E ₄₀₀ /NS ₃₄₃₉ /NS _{4B54} ↓	-	-
Huh7	-	-	E ₄₀₀ /NS ₃₄₃₉ ↓	E ₄₀₀ ↓ E ₄₀₀ /NS ₃₄₃₉ ↓ E ₄₀₀ /NS ₃₄₃₉ /NS _{4B54} ↓	-
C6/36	E ₄₀₀ /NS _{4B54} ↑ E ₄₀₀ /NS ₃₄₃₉ /NS _{4B54} ↑	-	-	-	-

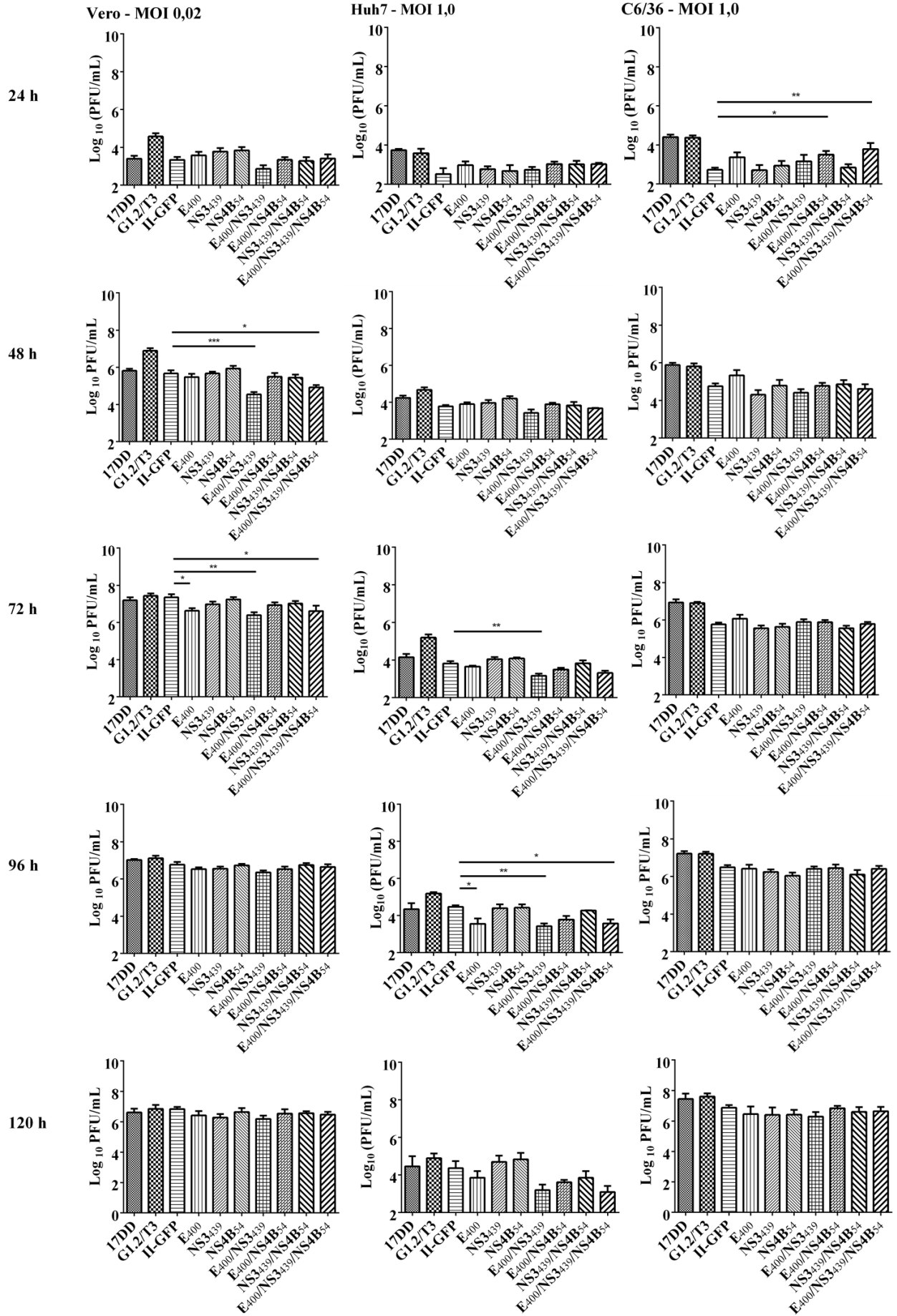


Figura 4.1 - Histogramas de proliferação viral ao longo do tempo nas três linhagens celulares.

Todos os pontos da curva foram analisados individualmente quanto ao teste ANOVA e ao pós-teste de Dunnett. As diferenças entre o controle II-GFP e os vírus mutantes, e sua significância estão representadas pelos asteriscos. Os *p*-valores ajustados para as diferenças em células Vero foram: em 48 h, 0,0003 para o mutante em E₄₀₀/NS₃₄₃₉ e 0,0115 para o mutante em E₄₀₀/NS₃₄₃₉/NS_{4B54}; em 72 h, 0,0381 para o mutante em E₄₀₀, 0,0050 para o mutante em E₄₀₀/NS₃₄₃₉ e 0,0329 para o mutante em E₄₀₀/NS₃₄₃₉/NS_{4B54}. No estudo em células Huh7, foram: em 72 h, 0,0094 para o mutante em E₄₀₀/NS₃₄₃₉; em 96 h, 0,0246 para o mutante em E₄₀₀, 0,0094 para o mutante em E₄₀₀/NS₃₄₃₉ e 0,0287 para o mutante em E₄₀₀/NS₃₄₃₉/NS_{4B54}. No experimento em C6/36 os *p*-valores ajustado foram: em 24 h, 0,0483 para o mutante em E₄₀₀/NS_{4B54} e 0,0039 para o mutante em E₄₀₀/NS₃₄₃₉/NS_{4B54}.

As diferenças significativas entre os vírus mutantes e o vírus FA controle II-GFP representaram principalmente redução de partículas virais infectivas dos vírus FA mutantes II-GFP/E₄₀₀, II-GFP/E₄₀₀/NS₃₄₃₉ e II-GFP/E₄₀₀/NS₃₄₃₉/NS_{4B54} em células de mamífero (Vero e Huh7). Em células de mosquito (C6/36), as diferenças representam aumento de partículas virais dos vírus mutantes II-GFP/E₄₀₀/NS_{4B54} e II-GFP/E₄₀₀/NS₃₄₃₉/NS_{4B54}.

O número de replicatas dos experimentos de proliferação viral gerou uma amostragem pequena para a análise comparativa com alto poder estatístico. Portanto, uma análise mais refinada das curvas foi realizada para comparar o perfil de proliferação dos vírus.

Os padrões de proliferação viral ao longo do tempo foram ajustados em modelo linear misto dos títulos virais (\log_{10} -transformados) em função dos efeitos fixos dados pelos polinômios de terceira ordem do tempo de proliferação observado (24 a 120 h pós-infecção), assim como pelo grupo de mutação viral (vírus FA 17D mutantes e controles), pela linhagem celular usada no cultivo viral (Vero, C6/36 e Huh7), e pelos efeitos aleatórios dados pelo ensaio de infecção viral. Interações de segunda ordem entre os efeitos fixos foram usadas, gerando o perfil de proliferação das variantes virais em cada tipo celular ao longo do tempo de observação (Figura 4.2).

Nesse caso, os vírus foram tratados como amostras aleatórias de uma distribuição não-observada da diversidade viral; o mesmo se deu para as linhagens celulares. Ao final, a partir do modelo linear misto ajustado, as médias ajustadas das titulações de vírus (\log_{10} -transformadas) foram comparadas entre grupos de mutação viral por linhagem celular ao longo do tempo.

As diferenças entre o vírus FA II-GFP original e os mutantes estão representadas em asteriscos indicadores de significância baseados nos *p*-valores na figura 4.2. As diferenças significativas entre todos os vírus FA mutantes e controles utilizados no estudo, em todos os tempos pós infecção, estão listadas na tabela A1, do ANEXO II. O ajuste das curvas de

proliferação de cada vírus FA ao modelo linear misto está representado nos gráficos da figura A1 do ANEXO II.

As principais diferenças entre vírus mutantes e o vírus FA controle II-GFP foram observadas nos tempos iniciais de 24 a 72 horas pós infecção em células Vero. As diferenças significativas representaram redução de partículas virais infectivas dos vírus FA mutantes II-GFP/E₄₀₀, II-GFP/E₄₀₀/NS₃₄₃₉ e II-GFP/E₄₀₀/NS₃₄₃₉/NS_{4B54} em relação ao vírus FA II-GFP.

Em células Huh7, as principais diferenças foram observadas nos tempos de 72 a 120 horas pós infecção. Assim como em células Vero, as diferenças foram relativas ao decréscimo da concentração de partículas virais dos mutantes de FA II-GFP/E₄₀₀, II-GFP/E₄₀₀/NS₃₄₃₉ e II-GFP/E₄₀₀/NS₃₄₃₉/NS_{4B54}, além do duplo mutante II-GFP/E₄₀₀/NS_{4B54} em relação ao vírus II-GFP.

Finalmente, em células C6/36 as diferenças foram evidentes nos tempos iniciais de 24 e 48 horas pós infecção. Ao contrário do que foi observado nos demais tipos celulares, essas diferenças se referem ao aumento da concentração de partículas virais dos mutantes FA II-GFP/E₄₀₀, II-GFP/E₄₀₀/NS_{4B54} e II-GFP/E₄₀₀/NS₃₄₃₉/NS_{4B54} em comparação ao vírus II-GFP. Os resultados da análise comparativa por tempo pós infecção entre os vírus FA II-GFP mutantes e o vírus original estão resumidos na tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Resumo das diferenças significativas estabelecidas entre as curvas do vírus controle FA II-GFP e dos vírus mutantes pelo modelo linear misto

Horas pós infecção Linhagem celular	24	48	72	96	120
Vero	E ₄₀₀ /NS ₃₄₃₉ /NS _{4B54} ↓	E ₄₀₀ /NS ₃₄₃₉ ↓ E ₄₀₀ /NS ₃₄₃₉ /NS _{4B54} ↓	E ₄₀₀ ↓ E ₄₀₀ /NS ₃₄₃₉ ↓ E ₄₀₀ /NS ₃₄₃₉ /NS _{4B54} ↓	-	-
Huh7	-	-	E ₄₀₀ /NS ₃₄₃₉ ↓	E ₄₀₀ ↓ E ₄₀₀ /NS ₃₄₃₉ ↓ E ₄₀₀ /NS _{4B54} ↓ E ₄₀₀ /NS ₃₄₃₉ /NS _{4B54} ↓	E ₄₀₀ /NS ₃₄₃₉ ↓ E ₄₀₀ /NS _{4B54} ↓ E ₄₀₀ /NS ₃₄₃₉ /NS _{4B54} ↓
C6/36	E ₄₀₀ /NS _{4B54} ↑ E ₄₀₀ /NS ₃₄₃₉ /NS _{4B54} ↑	E ₄₀₀ ↑	-	-	-

Os resultados das comparações das curvas ajustadas em modelo linear misto corroboram com os resultados obtidos pela análise de variância ANOVA com pós-teste de Dunnett, indicando redução e aumento de proliferação viral dos mesmos vírus mutantes em relação ao vírus FA II-GFP nas diferentes linhagens celulares. No entanto, a análise do modelo linear misto foi mais sensível, detectando diferenças significativas ao longo do tempo em intervalos onde a ANOVA não detectou, como 24 h em células Vero, 120 h em células Huh7 e 48 h em células C6/36.

Figura 4.2 - Efeito das mutações na proliferação viral em cada tempo pós infecção nas três linhagens celulares, pelo ajuste dos dados em modelo linear misto.

Os retângulos azul claro representam a distribuição dos dados das titulações virais, e os pontos vermelhos representam a estimativa do ajuste em modelo linear misto. As barras e asteriscos representam a significância das diferenças entre dois vírus baseada nos *p*-valores (ANEXO II).

Em síntese, os vírus com mutações únicas em proteínas não estruturais não influenciaram na proliferação viral em todas as linhagens celulares utilizadas, em comparação aos mutantes na proteína E. Os vírus carreando a mutação em E₄₀₀ tendem a redução da taxa de proliferação viral em células de mamífero. Por outro lado, em células de mosquito C6/36 os vírus com melhor proliferação carregam a mutação em E₄₀₀.

As curvas de proliferação dos vírus FA em Huh7 apresentaram títulos virais mais baixos nas outras linhagens celulares. Entretanto, em 120 horas pós infecção, os vírus com mutações únicas apresentam um segundo pico de crescimento. Com a intenção de verificar se este seria devido à perda de estabilidade do genoma recombinante, investigou-se a presença da inserção heteróloga por RT-PCR (Figura 4.3). Todos os vírus testados mantiveram o inserto de EGFP.

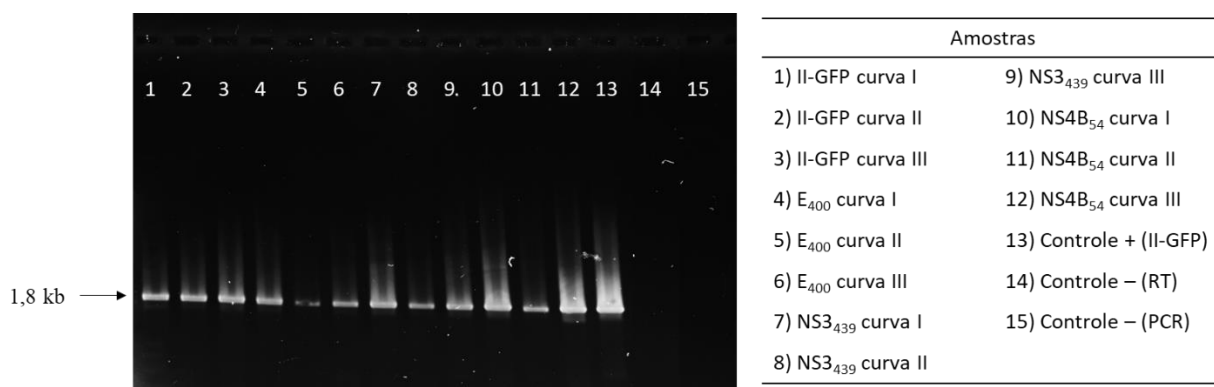


Figura 4.3 - RT-PCR dos vírus 120 h pós infecção em células Huh7.

Fragmentos amplificados das replicatas dos vírus que apresentaram o segundo pico de proliferação na curva em 120 h. O PCR foi realizado com os iniciadores que amplificam a região do cassete de expressão entre as proteínas E e NS1. O tamanho esperado do amplicon é 1,8 kb.

O estudo de proliferação viral também permitiu a comparação da taxa de proliferação entre os vírus FA controles. Pelo ajuste no modelo linear misto, observa-se que o vírus FA G1.2/T3 apresenta maiores títulos virais na maioria dos tempos pós infecção em todas as linhagens de células. As curvas de proliferação foram avaliadas pela análise de área sob a curva, e as diferenças entre os vírus FA controles foram obtidas (Figura 4.4). As áreas calculadas para cada curva de proliferação dos vírus FA controles e o contraste entre esses valores estão na figura A2 e na tabela A2, respectivamente, do ANEXO II.

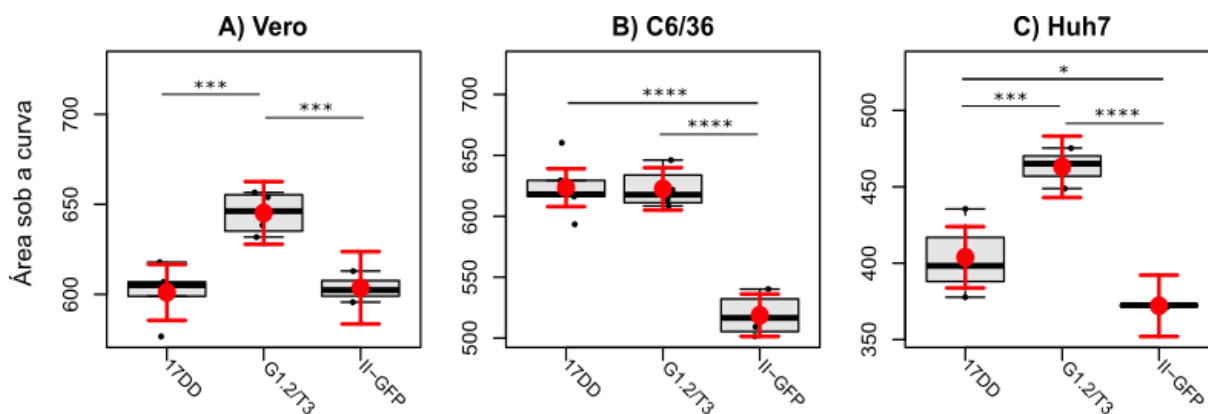


Figura 4.4 - Diferenças de proliferação entre vírus FA controles.

Representação gráfica da análise de área sob a curva da proliferação dos vírus FA controles nas três linhagens celulares estudadas.

As diferenças significativas na proliferação dos vírus FA controles mostram que os vírus obtidos por genética reversa possuem proliferação viral comparável ao vírus vacinal FA 17DD. Inclusive, o vírus FA G1.2/T3 apresenta aumento de proliferação viral em comparação ao vírus FA 17DD em células de mamífero. Por outro lado, o vírus recombinante, carregando a inserção heteróloga EGFP apresentou redução significativa da proliferação viral em todas as linhagens celulares em comparação ao vírus FA obtido por genética reversa original, o vírus FA G1.2/T3.

Os resultados dos estudos de proliferação viral também sugerem diferenças de susceptibilidade à infecção pelos vírus FA das três linhagens celulares. Além disso, o efeito das mutações diverge entre células de mamífero e células de mosquito, sugerindo diferenças do panorama da célula hospedeira para a infecção viral.

4.3 Imunogenicidade viral em camundongos

O efeito das mutações em E, NS3 e NS4B foi avaliado para a imunogenicidade em modelo murino. Portanto, os vírus FA carregando mutações únicas foram testados quanto à sua capacidade de induzir anticorpos neutralizantes ao vírus FA, assim como para GFP.

O título de anticorpos neutralizantes para o vírus FA nos soros dos camundongos imunizados foi determinado pelo ensaio de PRNT. Anticorpos neutralizantes ao vírus FA foram detectados em todos os grupos e animais imunizados com os vírus FA. Entretanto, a produção de anticorpos neutralizantes variou levemente entre as linhagens testadas de camundongos.

Os títulos de anticorpos neutralizantes aferidos nos soros de camundongos BALB/c imunizados com os vírus obtidos pela metodologia do clone infeccioso, G1.2/T3, II-GFP e os

mutantes, foram menores que em soros de animais imunizados com o vírus FA 17DD. Essa diferença diminui discretamente em soros de camundongos C57BL/6, onde os títulos de anticorpos neutralizantes presentes em soros G1.2/T3 são comparáveis aos títulos em soros 17DD. Além disso, as diferenças de títulos entre o grupo II-GFP e os grupos dos vírus mutantes também são um pouco menores em soros de camundongos C57BL/6.

Apesar do vírus FA G1.2/T3 apresentar perfil de proliferação maior que o vírus FA 17DD em cultura de células, em modelo animal este vírus estimula menos a produção de anticorpos neutralizantes que o vírus vacinal atenuado. Tanto em animais BALB/c quanto em C57BL/6, o vírus FA recombinante II-GFP estimula menos a resposta imune humoral que os vírus FA controles G1.2/T3 e 17DD.

A análise de Dunnett aplicada aos vírus FA controles, comparando o G1.2/T3 e o II-GFP com o 17DD mostra diferença significativa com p -valor $> 0,0001$ em camundongos BALB/c. A análise para as amostras de camundongos C57BL/6 resulta em diferença significativa entre o grupo FA 17DD e o II-GFP com p -valor $> 0,0001$, enquanto que em relação ao grupo que recebeu o vírus FA G1.2/T3, não foi reportada diferença significativa. Quando o teste de Dunnett foi aplicado aos controles, comparando-os com o grupo II-GFP, as diferenças significativas em relação ao grupo G1.2/T3 resultaram em p -valor de 0,0018 e de 0,0354 nas linhagens C57BL/6 e BALB/c, respectivamente.

Os vírus com mutações nas proteínas não estruturais induzem menor produção de anticorpos neutralizantes que o vírus FA controle II-GFP. Por outro lado, os soros de animais imunizados com o vírus FA com a mutação em E₄₀₀ apresentam títulos de anticorpos neutralizantes comparáveis aos do grupo de animais imunizados com o vírus II-GFP (Figura 4.5). As diferenças entre o grupo II-GFP e os grupos NS3₄₃₉ e NS4B₅₄ foram significativas nas duas linhagens de camundongos. Os p -valores foram, em animais C57BL/6, 0,0463 para a diferença em relação ao grupo NS3₄₃₉ e 0,0067 em relação ao grupo NS4B₅₄. Em animais BALB/c, os p -valores foram 0,0041 para a comparação com o grupo NS3₄₃₉ e 0,0031 para o grupo NS4B₅₄.

BALB/c			C57BL/6		
Grupo	Animais (n)	Soroconversão (%)	Grupo	Animais (n)	Soroconversão (%)
Mock	15	0	Mock	15	0
17DD	13	100	17DD	15	100
G1.2/T3	13	100	G1.2/T3	15	100
II-GFP	13	100	II-GFP	14	100
FA/GFP/E ₄₀₀	14	100	FA/GFP/E ₄₀₀	10	100
FA/GFP/NS ₃₄₃₉	14	100	FA/GFP/NS ₃₄₃₉	15	100
FA/GFP/NS _{4B54}	12	100	FA/GFP/NS _{4B54}	15	100

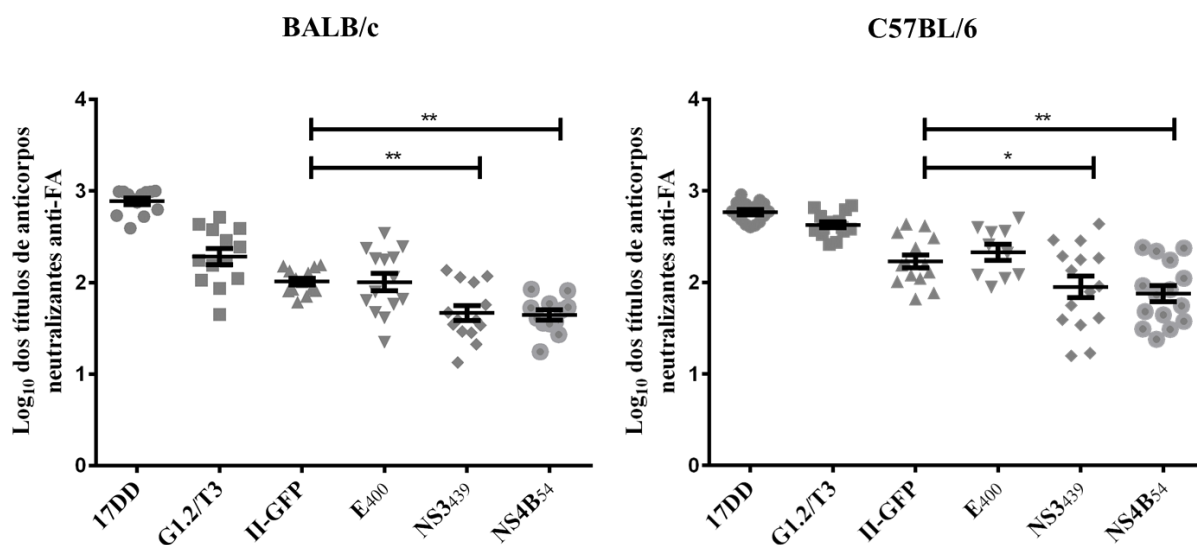


Figura 4.5 - Indução de anticorpos neutralizantes para o vírus FA 17DD.

Na parte superior da figura, são exibidas a composição dos grupos experimentais com o número de camundongos de cada grupo utilizado para a análise, assim como a porcentagem de soroconversão por grupo. Os grupos com $n < 15$ tiveram resultados descartados pela análise de *outliers* de Thompson-Tau, ou os animais foram perdidos por situações adversas. Na parte inferior da figura, estão apresentados os gráficos de dispersão montados com os valores de \log_{10} dos títulos de anticorpos neutralizantes de cada animal. Os dados foram analisados pelo teste de variância ANOVA. A análise comparativa entre os soros FA II-GFP e os soros dos animais imunizados com os vírus FA mutantes foi realizada pelo pós-teste de Dunnett, e a significância das diferenças está representada pelos asteriscos.

A resposta humoral específica para o inserto de GFP foi avaliada por ELISA. Os soros dos camundongos imunizados com o vírus FA II-GFP e suas variantes mutantes foram utilizados para obter os títulos de anticorpos para GFP. Nas duas linhagens de camundongos, o grupo de animais imunizados com o vírus FA controle II-GFP não tiveram soroconversão de 100 %, ao contrário dos animais imunizados com os vírus mutantes (Figura 4.6).

A análise comparativa dos grupos de camundongos imunizados com os vírus FA II-GFP mutantes em relação ao grupo controle II-GFP foi realizada pelo teste de variância ANOVA e

pós teste de Dunnett. Os vírus mutantes induziram anticorpos para GFP de maneira comparável ao controle II-GFP em camundongos BALB/c. Porém, em camundongos C57BL/6, o grupo imunizado com o mutante em NS3₄₃₉ apresentou maior título de anticorpos neutralizantes que o vírus controle FA II-GFP ($p = 0,0239$).

BALB/c			C57BL/6		
Grupo	Animais (n)	Soroconversão (%)	Grupo	Animais (n)	Soroconversão (%)
II-GFP	15	93,3 (14/15)	II-GFP	14	85,7 (12/14)
FA/GFP/E ₄₀₀	12	100	FA/GFP/E ₄₀₀	9	100
FA/GFP/NS3 ₄₃₉	15	100	FA/GFP/NS3 ₄₃₉	15	100
FA/GFP/NS4B ₅₄	14	100	FA/GFP/NS4B ₅₄	14	100

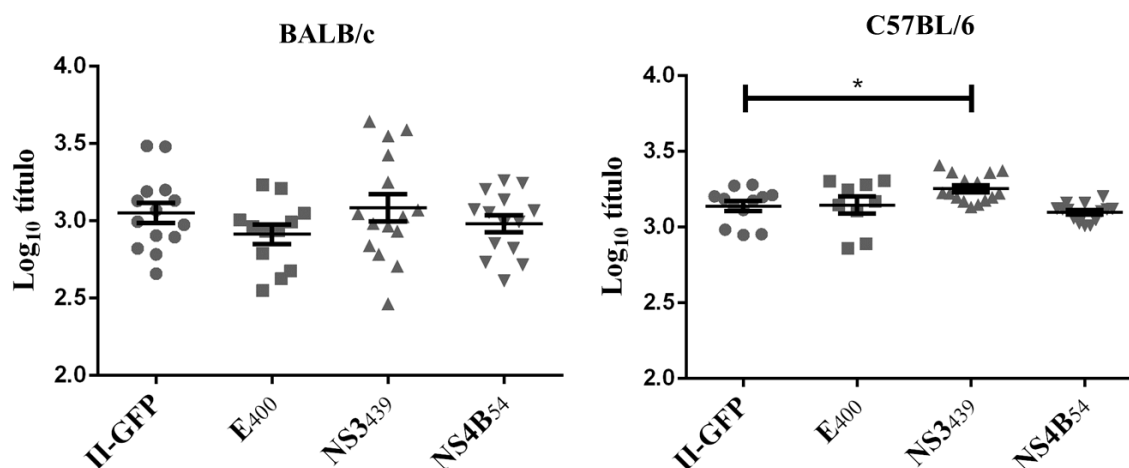


Figura 4.6 - Indução de anticorpos específicos à GFP.

Na parte superior da figura, são exibidas a composição dos grupos experimentais com o número de camundongos de cada grupo utilizado para a análise, assim como a porcentagem de soroconversão por grupo. Os grupos com $n < 15$ tiveram resultados descartados pela análise de *outliers* de Thompson-Tau, ou os animais foram perdidos por situações adversas. Na parte inferior da figura, estão apresentados os gráficos de dispersão montados com os valores de \log_{10} dos títulos de anticorpos para GFP de cada animal. Os dados foram analisados pelo teste de variância ANOVA. A análise comparativa entre os soros FA II-GFP e os soros dos animais imunizados com os vírus FA mutantes foi realizada pelo pós-teste de Dunnett, e a significância das diferenças está representada pelos asteriscos.

Os resultados do estudo de imunogenicidade em camundongos mostram que o efeito das mutações em proteínas não estruturais consiste na diminuição da indução de anticorpos neutralizantes, diferente da mutação em E₄₀₀ que não provoca impacto nesse sentido. Por outro lado, a indução de anticorpos para GFP não teve uma grande diferença entre os vírus FA mutantes e o vírus FA controle II-GFP.

4.4 Estudo da mutação em E₄₀₃

O RNA viral correspondente ao vírus mutante recombinante carregando a mutação em E₄₀₃ não produziu efeito citopático após a transfecção em células Vero, sugerindo um efeito deletério desta mutação, uma vez que não há produção significativa de partículas virais no sistema celular. Portanto, é importante a investigação do processo de infecção durante a etapa pós-transfecção e de uma avaliação do potencial impacto estrutural da substituição do aminoácido treonina por isoleucina na posição E₄₀₃.

A estratégia para o estudo do efeito desta mutação consistiu em um acompanhamento da infecção viral após a transfecção do RNA transcrito II-GFP/E₄₀₃, e a manutenção da cultura de células transfectadas até aparecimento de efeito citopático. Com esta estratégia pretendeu-se investigar se houve baixa replicação viral, a níveis indetectáveis por RT-PCR ou pela observação do efeito citopático na monocamada celular. Além disso, verificar mutações compensatórias em partículas virais recuperadas após o aparecimento do efeito citopático.

A transfecção foi realizada com duas massas de RNA iniciais: 1,5 µg e 3,0 µg. Durante a incubação, para manutenção do metabolismo celular em fase exponencial de crescimento, as células foram transferidas para novos frascos de cultura com diluição de 1:4 em meio Earle's 199 completo (ANEXO I).

A cada passagem celular, amostras de sobrenadante e de células foram coletadas para extração de RNA. O RNA viral do sobrenadante e da monocamada de cultura de células foi analisado por RT-PCR para detecção de RNA genômico. Além disso, a região amplificada corresponde a região da inserção do cassete de EGFP entre os genes E e NS1 e compreende a região da mutação. Essas amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose e sequenciadas para verificar a presença da mutação. Adicionalmente, após a primeira passagem celular, parte das células foram transferidas para lâminas Lab-Tek para detecção da expressão de GFP. O cronograma da transfecção e das coletas está na figura 4.7 A.

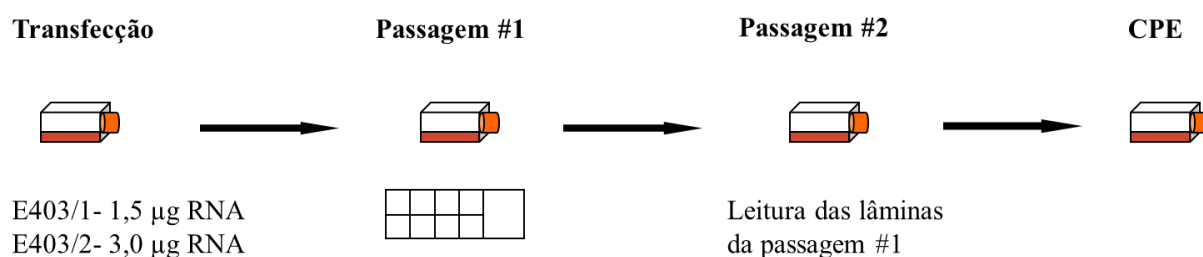
As amostras de monocamada foram coletadas apenas na primeira passagem e foram positivas para a detecção de RNA viral. As amostras de sobrenadante da primeira e da segunda passagem foram negativas no RT-PCR. O sobrenadante coletado após o aparecimento de efeito citopático foi testado positivo para RNA viral. (Figura 4.7 B).

O sequenciamento dos fragmentos amplificados por RT-PCR identificou a presença da mutação (Ile, códon ATC) nas amostras de monocamada da passagem #1. No entanto, o sequenciamento dos fragmentos amplificados dos sobrenadantes das culturas após o aparecimento do efeito citopático mostrou a reversão do códon mutado (Ile, ATC) para o códon original (Thr, ACC) (Figura 4.7 D).

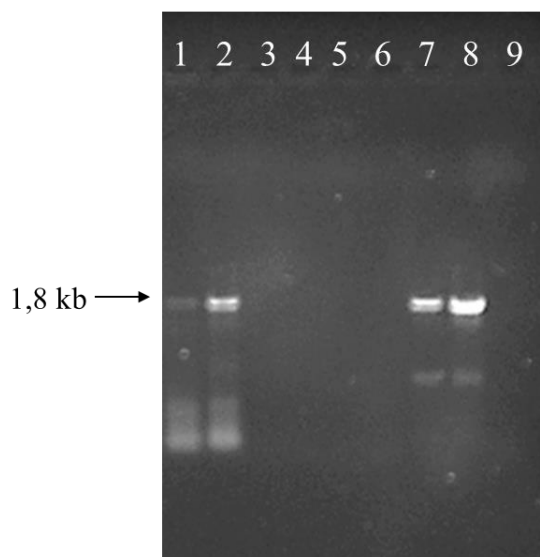
A fluorescência da EGFP nas células transfectadas complementa os resultados do RT-PCR e do sequenciamento. A leitura das lâminas corresponde à expressão das proteínas virais pelas células na última passagem antes do efeito citopático. As células transfectadas com 3,0 µg de RNA aparentam expressar em maior número a EGFP, ao contrário das células transfectadas com 1,5 µg de RNA. Em ambos os casos, observa-se dispersão do vírus limitada a células vizinhas (Figura 4.7 C).

Os resultados indicam que o aparecimento de efeito citopático foi relacionado à reversão da mutação em E₄₀₃. Portanto, a fluorescência emitida pela EGFP nas lâminas da segunda passagem celular pode estar relacionada à reversão da mutação, reforçando a hipótese do impacto deletério desta mutação na posição 403.

A)



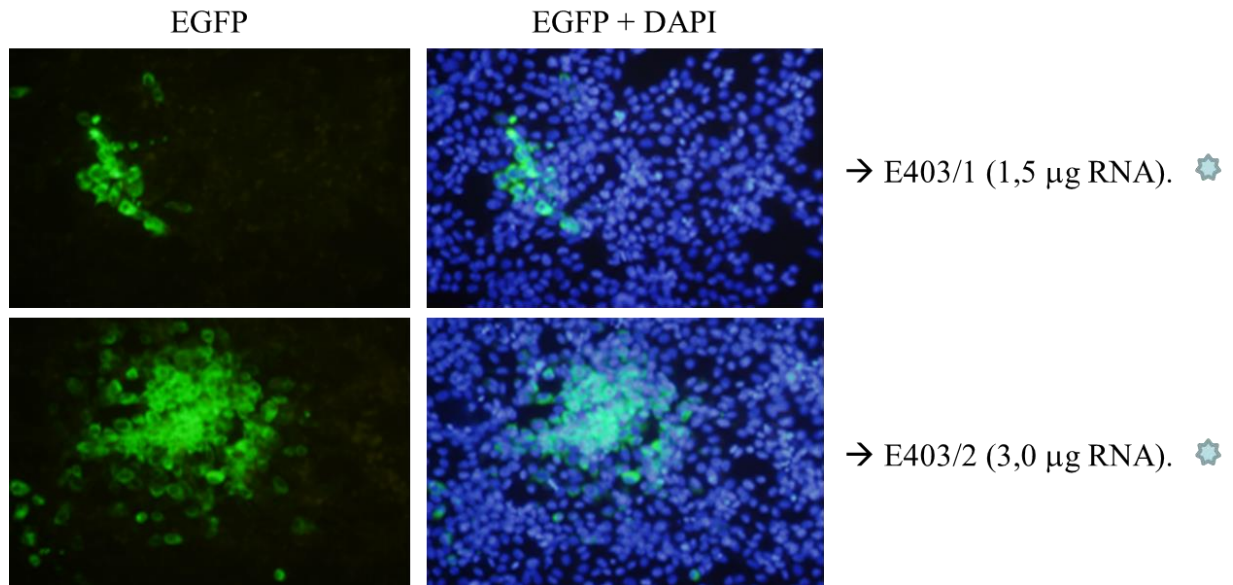
B)



Amostras

- 1) Monocamada 403/1 – Passagem #1
- 2) Monocamada 403/2 – Passagem #1
- 3) Sobrenadante 403/1 – Passagem #1
- 4) Sobrenadante 403/2 – Passagem #1
- 5) Sobrenadante 403/1 – Passagem #2 ✨
- 6) Sobrenadante 403/2 – Passagem #2 ✨
- 7) Sobrenadante 403/1 – CPE ✨
- 8) Sobrenadante 403/2 – CPE ✨
- 9) Controle negativo

C)



D)

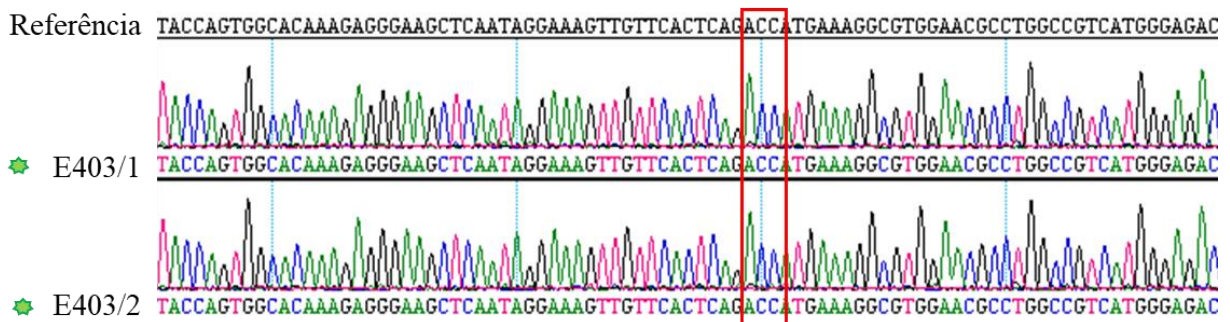


Figura 4.7 - Estudo do construto mutante II-GFP/E403.

A) Cronograma da transfecção e acompanhamento da cultura celular até aparecimento de efeito citopático (CPE). B) RT-PCR das amostras coletadas a cada passagem celular e após CPE. C) Expressão de EGFP pelas células transfectadas com as duas massas de RNA na última passagem antes do aparecimento de CPE (Aumento de 400 X). D) Cromatograma do sequenciamento das amostras de sobrenadante coletadas após CPE. Em vermelho está destacado o códon para o resíduo da posição E403. As estrelas azuis indicam as amostras relacionadas nas análises apresentadas em (B) e (C), e as estrelas verdes indicam as amostras relacionadas em (B) e (D).

4.5 Alterações estruturais induzidas pelas mutações nas proteínas do vírus FA

Os efeitos das mutações sobre o *fitness* viral podem estar relacionados com alterações estruturais das proteínas, que provocariam distúrbios estruturais e funcionais. Com o objetivo inicial de avaliar o efeito estrutural das trocas de aminoácidos nas proteínas virais E, NS3 e NS4B, as proteínas referências e as proteínas contendo as mutações foram estudadas quanto à formação das estruturas secundárias e quanto à estrutura tridimensional.

As sequências das proteínas de referência e das proteínas contendo as mutações foram submetidas ao servidor de predição PSIPRED para verificar possíveis mudanças da estrutura secundária nestas proteínas. Nenhuma das mutações provocou desestabilização de estruturas secundárias (Figura 4.8).

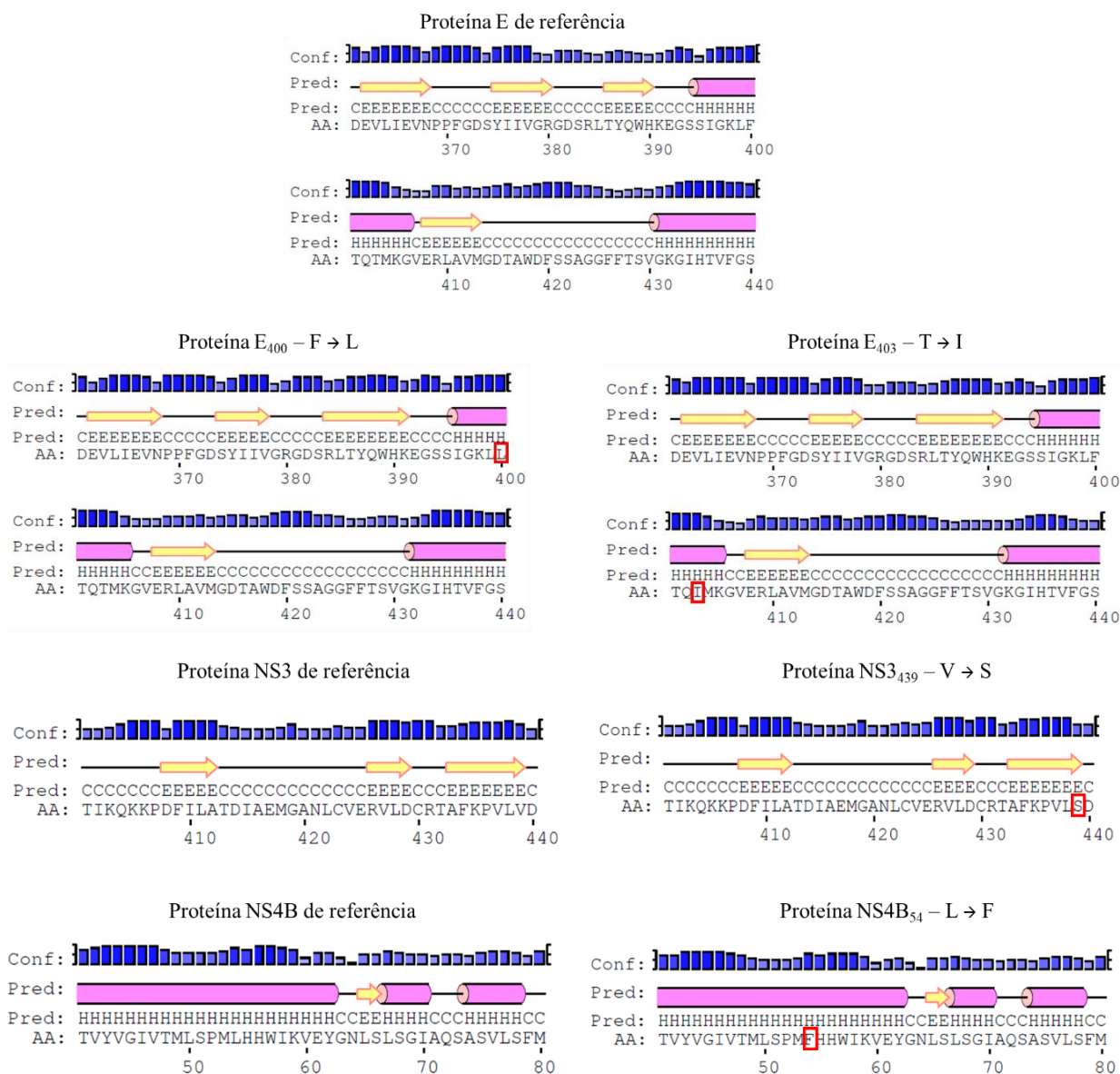


Figura 4.8 - Predição de estruturas secundárias das proteínas E, NS3 e NS4B.

Resultado da predição de estrutura secundária, onde as setas em amarelo representam as folhas β e os cilindros em rosa representam as α -hélices. Os conectores em preto entre as α -hélices e as folhas β representam as regiões sem estrutura secundária definida, denominadas *coil*. As barras em azul representam a confiabilidade da predição. Os retângulos vermelhos destacam as mutações inseridas.

O estudo de alterações estruturais foi mais aprofundado pela modelagem das estruturas tridimensionais das proteínas. Os modelos foram obtidos através de modelagem comparativa, utilizando como molde estruturas obtidas experimentalmente e disponibilizadas no banco de

dados RCSB PDB. Portanto, a mutação em NS4B₅₄ não foi incluída na modelagem molecular comparativa, uma vez que não há estruturas tridimensionais resolvidas no banco de dados com similaridade de sequência suficiente para modelar esta proteína.

A estrutura molde para a proteína E, foi a sob identificador PDB 5IRE, estabelecida por microscopia crioelétrica com resolução de 3,8 Å. Este modelo foi selecionado por ter a maior resolução entre os modelos existentes, com identidade de 42,04 % relativa à sequência da proteína a ser modelada.

A estrutura molde utilizada para a modelagem do domínio helicase da proteína NS3 foi a estrutura da proteína NS3 do vírus da Febre Amarela, resolvida por cristalografia de raios X, 1YKS. A sequência deste modelo possui identidade de 100 % com a sequência da proteína NS3 do vírus FA II-GFP. Além disso, a resolução deste modelo é de 1,80 Å.

A qualidade dos modelos gerados foi avaliada através de algumas ferramentas. Inicialmente, foram gerados 50 modelos para as proteínas E e NS3 e suas variantes, no software Modeller 9.18. Dentre esses modelos, aquele que apresentou o menor *DOPE score* total, indicando o modelo com menor energia, foi selecionado para o estudo. Os modelos selecionados foram verificados pelo programa ERRAT que avalia a estrutura e atribui um fator de qualidade. As estruturas foram minimizadas para aumentar a qualidade dos modelos e foram submetidas novamente ao programa ERRAT. O *MolProbity score* foi atribuído somente às estruturas finais, assim como a análise dos gráficos de Ramachandran. No ANEXO III estão os gráficos de Ramachandran, correspondentes aos modelos gerados, além dos gráficos gerados pelo ERRAT e de *DOPE score* relativos a cada resíduo das estruturas.

Os fatores de qualidade ERRAT para os modelos selecionados pelo *DOPE score* antes da minimização foram baixos para as estruturas da proteína E (Tabela 4.5). Após a minimização, o fator aumentou substancialmente, porém não atingiu o valor esperado de 90 para estruturas de baixa resolução (até 3 Å), segundo os parâmetros do programa. Entretanto, o valor de ERRAT da estrutura molde 5IRE é mais baixo que o valor das estruturas geradas. A diferença na qualidade da estrutura molde em relação às modeladas também está demonstrada nos gráficos de Ramachandran (ANEXO III). Finalmente, os valores altos do *MolProbity score* refletem a avaliação da qualidade pelo ERRAT.

Os modelos gerados para a proteína NS3 possuem valores altos de ERRAT antes da minimização. Esses valores aumentam ainda mais depois da minimização e foram maiores do que o fator de qualidade da estrutura molde 1YKS. Além disso, o *MolProbity score* das estruturas modeladas foi mais baixo que o da estrutura molde (Tabela 4.5).

A partir desses dados, constata-se que os modelos gerados para as proteínas E e NS3 apresentaram confiabilidade para o estudo das mutações. Portanto, estes foram utilizados para

localizar as mutações na estrutura tridimensional, além de comparar diferenças entre modelos das proteínas de referência e mutadas. A partir dos modelos foram geradas superfícies moleculares coloridas de acordo com as propriedades e as cargas dos resíduos.

Tabela 4.5 - Avaliação da qualidade dos modelos tridimensionais das proteínas

Modelo	ERRAT inicial	ERRAT final	DOPE score	MolProbity score	Ramachandran: Regiões favorecidas	Ramachandran: Regiões permitidas
E	35,876	78,914	-48214,56	2,73	86,6 %	96,3 %
E ₄₀₀	35,876	77,406	-48093,51	2,76	86,6 %	96,3 %
E ₄₀₃	35,876	78,033	-48290,06	2,76	86,2 %	96,3 %
5IRE	-	71,523	-41571,54	2,59	81,6 %	93,8 %
NS3 _{hel}	80,562	95,192	-49943,69	1,68	94,5 %	99,1 %
NS3 ₄₃₉	80,562	95,192	-49864,25	1,67	94,7 %	99,1 %
1YKS	-	93,451	-49097,57	2,44	95,1 %	99,8 %

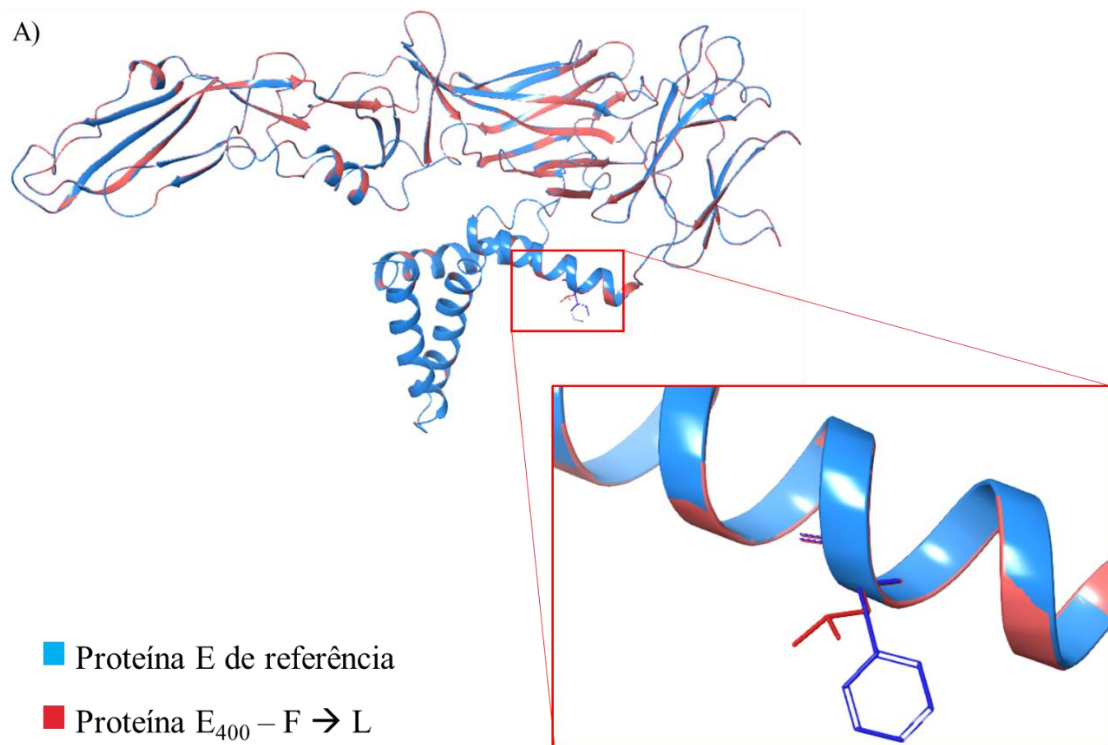
As mutações na proteína E estão localizadas no N-terminal do domínio haste-âncora, na α -hélice H1. As sequências de aminoácidos das proteínas E de alguns flavivírus foram alinhadas para mapeamento dos resíduos que foram mutados. Estes resíduos estão localizados em regiões conservadas entre os flavivírus (Figura 4.9).

Sequência (Número de acesso no GenBank)	Posições de aminoácidos na proteína E, segundo a sequência referência:																									
	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4						
Vírus FA 17D (Referência)	G	K	L	F	T	Q	T	M	K	G	V	E	R	L	A	V	M	G	D	T	A	W	D	F	S	S
Vírus FA Asibi (AAT58050.1)	G	K	L	F	T	Q	T	M	K	G	A	E	R	L	A	V	M	G	D	A	A	W	D	F	S	S
Vírus FA ES-504 (KY885000.1)	G	K	L	F	T	Q	T	M	K	G	A	E	R	L	A	V	M	G	D	A	A	W	D	F	G	S
Vírus Dengue sorotipo 1 (AAN60367.2)	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R	M	A	I	L	G	D	T	A	W	D	F	G	S
Vírus Dengue sorotipo 2 (AAA42962.1)	G	Q	M	F	E	T	T	M	R	G	A	K	R	M	A	I	L	G	D	T	A	W	D	F	G	S
Vírus Dengue sorotipo 3 (ASN77913.1)	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R	M	A	I	L	G	D	T	A	W	D	F	G	S
Vírus Dengue sorotipo 4 (ASS36950.1)	G	K	M	F	E	S	T	Y	R	G	A	K	R	M	A	I	L	G	E	T	A	W	D	F	G	S
Vírus da Zika Rio-U1 (KU926309.2)	G	K	A	F	E	A	T	V	R	G	A	K	R	M	A	V	L	G	D	T	A	W	D	F	G	S
Vírus da encefalite transmitida por carrapatos (AAA86870.1)	G	R	V	F	Q	K	T	K	K	G	I	E	R	L	T	V	I	G	E	H	A	W	D	F	G	S
Vírus da Encefalite Japonesa (AAA81554.1)	G	K	A	F	S	T	T	L	K	G	A	Q	R	L	A	A	L	G	D	T	A	W	D	F	G	S

Figura 4.9 - Alinhamento da proteína E de diferentes flavivírus.

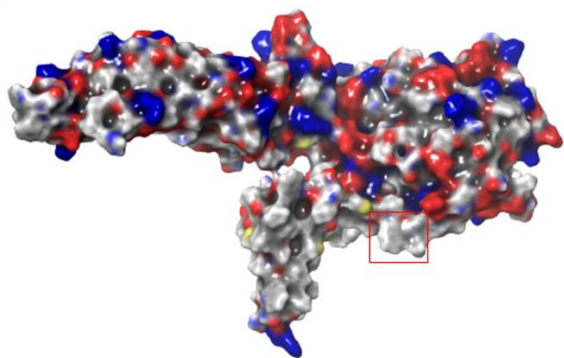
As sequências da proteína E de diferentes flavivírus foram retiradas do banco de dados de sequências GenBank. A primeira sequência do alinhamento não está disponível no banco de dados e corresponde à sequência traduzida do gene utilizado para mutagênese neste trabalho. Em vermelho estão evidenciadas as posições 400 e 403 da proteína E.

A mutação em E₄₀₀ (F → L) está localizada no início da α -hélice H1 do domínio haste-âncora da proteína E (Figura 4.10). O modelo molecular gerado mostrou que a mutação altera a topologia da superfície na região da α -hélice, porém não modifica o seu caráter hidrofóbico (Figura 4.10B). Entretanto, a diminuição da área da superfície na região, resultante da substituição de uma fenilalanina por uma leucina, expõe a carga negativa parcial do grupamento carbonila da cadeia principal da isoleucina situada na posição 396 na superfície molecular (Figura 4.10C).

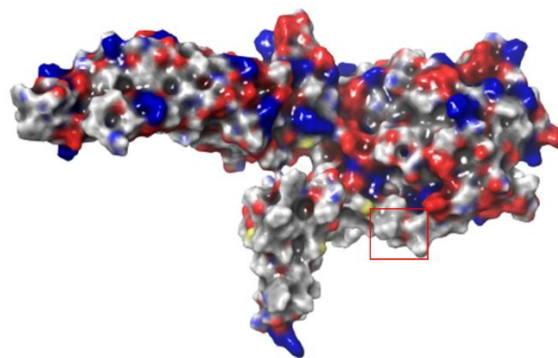


B)

Proteína E de referência

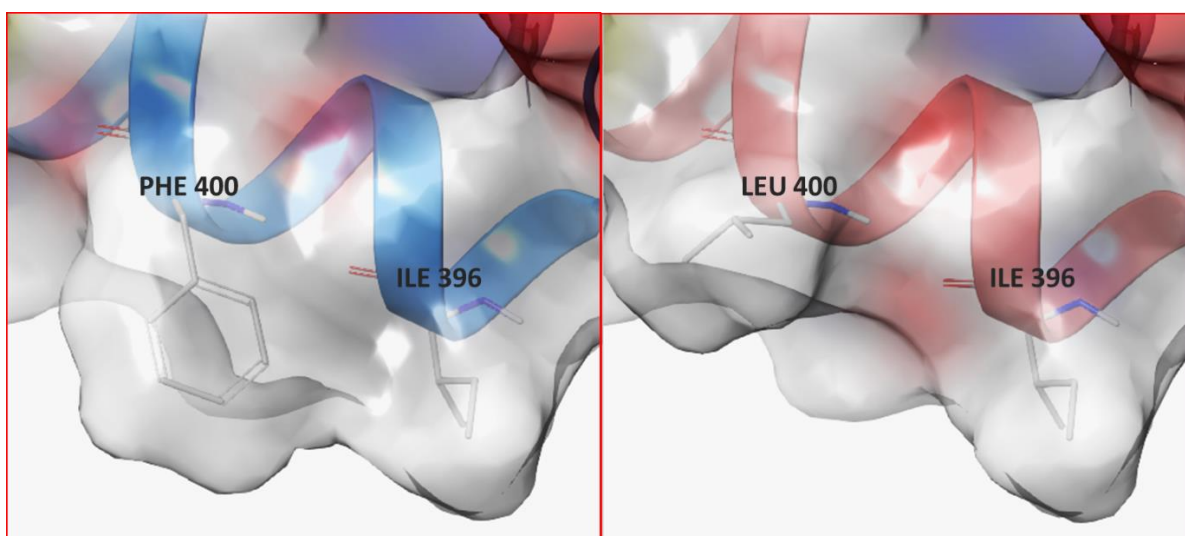


Proteína E₄₀₀ - F → L



■ Negativos

■ Positivos



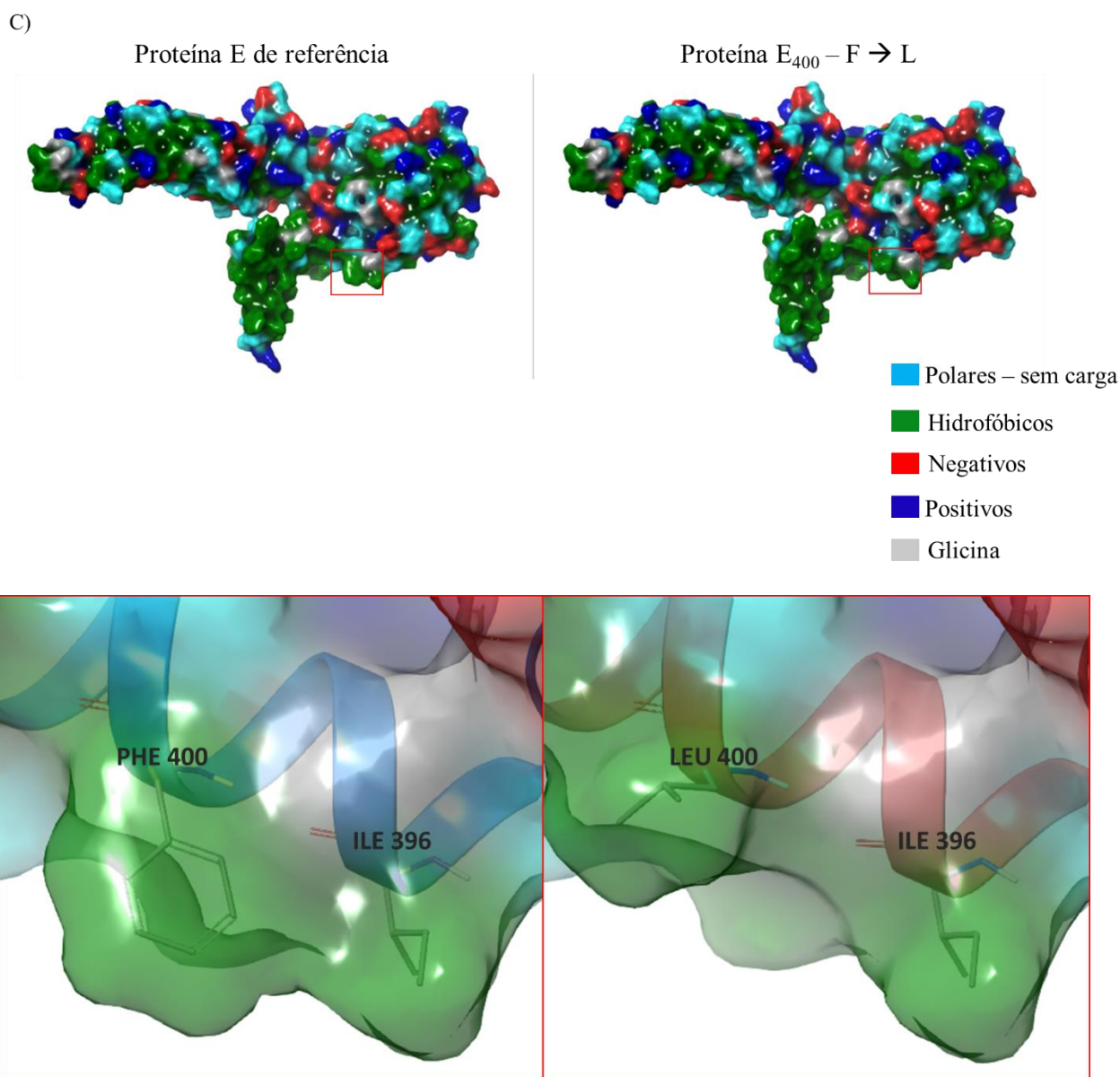


Figura 4.10 - Localização da mutação em E₄₀₀ e comparação das superfícies moleculares.
 A) Alinhamento das estruturas tridimensionais da proteína E mutada em vermelho e de referência, em azul. Em destaque, o resíduo E₄₀₀ das duas estruturas. B) Superfície molecular colorida segundo as propriedades físico-químicas dos aminoácidos. C) Superfície molecular colorida segundo as cargas dos aminoácidos.

A modificação da topologia da superfície molecular na região do resíduo 400 pode ser relevante, por se localizar no início da α -hélice H1. Portanto, a área superficial acessível (SASA – do inglês, *Solvent Accessible Surface Area*) dos resíduos das proteínas E de referência e E₄₀₀ foi medida no software USCF Chimera 1.11.2 (ANEXO IV). Na proteína E de referência, o resíduo de fenilalanina na posição 400 apresenta uma área de 159,26 Å², enquanto que na proteína E₄₀₀ o resíduo correspondente de leucina reduz essa medida para 139,83 Å² (Figura 4.11).

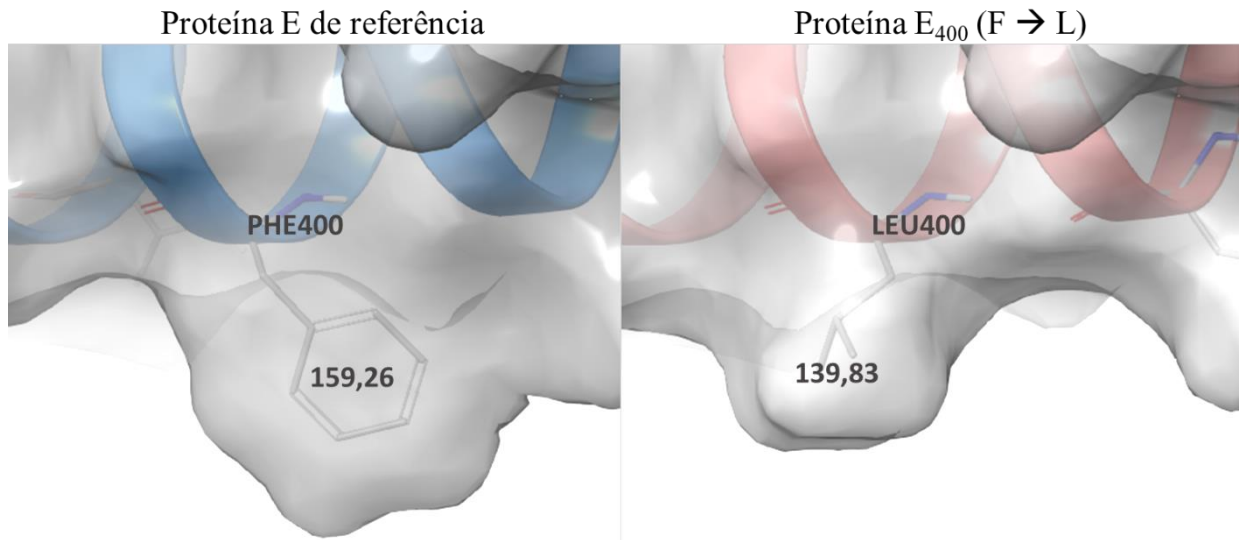
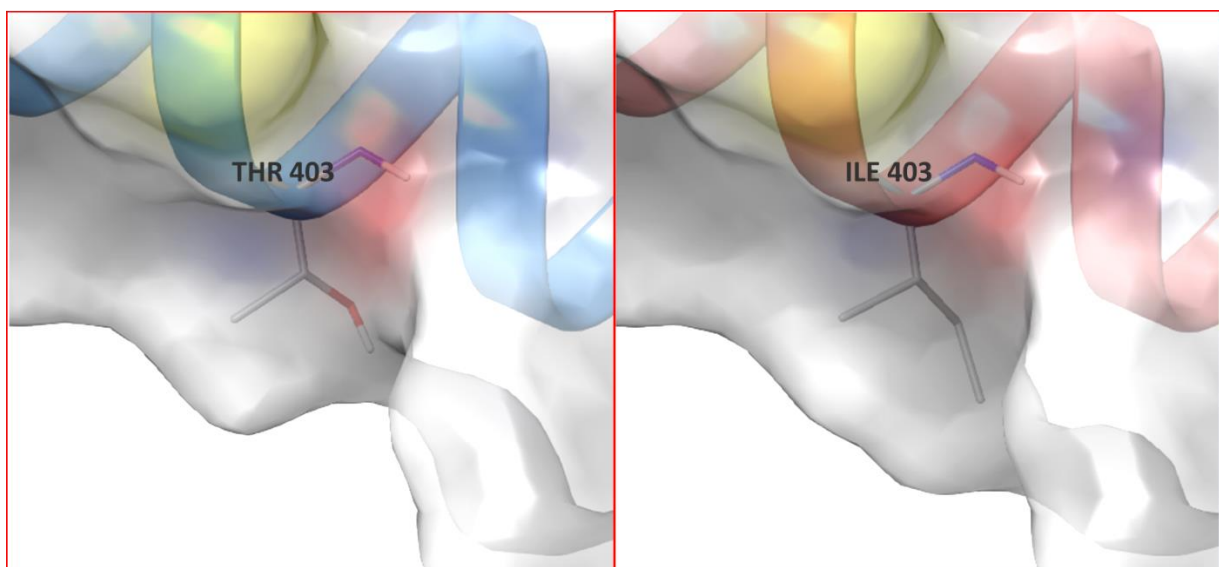
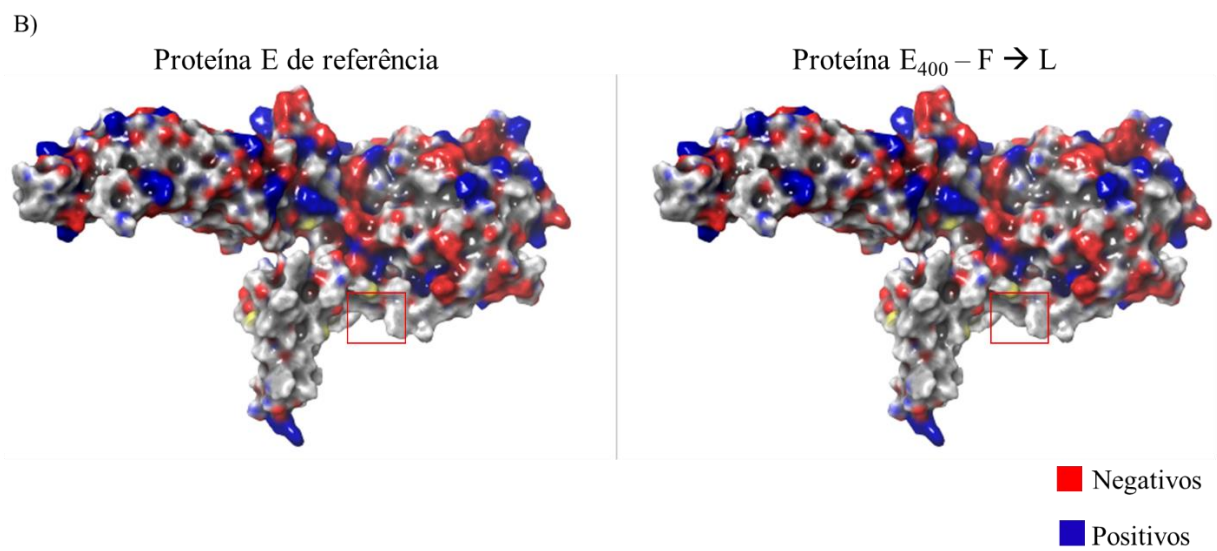
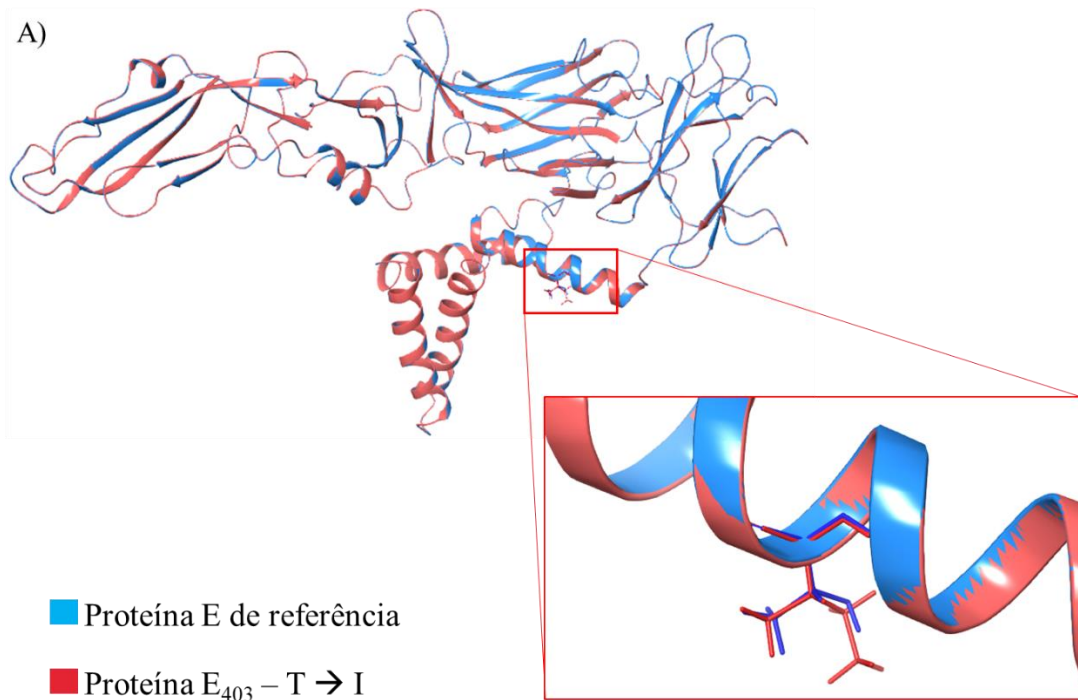


Figura 4.11 - Área ocupada pelo resíduo 400 na estrutura da proteína E de referência e na estrutura da proteína E mutada em E₄₀₀.

A área superficial acessível (SASA) dos aminoácidos fenilalanina e leucina na posição 400 da proteína E de FA foi calculada pelo software USCF Chimera 1.11.2. À direita está representada a estrutura da proteína E de referência e à esquerda, a proteína E mutada.

A mutação E₄₀₃ (T → I) está igualmente situada na α -hélice H1 do domínio de haste-âncora (Figura 4.12). Essa mutação resulta em uma alteração sutil na topologia da superfície molecular e consiste na substituição de um aminoácido polar (T) por um aminoácido hidrofóbico (I). Portanto, a superfície da região onde se localiza o resíduo 403 se torna hidrofóbica (Figura 4.12B). Por outro lado, a carga parcial da superfície não é alterada em consequência da mutação (Figura 4.12C).



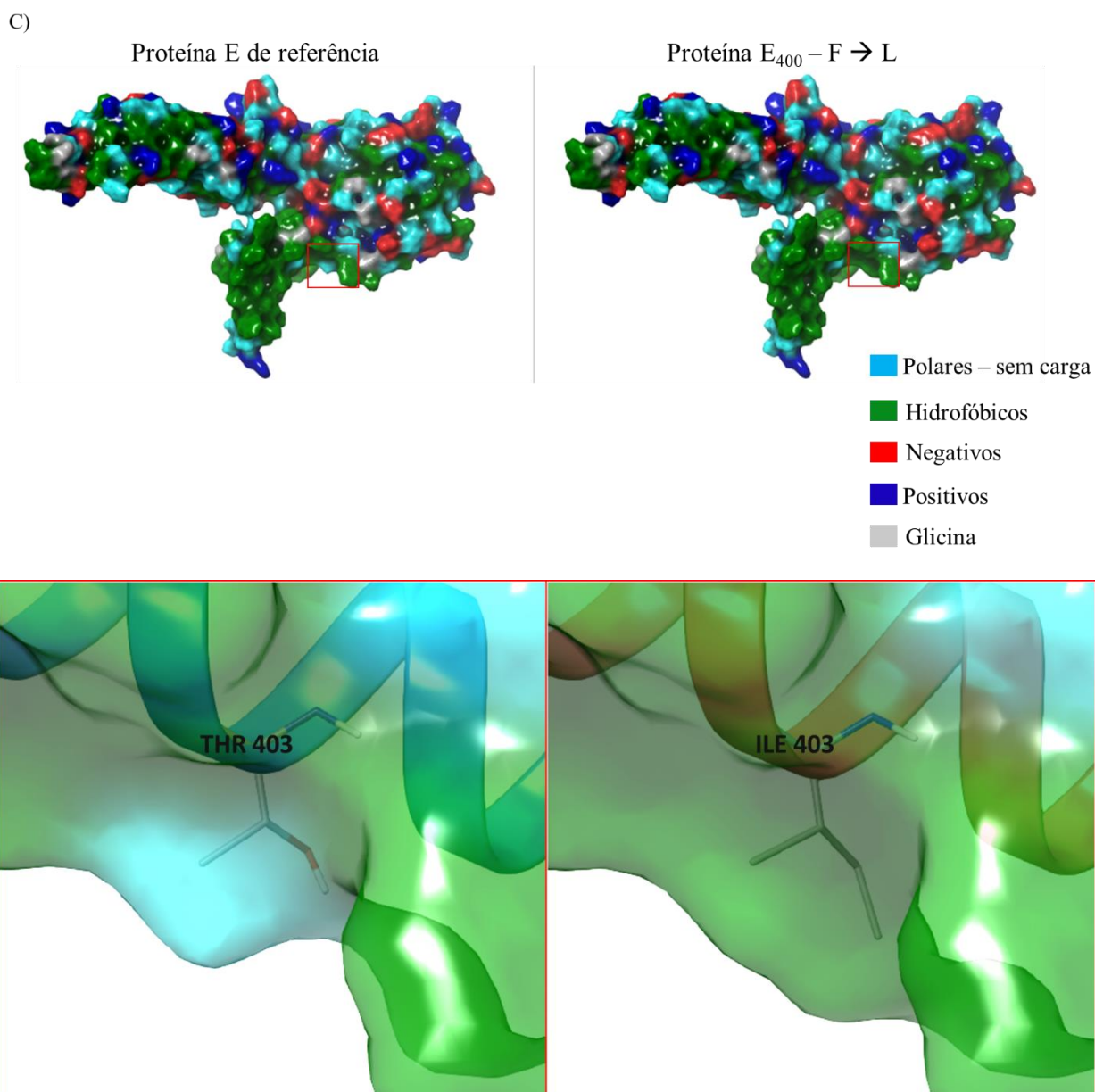
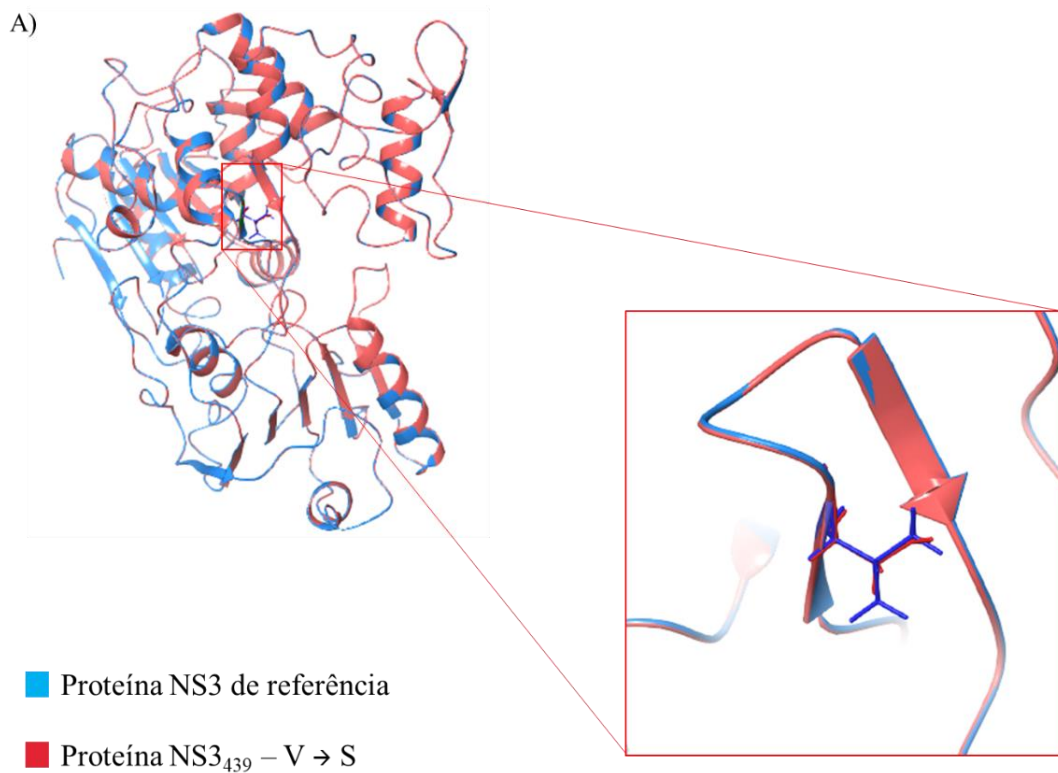


Figura 4.12 - Localização da mutação em E₄₀₃ e comparação das superfícies moleculares.
 A) Alinhamento das estruturas tridimensionais da proteína E mutada em vermelho e de referência, em azul. Em destaque, o resíduo E₄₀₃ das duas estruturas. B) Superfície molecular colorida segundo as cargas dos aminoácidos. C) Superfície molecular colorida segundo as propriedades físico-químicas dos aminoácidos.

A mutação em E₄₀₃ não altera a formação de estruturas secundárias da proteína E em relação à proteína original. A mudança induzida por esta mutação na estrutura tridimensional se restringiu ao aumento de hidrofobicidade na superfície molecular da região da α -hélice H1. A mutação em E₄₀₀ alterou a topologia e a carga parcial da superfície molecular na região da α -hélice H1. As mutações na proteína E, por não se localizarem em regiões de interação entre os monômeros de proteína E na conformação na qual a modelagem molecular foi realizada, não interferem em nenhuma ligação entre aminoácidos ou ligações de hidrogênio na região.

Entretanto, pode-se especular que esses resíduos interfiram na interação da proteína com a membrana lipídica viral ou com outros aminoácidos nas demais conformações que a proteína E pode assumir durante o ciclo viral.

A mutação NS3₄₃₉ (V → S) está localizada no domínio II da porção helicase da proteína NS3 (Figura 4.13). Os resíduos que se ligam ao RNA do domínio helicase da proteína NS3 foram mapeados por Luo *et al.* no vírus da dengue do sorotipo 4 (143). O aminoácido na posição 439 faz parte de uma estrutura de grampo β -hairpin formada pela interação entre os radicais de aminoácidos de duas folhas β antiparalelas. Essa estrutura foi mapeada como o motivo funcional de separação de dupla fita de ácidos ribonucleicos (143). A interface de interação entre a proteína NS3 e o RNA viral foi demarcada na Figura 4.13B.



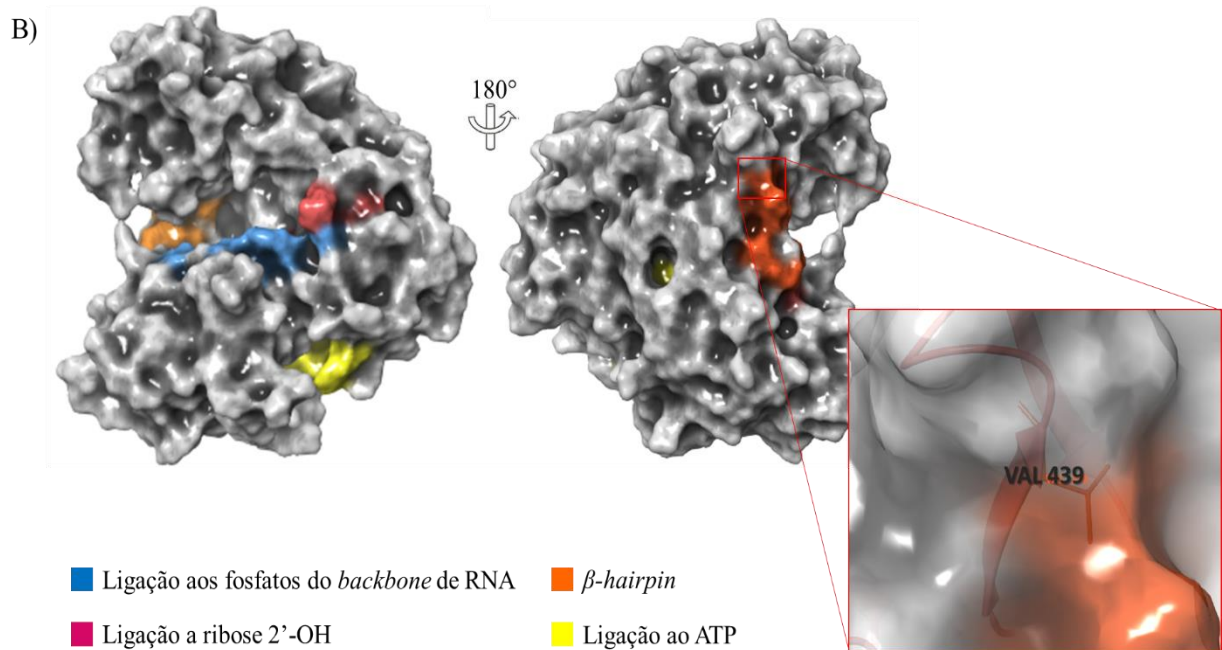
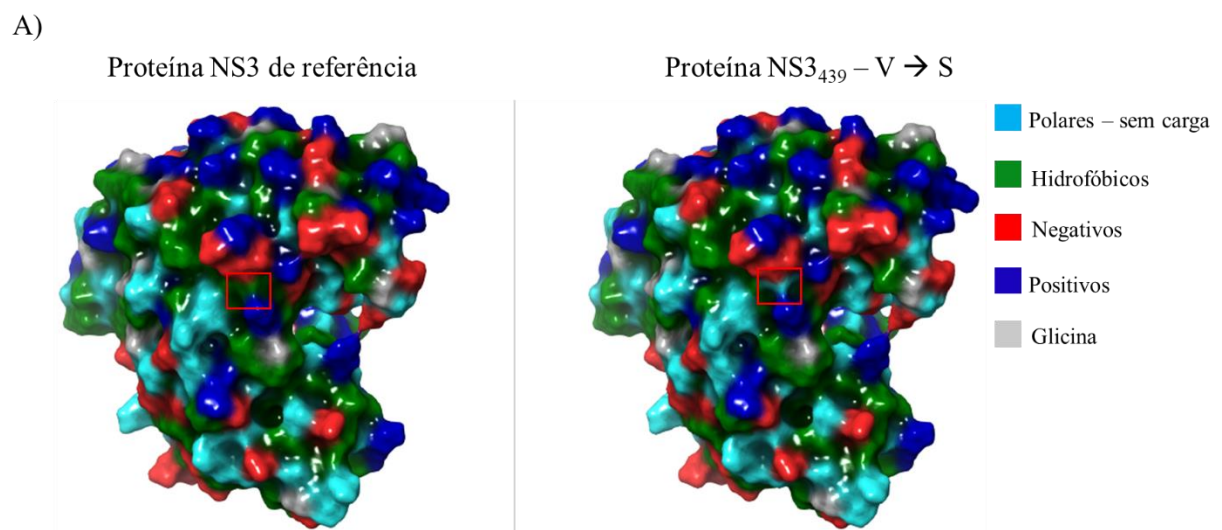
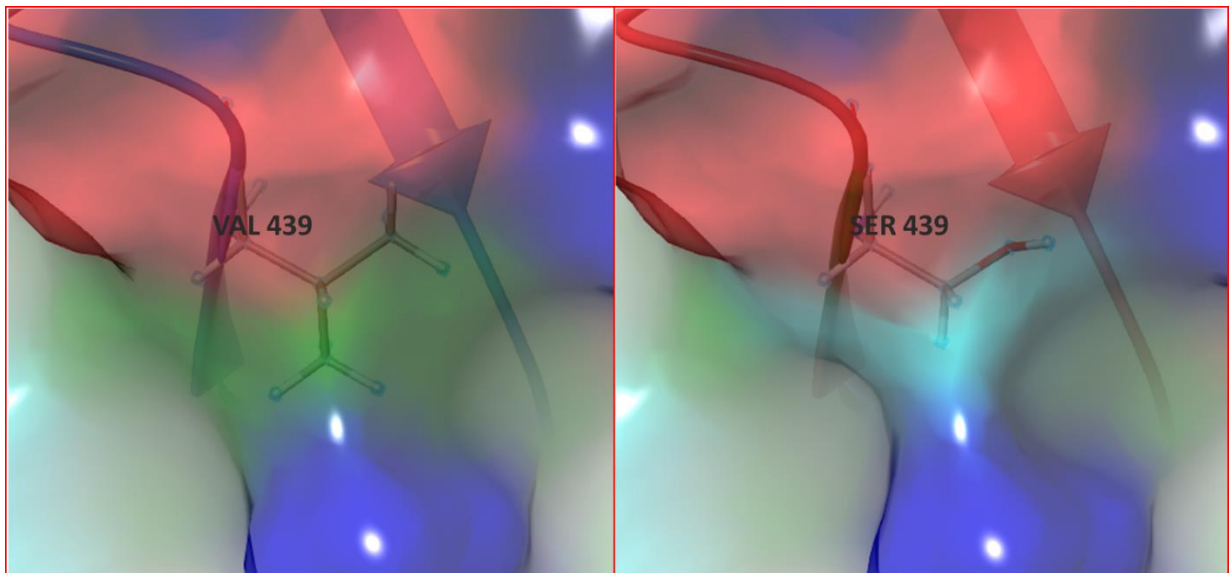


Figura 4.13 - Localização da mutação em NS3₄₃₉.

A) Alinhamento das estruturas tridimensionais da proteína NS3 mutada em vermelho e de referência, em azul. Em destaque, o resíduo NS3₄₃₉ das duas estruturas. B) Superfície molecular do domínio helicase da proteína NS3 do vírus FA, com a interface de interação com RNA colorida segundo o ligante, baseada nos dados de Luo *et al.* **EMBO Journal**, 2008 (143). O resíduo 439 encontra-se na estrutura de β -hairpin, que tem a função de separar duplas fitas de RNA.

A substituição da valina pela serina na posição 439 acarreta em uma mudança tênue na topologia da superfície molecular proteica. A região do resíduo mutado deixa de ter caráter hidrofóbico e passa a apresentar superfície hidrofílica. A mutação não provoca alterações quanto a carga parcial da superfície molecular na região do resíduo mutado (Figura 4.14).





B)

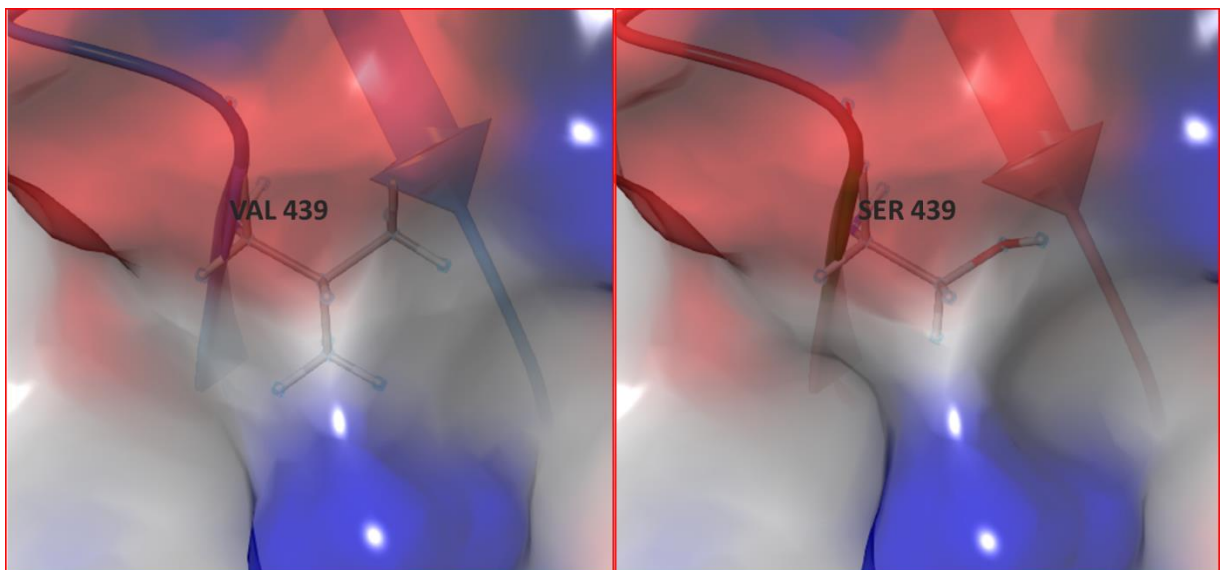
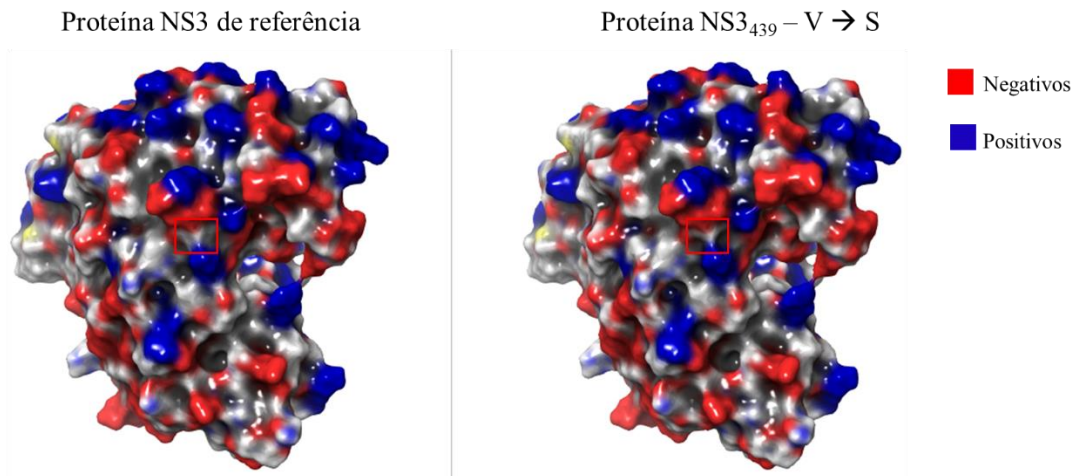


Figura 4.14 - Comparação das superfícies moleculares.

A) Superfície molecular colorida segundo as propriedades físico-químicas dos aminoácidos. B) Superfície molecular colorida segundo as cargas dos aminoácidos.

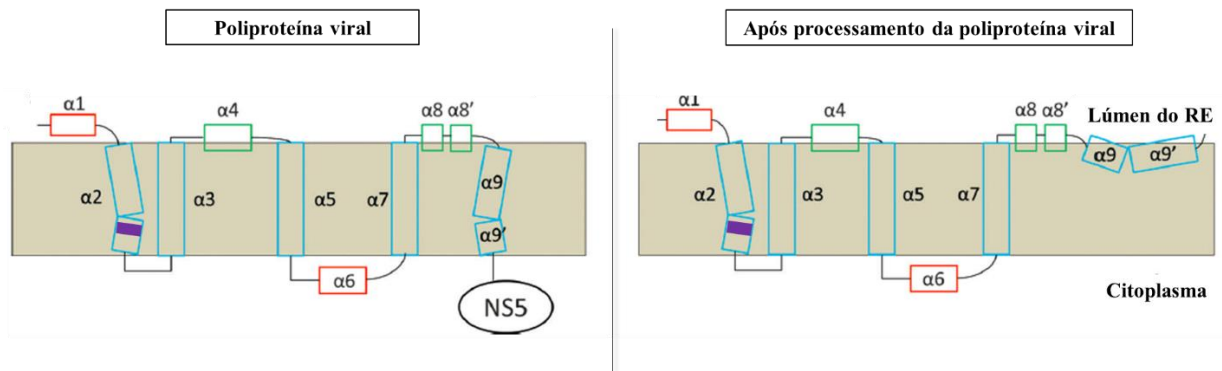


Figura 4.15 – Localização do resíduo 54 da NS4B do vírus FA.

Na parte superior, a sequência da proteína NS4B do vírus FA. Os retângulos correspondem a predição de estrutura de α -hélices e topologia da parte inferior da figura. Na parte inferior, topologia da proteína NS4B na membrana do RE, determinada por Li *et al.* **Angewandte Chemie**, 2016 (144). A seta lilás (na parte superior da figura) e os retângulos lilás (na parte inferior da figura) localizam a posição do resíduo mutado 54.

5. Discussão

O vírus FA gerado por genética reversa, o G1.2/T3, se mostrou viável, com capacidade replicativa viral e imunogenicidade semelhantes ao vírus FA atenuado 17DD, conforme foi verificado experimentalmente. No entanto, a inserção do cassete de expressão gênica entre os genes codificadores E e NS1, gerando o vírus FA II-GFP, leva a uma redução na proliferação viral e à atenuação em modelo animal.

Esses resultados corroboram com o que foi descrito na literatura para vírus FA 17D recombinantes. A inserção de uma sequência gênica heteróloga no genoma viral diminui a capacidade proliferativa e imunogenicidade viral (92-95, 101, 105, 145-147). Entretanto, nas diferentes estratégias de expressão, há imunogenicidade direcionada para os epítomos de interesse e, em alguns casos, a imunização de animais conferiu proteção contra o desafio em doses letais do agente patogênico causador da doença (100, 103). A atenuação viral pode ser atribuída a interferências no ciclo replicativo viral, induzindo à diminuição da viabilidade viral, provocadas pela inserção heteróloga (145). Uma das estratégias propostas para aumentar a imunogenicidade de vírus FA 17D recombinantes é a introdução de mutações específicas que modulem a proliferação viral, possivelmente aumentando a biodisponibilidade do antígeno viral em modelos animais, estimulando a resposta imune (67).

No intuito de promover um aumento na proliferação e na imunogenicidade dos vírus recombinantes para inserções heterólogas de modo semelhante aos vírus FA vacinais, um painel de alterações genômicas foi testado. Essas alterações foram descritas por induzirem maior capacidade replicativa e virulência em outros flavivírus (107, 108, 148). As mutações correspondem aos resíduos E₄₀₀ (F → L), E₄₀₃ (T → I), NS₃₄₃₉ (V → S) e NS_{4B54} (L → F) no genoma do vírus da FA 17D.

As mutações em E e NS3 foram descritas no vírus da dengue, do sorotipo 1 (DENV1). Essas mutações foram testadas quanto à sua capacidade replicativa em cultura de células Huh7.5 e C6/36, e em camundongos suíços e induziram aumento de proliferação viral em ambos os sistemas. Além disso, a indução de genes de imunidade também foi aumentada após a inoculação dos animais com os diferentes DENV1 mutantes, principalmente no caso de vírus duplo mutantes em E e NS3 (107). A mutação em NS4B foi caracterizada em duas cepas independentes do vírus da dengue, do sorotipo 2 (DENV2). O aumento na proliferação viral decorrente desta mutação foi determinado em cultura de células de mamífero (Vero e BHK-21) e de mosquito (C6/36), e em camundongos imunocomprometidos AG129. O aumento de proliferação viral foi observado em células de mamífero, com diferenças significativas, enquanto que em células de mosquito, nenhum efeito sobre a proliferação foi observado (108).

Neste trabalho, o efeito das mutações foi estudado inicialmente quanto à proliferação viral em culturas de células de mamíferos (Vero e Huh7) e de mosquito (C6/36). As linhagens celulares utilizadas no estudo de proliferação viral foram escolhidas de acordo com sua susceptibilidade à infecção pelo vírus da febre amarela.

As células Vero são originárias de rim de macaco verde africano e são suscetíveis à infecção por arbovírus, amplamente utilizadas para estudos de isolamento e ensaios de placas (149). Células Vero são hipodiplóides e se proliferam de maneira não tumorigênica, podendo ser cultivadas para produção de massa viral gerando menos contaminantes de debris celulares, sendo assim utilizadas para produção de vacinas (149). Além disso, as células dessa linhagem têm em homozigose, uma deleção no cromossomo 12 que as torna incapazes de produzir interferon α e β 1, do cluster de interferon I (IFN I) que tem função antiviral (150). Essa deleção as torna suscetíveis a diversos agentes patogênicos, entre eles, o vírus da FA. Portanto, todos os procedimentos de obtenção de vírus FA pela tecnologia de clone infeccioso e estabelecimento dos estoques virais de trabalho foram realizados a partir de infecção em cultura de células Vero.

A linhagem de células C6/36 foi estabelecida de homogenato de larvas de mosquito *Aedes albopictus*, um dos vetores de transmissão do vírus FA. Células de invertebrados infectadas com arbovírus apresentam atividade antiviral através de RNAi e das vias de sinalização Toll, JAK/STAT e Imd/Jnk. A permissividade das células C6/36 aos arbovírus é devido à ausência de siRNA típicos da imunidade mediada por RNAi (151). De uma maneira geral, células C6/36 são suscetíveis aos flavivírus no sistema de infecção *in vitro*.

As células Huh7 foram isoladas de hepatocarcinoma humano, sendo assim, provenientes de um tecido pelo qual o vírus da febre amarela tem tropismo durante a disseminação em hospedeiros humanos (7). As principais características da Huh7 é que as células se proliferam de maneira tumorigênica e possuem uma mutação no gene que codifica para a proteína HFE que está associada à hemocromatose hereditária (152). Esta proteína sinaliza para a hepcidina que funciona como um sensor, regulando a homeostase do ferro (153). As células Huh7 produzem citocinas e IFN- α de maneira constitutiva (154), ao contrário das células Vero. Portanto, a atividade antiviral do IFN- α em Huh7 pode dificultar a proliferação *in vitro*, acentuando as diferenças na capacidade replicativa dos vírus recombinantes em relação aos controles, o que é constatado neste trabalho, onde estas células apresentaram menores taxas de infecção em comparação com as outras linhagens celulares, induzindo títulos virais mais baixos.

A comparação dos perfis de proliferação viral nestes três sistemas celulares, indica que o padrão de crescimento em células Vero e C6/36 difere do padrão de crescimento em células Huh7. Nas duas células mais suscetíveis à infecção pelo vírus FA, os vírus controles e

recombinantes apresentaram uma proliferação maior, atingindo títulos virais em torno de 10^6 PFU/mL entre 72 e 96 horas pós infecção, enquanto que na linhagem Huh7, o crescimento dos vírus atinge títulos máximos de 10^5 PFU/mL nestes mesmos tempos pós infecção. Além disso, observou-se um aumento de títulos virais no tempo de 120 horas pós infecção em células Huh7 dos vírus FA carreando uma única mutação. O fato de essas células serem menos suscetíveis poderia selecionar alterações genômicas no vírus recombinante, como a perda total ou parcial da inserção heteróloga. Entretanto, todos os vírus que apresentaram um segundo pico de crescimento viral em células Huh7 mantiveram intactas as inserções de EGFP (Figura 4.3).

O desenho experimental do ensaio de proliferação viral *in vitro* consiste em um sistema de cultivo celular fechado, no qual não há troca de meio nem passagem de células para manutenção das mesmas em estágio de crescimento exponencial. Portanto, em 120 horas pós infecção, os nutrientes do meio de cultura estão saturados e as células morreram por inibição por contato e falta de nutrientes. Neste momento, a replicação viral já está prejudicada por falta de células hospedeiras viáveis. Nos gráficos de proliferação viral, o padrão de crescimento exponencial já não se mantém após o pico de proliferação viral, a partir de 96 horas de infecção em todas as linhagens celulares (Figura 4.1). Portanto, o aumento da concentração de partículas virais nos sobrenadantes das culturas de Huh7 infectadas com os vírus FA carreando uma mutação pode não ter relevância na avaliação da capacidade proliferativa dos vírus FA.

A caracterização da infecção em diferentes tipos celulares refina a associação entre as diferenças genômicas e a proliferação dos vírus em estudo. Os resultados mostram diferenças de proliferação de vírus FA II-GFP mutantes em relação aos controles que se mantêm em células de mamífero (Vero e Huh7), e têm o perfil oposto em células de mosquito (C6/36). Especificamente, os mutantes que carregam a mutação em E₄₀₀ apresentam redução de títulos virais em comparação com o vírus FA controle II-GFP em células Vero e Huh7, principalmente o duplo mutante FA II-GFP/E₄₀₀/NS3₄₃₉. Em células de mosquito, C6/36, esses mutantes apresentaram aumento de proliferação viral nos tempos iniciais pós infecção (até 48 horas) em comparação ao vírus FA original II-GFP.

De maneira geral, as mutações introduzidas não aumentaram significativamente a capacidade de proliferação em células de mamífero. Inclusive, as mutações introduzidas na proteína E apresentaram um efeito negativo na infecção viral nestas células. O vírus FA II-GFP carreando a mutação E₄₀₀ (F → L), apresentou uma tendência de menor proliferação viral e o que carrega a mutação E₄₀₃ (T → I) não gerou partículas virais nestas células após a transfecção do RNA viral em células Vero. Considerando as menores taxas de proliferação dos mutantes duplos e triplo que carregam a mutação em E₄₀₀ nessas células, podemos afirmar que as duas alterações

na proteína E impactam negativamente na replicação viral quando comparadas com as outras alterações.

Além disso, os resultados de proliferação sugerem que a mutação na proteína E favoreceu a proliferação viral em células de mosquito e não nas células de mamífero. Essa divergência pode ser devida às alterações nas interações da região onde se localizam as mutações e às características dos compartimentos celulares nos quais essa proteína influencia na proliferação viral.

A proteína E é o componente viral que medeia a interação inicial com a célula hospedeira e a internalização do nucleocapsídeo no citoplasma. Essa proteína assume diferentes conformações ao longo do ciclo replicativo (113, 155). A partícula viral infectiva é envelopada por homodímeros da proteína E, na qual o ectodomínio está posicionado sobre a membrana viral, ancorado pelas α -hélices TM1 e TM2 do domínio haste-âncora. Neste momento, a α -hélice H1, que é a região de interesse onde estão localizadas as mutações em E₄₀₀ e E₄₀₃, encontra-se parcialmente inserida na camada externa da membrana (116). Após a endocitose da partícula viral infectiva, a proteína E sofre mudanças conformacionais ao longo da maturação da vesícula endossomal durante o transporte no interior da célula, onde desempenha a fusão entre as membranas viral e citoplasmática (156).

A proteína E compõe o envelope viral, portanto, sua disposição sobre a membrana lipídica viral durante a montagem do vírus é essencial para a formação de partículas virais viáveis. A montagem viral no retículo endoplasmático resulta em uma partícula viral imatura, na qual a proteína E está sob forma dimérica, complexada com a proteína prM. Além disso, os heterodímeros prM:E formam trímeros para compor o envelope viral da partícula imatura (113). Nesta conformação, a α -hélice H1 está parcialmente inserida na membrana viral e determina a curvatura da membrana do vírus (157), além de estabilizar a conformação do arranjo heterodimérico prM:E (158). Durante o transporte da partícula viral pela rede trans do Golgi, a clivagem da prM promove a reorganização da proteína E em homodímeros, como é encontrada na partícula viral infectiva (132, 133). Essas mudanças conformacionais são majoritariamente desempenhadas pelas interações entre a α -hélice H1 e o ectodomínio da proteína E (60, 117).

Os resíduos da proteína E que foram mutados são resíduos próximos na sequência de aminoácidos e são conservados entre os flavivírus (Figura 4.9). A mutação em E₄₀₃, que consistiu em uma substituição não conservativa de um aminoácido hidrofóbico por um aminoácido polar. Esta substituição acarretou em um impedimento da recuperação de partículas virais viáveis. A mutação em E₄₀₀ representou uma substituição conservativa, e foi possível regenerar partículas virais infectivas. Os efeitos na proliferação viral consistiram na diminuição de proliferação em células de mamífero e no aumento de proliferação em células C6/36.

As regiões de interação da proteína E nos diferentes estados conformacionais foram mapeadas no vírus da encefalite transmitida por carrapatos (*tick-borne encephalitis virus* – TBEV) (117). Neste estudo foram realizadas mutações pontuais para identificar os sítios de interação no estado fusogênico da proteína E. Entre os resíduos mutados, estão os correspondentes aos resíduos 400 e 403 no genoma do vírus da febre amarela. A mutação 403 (T → I) no genoma de TBEV reduziu a eficiência da clivagem da prM, impactando na recuperação de partículas virais maduras. Quanto à mutação em E₄₀₀, os autores identificaram o *pocket* hidrofóbico formado por resíduos do domínio II que interagem com o resíduo de fenilalanina na posição 400 para iniciar a reação de *zippering*. Algumas interfaces de interação determinadas pelo estudo estão evidenciadas na figura 1.2A.

Os resíduos da α -hélice H1 mutados não interagem com outros resíduos na conformação na qual a proteína E se encontra na partícula viral infectiva. Esses resíduos têm a cadeia lateral voltada para a face externa da membrana lipídica viral, interagindo com a mesma. O mesmo tipo de interação é esperado na partícula viral imatura. A disposição da proteína E na partícula viral madura e imatura determina a curvatura da membrana viral (157).

A mutação em E₄₀₃ alterou a hidrofobicidade da superfície na região da α -hélice H1, o que pode ter acarretado em uma interação menor com a camada externa da membrana viral. Dessa forma, a α -hélice pode estar mais afastada da membrana, alterando a sua curvatura (157). Como consequência, a disposição da proteína prM no heterodímero após a montagem viral poderia estar desfavorável à clivagem pela furina durante o transporte vesicular pela rede trans do Golgi. Nesse caso, partículas virais incorretamente processadas e imaturas seriam exocitadas no meio extracelular, sem capacidade infectiva. Essa hipótese corrobora com o resultado obtido por Pangerl *et al.* quando testaram essa mesma troca de aminoácidos no genoma de TBEV e obtiveram secreção de partículas virais, porém clivagem reduzida da prM durante a maturação (117). Alternativamente, a curvatura da membrana na partícula viral madura, após a clivagem correta da prM, diminuiria a exposição das regiões de interação com os receptores da membrana plasmática do hospedeiro durante a adsorção viral. Assim, a internalização das partículas virais seria reduzida, diminuindo consideravelmente a dispersão viral no hospedeiro.

A mutação em E₄₀₀ não impede a replicação e recuperação de partículas virais infectivas pela metodologia do clone infeccioso. A substituição de um resíduo de fenilalanina por um de leucina não altera a propriedade hidrofóbica da região. A manutenção da hidrofobicidade do resíduo 400 é importante, pois este é abrigado pelo *pocket* hidrofóbico formado pelos resíduos de triptofano (posição 209) e de leucina (posição 213) do domínio II (116, 117). A partir dessa interação, a reação de *zippering* do domínio haste com o domínio II vai iniciar e estabilizar o trímero da proteína E, facilitando a fusão das membranas viral e celular. Como a cadeia lateral

da leucina ocupa uma menor área que a da fenilalanina na superfície molecular da proteína (Figura 4.11), a interação com os resíduos 209 e 213 poderia ser mais estreita, diminuindo o volume do *pocket* hidrofóbico. Esse estreitamento poderia estabilizar o trímero de proteína E, facilitando a fusão das membranas viral e endossomal e a internalização do RNA viral.

A alteração na carga parcial da superfície molecular exposta na região da mutação em E₄₀₀ (F → L) pode afetar na fusão das membranas viral e do hospedeiro. A diminuição do pH altera as cargas do domínio haste-âncora, podendo impactar na interação desta região com a membrana viral. A exposição do grupo carbonila do aminoácido na posição 396 poderia modificar a sincronia do processo de fusão em meio endossomal ácido. Portanto, sugere-se que essa mudança induzida pela mutação pode ter acelerado a formação do estado fusogênico da proteína E.

A fusão de membranas mediada pela proteína E e a internalização do nucleocapsídeo viral foram demonstradas ser dependentes do pH vesicular, assim como da composição lipídica da membrana do endossomo (159). O pH dos endossomos prematuros varia entre 6,8 e 6,1 e dos endossomos tardios, entre 6,0 e 4,8 (160). O pH ótimo para fusão induzida por flavivírus varia entre 5,0 e 6,5 (161), e especificamente para o vírus da febre amarela, pH de 5,5 (162). Ao longo da maturação de endossomos precoces para endossomos tardios, a composição lipídica da membrana luminal altera, aumentando a quantidade de fosfatidilserina. O aumento de cálcio intracelular, decorrente da resposta à infecção viral, ativa transportadores de fosfolipídios que translocam fosfatidilserina para a membrana luminal do endossomo. Os flavivírus interagem em alta afinidade com esse fosfolipídio, que funciona como sinal para a liberação do nucleocapsídeo e do RNA viral no citoplasma, e como um fator para mediar a fusão da membrana endossomal com a membrana viral. Essa alteração da composição lipídica da membrana endossomal é dependente de cálcio liberado no citosol em células de mamífero (162, 163).

A membrana luminal do endossomo de células C6/36 já possui a composição necessária para sinalizar a fusão (162, 163). Para o vírus da dengue, a fusão acontece no endossomo prematuro em células de mosquito e em células de mamífero, na transição entre endossomo prematuro e tardio (114).

Considerando as alterações provocadas pela mutação em E₄₀₀ (F → L), nas quais a conformação fusogênica da proteína se tornaria mais favorável, o panorama para a fusão se encontraria completo já na vesícula endossomal precoce/intermediária em células de mosquito, aumentando o índice de internalização de nucleocapsídeos virais. Por outro lado, como a fusão e a liberação do RNA viral são eventos distintos, a conformação fusogênica da proteína na ausência da fosfatidilserina pode afetar a eficiência da infecção viral em células de mamífero (162). Portanto, em células de mamífero, atingir a conformação trimérica antes do convencional é

desfavorável, uma vez que a composição da membrana endossomal não seria ideal para a fusão, com baixo teor de fosfatidilserina (162).

Assim, a infecção pelos vírus com a mutação E₄₀₀ (F → L) não teria a mesma eficiência que a infecção pelo vírus II-GFP original em células de mamífero, como observado nos resultados da curva de proliferação em células Vero e Huh7. Por outro lado, a composição da membrana do endossomo prematuro de células de mosquito possui maior teor de fosfatidilserina, sendo apropriada para a fusão (163) e a antecipação deste processo poderia aumentar a eficiência da infecção viral, como foi demonstrado nas curvas de proliferação em células C6/36.

As mutações em E₄₀₀ e E₄₀₃ foram descritas como viáveis e, em conjunto com outras mutações na proteína NS3, proporcionaram aumento de proliferação viral do DENV1 em células de mamífero e de mosquitos (107). As diferenças entre os efeitos de proliferação viral entre os vírus carregando as mutações nas proteínas E de DENV1 e do vírus FA 17D podem ser ocasionadas pela composição de resíduos em torno dos resíduos mutados. As propriedades dos aminoácidos no entorno dos resíduos 400 e 403 são diferentes entre um flavivírus e o outro. No DENV1, a região N-terminal da H1 próximos aos resíduos 402 e 405 são hidrofóbicos, com exceção do resíduo 404 que se constitui de um aminoácido ácido. Enquanto que a mesma região no vírus da FA é composta principalmente por aminoácidos polares e não carregados. Portanto, as interações dessa região com a membrana viral diferem entre um flavivírus e outro, provocando efeitos opostos ao inserir as mutações E₄₀₀ (F → L) e E₄₀₃ (T → I).

As mutações nas proteínas não estruturais não induziram mudanças significativas na proliferação viral em nenhum dos tipos celulares estudados. A mutação na proteína NS3 está localizada no domínio com função helicase (Figura 4.13), em uma estrutura de *β-hairpin* que atua como separador de hélices (143). Essa função é essencial para a eficiência da replicação do genoma viral.

As cadeias laterais dos resíduos do *β-hairpin* não interagem entre si, mas interagem com o RNA viral (143). A carga parcial da superfície molecular não é alterada em consequência da mutação V → S na posição 439, porém a superfície molecular passa a ter propriedade hidrofílica na região da mutação (Figura 4.14). Essa mudança poderia influenciar na quebra das ligações de hidrogênio entre as bases de ácido ribonucleico.

A proteína NS3 sofre alterações quaternárias na estrutura conforme exerce a atividade helicase. A translocação do RNA induz à mudanças conformacionais que resultam no aumento do túnel de ligação ao RNA e diminuição da cavidade de ligação ao ATP (143). O aumento da atividade de ATPase foi demonstrada previamente para a mutação na posição correspondente no DENV1, onde há troca de um resíduo de leucina por serina (148). A propriedade dos aminoácidos

originais dos vírus DENV1 e FA é a mesma, portanto a substituição pelo resíduo polar de serina poderia induzir efeitos similares.

Entretanto, este efeito não é observado no vírus da FA II-GFP. O estudo em DENV1 mostrou que o aumento de proliferação viral mediado pela mutação NS3₄₃₉ ocorre quando o mesmo vírus carrega a mutação em E₄₀₃. O vírus FA II-GFP duplo mutante E₄₀₃/NS3₄₃₉ não foi viável devido à alteração na proteína E₄₀₃.

Ainda, uma outra mutação no domínio helicase da proteína NS3 (NS3₄₈₀) foi descrita neste estudo e consistiu na substituição de um aminoácido de leucina por um de serina (107). Embora as duas mutações na proteína NS3 estivessem relacionadas ao aumento da neurovirulência em camundongos *Swiss* neonatos, a taxa de proliferação de vírus carregando apenas uma ou outra mutação não induziu aumento significativo em comparação ao vírus original em culturas de células Huh7 ou C6/36. Esses resultados corroboram com o que foi observado no genoma do vírus FA II-GFP. Posteriormente, a mutação única em NS3₄₃₉ no genoma de DENV1 induziu aumento de proliferação viral em células dendríticas derivadas de monócitos (148).

No trabalho de Borba *et al.*, os vírus que carregavam duas mutações em E₄₀₂/NS3₄₈₀ induziram aumento significativo de proliferação viral tanto em células de mamífero quanto em células de mosquito (107). Considerando o fato de que o resíduo NS3₄₈₀ correspondente no genoma do vírus da FA já é uma serina, o duplo mutante E₄₀₂/NS3₄₈₀ deveria corresponder ao vírus FA II-GFP/E₄₀₀. Entretanto, o mesmo efeito de aumento de proliferação viral não foi observado no vírus FA II-GFP. Esse resultado indica que esta mutação na proteína E modula significativamente a proliferação viral no genoma do vírus FA.

A mutação na proteína NS4B está localizada na α -hélice 2, que foi predita como a primeira hélice transmembrana da proteína. O resíduo se encontra na proximidade de um resíduo de prolina, onde a estrutura de α -hélice é quebrada (144) (Figura 4.15). A substituição de aminoácidos na posição 54 (L \rightarrow F) mantém a propriedade hidrofóbica da cadeia lateral na região. A topologia da proteína NS4B foi determinada recentemente, e as regiões de interação com outras proteínas virais foram mapeadas (144). O resíduo de fenilalanina ocupa maior volume que o de leucina e pode alterar o ângulo da quebra da α -hélice 2. A mutação pode ter alterado a função de remodelagem da membrana do RE exercida pela proteína NS4B em conjunto com a proteína NS4A (124, 164).

A mutação NS4B₅₂ no genoma do DENV2 induziu aumento de proliferação viral em células de mamífero, e não alterou a taxa de proliferação em células de mosquitos. Os autores sugerem que esta alteração esteja relacionada à interação física entre as proteínas NS3 e NS4B (108). No entanto, o efeito de aumento de proliferação viral não foi observado no vírus FA mutante II-GFP/NS4B₅₄ nem no duplo mutante em NS3₄₃₉/NS4B₅₄ em nenhuma das linhagens

celulares testadas. O vírus com mutação única em NS4B₅₄ e o duplo mutante NS3₄₃₉/NS4B₅₄ não produziram efeitos na proliferação viral. Essa mutação interfere na proliferação apenas quando combinada à mutação em E₄₀₀ (Tabelas 4.3 e 4.4). Por outro lado, interferiu na imunogenicidade viral em camundongos C57BL/6 e BALB/c, induzindo menores títulos de anticorpos neutralizantes para o vírus FA 17DD.

As mutações em NS4B₅₄ e NS3₄₃₉ foram viáveis em células de mamífero, e não alteraram as propriedades de proliferação nestes modelos celulares em comparação ao vírus parental FA II-GFP. Porém, essas mutações quando combinadas com a mutação em E₄₀₀, isto é, duplo mutantes II-GFP/E₄₀₀/NS3₄₃₉, II-GFP/E₄₀₀/NS4B₅₄ e triplo mutante II-GFP/E₄₀₀/NS3₄₃₉/NS4B₅₄, apresentaram taxas mais baixas de proliferação viral, indicando um efeito deletério desta mutação. Por outro lado, em células de mosquito, a mutação em E₄₀₀ apresentou um caráter neutro e compensou a redução de proliferação viral induzida pelas mutações nas proteínas não estruturais presentes nos duplos mutantes e no triplo mutante.

A caracterização do efeito das mutações incluiu um estudo da resposta imune humoral em modelo animal. O modelo escolhido para a avaliação da imunogenicidade foi camundongos das linhagens *inbred* BALB/c e C67BL/6. Esses animais, por serem de linhagens *inbred*, geram resultados de resposta imune reprodutíveis, sem necessidade de posterior normalização. Entretanto, o padrão de resposta imune diverge entre linhagens devido à mutações e polimorfismos característicos (165).

Os camundongos das duas linhagens, assim como outros camundongos *inbred*, apresentam uma mutação pontual no gene *Oas1b*, cuja expressão é induzida por interferon durante a infecção viral. A proteína OAS1B ativa uma ribonuclease L latente que degrada RNA viral. Em camundongos *inbred* essa proteína é truncada, conferindo aos animais uma falha na resposta imune inata e consequente susceptibilidade a flavivírus (165). Portanto, tanto camundongos C57/BL-6 quanto BALB/c podem ser utilizados como modelos de estudo para imunização com o vírus FA 17D.

Camundongos BALB/c e C57BL/6 apresentaram resultados levemente diferentes na indução de anticorpos neutralizantes contra o vírus FA. Esse efeito já tinha sido observado na imunização por vírus FA vacinais e recombinantes, onde a diferença de resposta imune humoral foi atribuída a um viés do perfil de resposta T_{H1} em animais da linhagem C57BL/6 (24). Os camundongos BALB/c, por outro lado, apresentam resposta imune predominante de perfil T_{H2} devido à deficiência da citocina IL-12, que atua no estímulo da resposta imune T_{H1} (165). Como a vacina da FA 17D tem como característica, produzir resposta equilibrada entre perfis T_{H1} e T_{H2} (24, 166) a caracterização da imunogenicidade nas duas linhagens de animais é complementar.

Apesar da diferença entre animais BALB/c e C57BL/6, a proporcionalidade entre os títulos de anticorpos neutralizantes dos grupos experimentais de camundongos imunizados com os vírus FA controles e mutantes é comparável entre as duas linhagens de animais (Figura 4.5). Em ambas linhagens, foi determinado que os vírus FA II-GFP/NS₃₄₃₉ e II-GFP/NS_{4B54} induzem a produção de anticorpos neutralizantes contra FA em menores títulos que os controles, enquanto que a mutação do vírus FA II-GFP/E₄₀₀ não provocou efeitos nesse aspecto. Esse resultado retrata o oposto do que foi observado no estudo de proliferação viral em cultura de células de mamífero, onde os vírus com as mutações NS₃₄₃₉ e NS_{4B54} apresentavam uma menor influência nas taxas de proliferação viral que os vírus FA com a mutação em E₄₀₀.

A proliferação em cultivo celular não reflete diretamente na proliferação *in vivo* em modelo murino *inbred*, em função da complexidade de tipos e respostas celulares. As vias de inoculação e o contexto genético dos camundongos em relação à genes de indução de resposta imune inata e adaptativa interferem com a replicação viral *in vivo*. A replicação do vírus FA 17D quando inoculado em camundongos pela via subcutânea, utilizada para a imunização neste trabalho, foi demonstrada diminuída ou quase inexistente (167). Apesar de o vírus FA 17D montar uma resposta humoral e celular pela imunização subcutânea, a resposta celular é menor por causa da baixa dispersão viral e consequente baixa disponibilidade do antígeno para estabelecer uma resposta específica (168).

Os títulos de anticorpos neutralizantes reduzidos em camundongos imunizados com os vírus FA II-GFP/NS₃₄₃₉ e II-GFP/NS_{4B54} podem ser ocasionados por uma menor proliferação viral *in vivo* desses mutantes em relação ao vírus FA II-GFP original. Entretanto, os títulos de anticorpos para GFP não apresentaram diferenças entre os vírus FA mutantes e o controle II-GFP, exceto para um aumento discreto dos títulos no grupo de animais C57BL/6 imunizados com o vírus FA II-GFP/NS₃₄₃₉. Esses resultados podem indicar diferentes efeitos dessas mutações. Entretanto, os títulos de anticorpos neutralizantes para o vírus FA é parte da resposta imune humoral e não prediz os títulos de anticorpos que não são neutralizantes. Nesse caso, os vírus com mutações nas proteínas não estruturais podem induzir a produção de anticorpos com outras finalidades, como por exemplo, estimular o sistema complemento (169). Os títulos de anticorpos neutralizantes também não representam as diferenças em termos de proteção ao vírus FA selvagem ou vacinal, inoculado por outras vias, como por exemplo, por via intracerebral.

A produção de anticorpos neutralizantes também pode ser modulada pela ativação de células B policlonais. A diminuição da ativação de linfócitos B aumenta a produção de anticorpos neutralizantes, sem alterar na resposta por células T CD8⁺ (170). Portanto, as mutações nas proteínas não estruturais podem ter alterado na ativação de linfócitos B policlonais. A proteína NS4B do vírus FA possui epítomos que estimulam a ativação de células B e a produção de

anticorpos contra o vírus FA, sendo um desses uma sequência de peptídeos próxima à região da mutação (171).

As mutações não impactam fortemente na indução de resposta imune humoral. A produção de anticorpos neutralizantes para o vírus FA 17DD e de anticorpos para GFP indicam que os vírus foram capazes de estimular o sistema imune dos camundongos imunizados. Além disso, os vírus FA mutados pareceram estabilizar a resposta humoral para a inserção do gene de EGFP, uma vez que nem todos os camundongos imunizados com o vírus FA II-GFP original soroconverteram, ao contrário dos animais imunizados com os vírus FA II-GFP mutados. No entanto, estes estudos ainda são preliminares e não refletem o potencial vacinal destes vírus, pois não temos um modelo de desafio que possa revelar a eficácia vacinal.

A partir dos resultados deste trabalho, pode-se concluir que as mutações E₄₀₀ (F → L), E₄₀₃ (T → I), NS3₄₃₉ (V → S) e NS4B₅₄ (L → F) influenciaram, em parte, na proliferação viral e na imunogenicidade em camundongos.

5.1 Considerações finais

A inserção de mutações no vírus FA recombinante II-GFP teve como objetivo de modular a proliferação viral *in vitro* e a imunogenicidade em modelo murino. A caracterização dos vírus FA II-GFP mutados gerou resultados de cinética de proliferação viral, indução de anticorpos neutralizantes para o vírus FA 17DD e anticorpos para GFP, e finalmente, a modelagem molecular das proteínas virais estudadas.

À luz dos resultados, podemos concluir que as mutações E₄₀₀ (F → L), NS3₄₃₉ (V → S) e NS4B₅₄ (L → F) no vírus FA II-GFP não provocam impactos drásticos em nenhum dos aspectos estudados. Por outro lado, a mutação E₄₀₃ (T → I) prejudica na regeneração de partículas virais.

A análise do conjunto de resultados indica que a mutação que modulou mais a proliferação viral foi a E₄₀₀ com diminuição de proliferação em células de mamífero, e aumento em células de mosquito. Porém, esta mutação não reduziu a produção de anticorpos neutralizantes para o vírus FA 17DD, muito menos a produção de anticorpos para GFP.

6. Conclusões

- As mutações E₄₀₀ (F → L), NS₃₄₃₉ (V → S) e NS_{4B54} (L → F) foram permitidas no vírus FA II-GFP.
- A mutação em E₄₀₃ (T → I) tem impacto deletério na regeneração de partículas virais, sugerindo que a região tem papel importante nas interações da proteína E.
- Os vírus carreando a mutação em E₄₀₀ apresentam taxa de proliferação reduzida nas culturas de células de mamífero utilizadas (Vero e Huh7), porém aumentam essa taxa em células de mosquito C6/36.
- Os vírus carreando mutações nas proteínas não estruturais não influenciaram na cinética de proliferação viral em cultura de células, porém reduziram a indução de anticorpos neutralizantes para o vírus FA 17DD.
- A indução de anticorpos neutralizantes para o vírus FA 17DD foi reduzida em animais imunizados com os vírus FA II-GFP/NS₃₄₃₉ e II-GFP/NS_{4B54}, mas não nos animais imunizados com o vírus FA II-GFP/E₄₀₀.
- Todos os vírus mutantes foram capazes de induzir anticorpos específicos para GFP. O efeito das mutações na indução de anticorpos para GFP não foi drástico, entretanto, os grupos de animais imunizados com os vírus FA mutantes apresentaram maior taxa de soroconversão que os grupos imunizados com o vírus II-GFP original.
- Em conjunto, os resultados mostram que a mutação em E₄₀₀ apresentou o maior efeito na modulação da proliferação viral. Além disso, o vírus II-GFP/E₄₀₀ apresentou títulos de anticorpos neutralizantes para FA 17DD e específicos para GFP, comparáveis ao vírus II-GFP original. Finalmente, esse vírus pode representar um aprimoramento da plataforma vacinal II-GFP no sentido de aumentar da taxa de soroconversão para anticorpos específicos à GFP.

7. Perspectivas

- A avaliação das mutações que não inviabilizaram a regeneração de partículas virais pode ser complementada com um estudo comparativo entre quantificação de partículas virais infectivas e cópias genômicas de RNA. Essa comparação permitiria a obtenção de uma razão entre partículas virais com capacidade infectiva e partículas virais inativas, demonstrando o impacto das mutações na produção de partículas viáveis em relação à replicação do genoma viral. Nesse caso, os inóculos preparados para a infecção em células Vero seriam quantificados quanto ao número de cópias genômicas por RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) e após 48 horas de infecção, a carga viral presente no sobrenadante celular seria medida pela mesma metodologia. A quantificação de cópias genômicas de RNA viral pode ser comparada com a quantificação em PFU/mL obtida no mesmo tempo pós infecção.
- O acompanhamento da transfecção do recombinante FA II-GFP/E₄₀₃ pode ser aprofundado com estudos mais sensíveis de detecção para replicação viral. As células Vero transfectadas com massa de RNA viral mutante determinada seriam mantidas até o aparecimento de efeito citopático induzido por vírus, como a metodologia empregada no estudo. No entanto, a cada passagem celular de manutenção, parte das células seriam coletadas e marcadas com anticorpo para proteína E. As células marcadas seriam quantificadas por citometria de fluxo. Simultaneamente, o sobrenadante e outra parte das células seriam coletados nas passagens celulares, e o RNA viral presente nessas amostras seria extraído e analisado por RT-PCR. A reação de RT-PCR seria planejada para a detecção da fita negativa de RNA, indicativa de replicação do genoma viral.
- O estudo estrutural das mutações nas proteínas E e NS3 pode ser enriquecido com a análise de dinâmica molecular. Através dos dados de dinâmica molecular poderiam ser definidos os movimentos dos átomos das moléculas modeladas, e uma comparação entre as proteínas originais e mutadas poderia mostrar regiões de flutuação que foram alteradas pela introdução das mutações.

Referências

1. Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich S, Horzinek MC, Igarashi A, Kaariainen L, et al. Flaviviridae. *Intervirology*. 1985;24(4):183-92.
2. Holbrook MR. Historical Perspectives on Flavivirus Research. *Viruses*. 2017;9(5).
3. Lindenbach BDT, H.J.; Rice, C.M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: D. M. Knipe and P. M. Howley, editor. *Fields Virology*. 1. 5th Edition ed. Philadelphia, PA, USA: Lippincott-Raven Publishers; 2007. p. 1101-52.
4. Pettersson JH, Fiz-Palacios O. Dating the origin of the genus Flavivirus in the light of Beringian biogeography. *The Journal of general virology*. 2014;95(Pt 9):1969-82.
5. J. Erin Staples TPM. Yellow Fever. In: Richard L. Guerrant DHW, Peter F. Weller, editor. *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens & Practice*. 3rd Edition ed: Saunders; 2011. p. 492-503.
6. Rezende J. O desafio da febre amarela. In: Unifesp E, editor. *À sombra do plátano: crônicas de história da medicina*. São Paulo 2009. p. 221-6.
7. Vasconcelos PF. [Yellow Fever]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2003;36(2):275-93.
8. Monath TP. Yellow fever: an update. *The Lancet Infectious diseases*. 2001;1(1):11-20.
9. Monath TP, Vasconcelos PF. Yellow fever. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2015;64:160-73.
10. de Souza RP, Foster PG, Sallum MA, Coimbra TL, Maeda AY, Silveira VR, et al. Detection of a new yellow fever virus lineage within the South American genotype I in Brazil. *Journal of medical virology*. 2010;82(1):175-85.
11. Bonaldo MC, Gomez MM, Dos Santos AA, Abreu FVS, Ferreira-de-Brito A, Miranda RM, et al. Genome analysis of yellow fever virus of the ongoing outbreak in Brazil reveals polymorphisms. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2017;112(6):447-51.
12. Gómez MM dAF, dos Santos AAC, de Mello IS, Santos MP, Ribeiro IP, Ferreira-de-Brito A, de Miranda RM, de Castro MG, Ribeiro MS, Laperrière Jr. RC, Aguiar SF, Meira GLS, Antunes D, Torres PHM, Vicente ACP, Guimarães ACR, Caffarena ER, Bello G, de-Oliveira RL, Bonaldo MC. Genomic and structural features of the Yellow Fever virus from the 2016-2017 Brazilian outbreak. 2017.
13. Mir D, Delatorre E, Bonaldo M, Lourenco-de-Oliveira R, Vicente AC, Bello G. Phylodynamics of Yellow Fever Virus in the Americas: new insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. *Scientific reports*. 2017;7(1):7385.
14. Collins ND, Barrett AD. Live Attenuated Yellow Fever 17D Vaccine: A Legacy Vaccine Still Controlling Outbreaks In Modern Day. *Current infectious disease reports*. 2017;19(3):14.
15. Organization WH. Global Strategy to Eliminate Yellow Fever Epidemics (EYE) 2016 [updated 11.26.2016]. Available from: http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2016/october/2_EYE_Strategy.pdf.
16. 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.
17. Halstead SB. Flavivirus Vaccines. In: Shi P-Y, editor. *Molecular Virology and Control of Flaviviruses*. Novartis Institute for Tropical Diseases, Singapore: Caister Academic Press; 2012.
18. Barrett ADT. Yellow fever live attenuated vaccine: A very successful live attenuated vaccine but still we have problems controlling the disease. *Vaccine*. 2017;35(44):5951-5.
19. Pulendran B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(10):741-7.
20. Ahmed R, Akondy RS. Insights into human CD8(+) T-cell memory using the yellow fever and smallpox vaccines. *Immunology and cell biology*. 2011;89(3):340-5.

21. Moore J, Ahmed H, Jia J, Akondy R, Ahmed R, Antia R. What Controls the Acute Viral Infection Following Yellow Fever Vaccination? *Bulletin of mathematical biology.* 2018;80(1):46-63.
22. Monath TP CM, Teuwen, DE. . Yellow fever vaccine. In: Plotkin S O, W, Offit P, editor. *Vaccines.* 5^o Edition ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008. p. 959-1055.
23. 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.
24. Neves PC, Santos JR, Tubarao LN, Bonaldo MC, Galler R. Early IFN-gamma production after YF 17D vaccine virus immunization in mice and its association with adaptive immune responses. *PloS one.* 2013;8(12):e81953.
25. Akondy RS, Johnson PL, Nakaya HI, Edupuganti S, Mulligan MJ, Lawson B, et al. Initial viral load determines the magnitude of the human CD8 T cell response to yellow fever vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2015;112(10):3050-5.
26. 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.
27. Wieten RW, Jonker EF, van Leeuwen EM, Remmerswaal EB, Ten Berge IJ, de Visser AW, et al. A Single 17D Yellow Fever Vaccination Provides Lifelong Immunity; Characterization of Yellow-Fever-Specific Neutralizing Antibody and T-Cell Responses after Vaccination. *PloS one.* 2016;11(3):e0149871.
28. Kengsakul K, Sathirapongsasuti K, Punyagupta S. Fatal myeloencephalitis following yellow fever vaccination in a case with HIV infection. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet.* 2002;85(1):131-4.
29. Jonker EF, Visser LG, Roukens AH. Advances and controversies in yellow fever vaccination. *Therapeutic advances in vaccines.* 2013;1(4):144-52.
30. (WHO) WHO. Yellow Fever 2018 [01.14.2018]. Available from: <http://www.who.int/ith/vaccines/yf/en/>.
31. Tierney MBaL, K.H. An Introduction to Reverse Genetic Tools for Investigating Gene Function. *The Plant Health Instructor.* 2005.
32. Griffiths AJF MJ, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelhart WM. An Introduction to Genetic Analysis. 7th Edition ed. New York: W.H.Freeman & Co Ltd; 2000. 960 p.
33. Stobart CC, Moore ML. RNA virus reverse genetics and vaccine design. *Viruses.* 2014;6(7):2531-50.
34. Ruggli N, Rice CM. Functional cDNA clones of the Flaviviridae: strategies and applications. *Advances in virus research.* 1999;53:183-207.
35. Racaniello VR, Baltimore D. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science.* 1981;214(4523):916-9.
36. Rice CM, Grakoui A, Galler R, Chambers TJ. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. *The New biologist.* 1989;1(3):285-96.
37. Sumiyoshi H, Hoke CH, Trent DW. Infectious Japanese encephalitis virus RNA can be synthesized from in vitro-ligated cDNA templates. *Journal of virology.* 1992;66(9):5425-31.
38. Kapoor M, Zhang L, Mohan PM, Padmanabhan R. Synthesis and characterization of an infectious dengue virus type-2 RNA genome (New Guinea C strain). *Gene.* 1995;162(2):175-80.
39. Kinney RM, Butrapet S, Chang GJ, Tsuchiya KR, Roehrig JT, Bhamarapavati N, et al. Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology.* 1997;230(2):300-8.
40. Lai CJ, Zhao BT, Hori H, Bray M. Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1991;88(12):5139-43.

41. Polo S, Ketner G, Levis R, Falgout B. Infectious RNA transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast. *Journal of virology*. 1997;71(7):5366-74.
42. Puri B, Polo S, Hayes CG, Falgout B. Construction of a full length infectious clone for dengue-1 virus Western Pacific,74 strain. *Virus genes*. 2000;20(1):57-63.
43. Khromykh AA, Westaway EG. Completion of Kunjin virus RNA sequence and recovery of an infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA. *Journal of virology*. 1994;68(7):4580-8.
44. Hurrelbrink RJ, Nestorowicz A, McMinn PC. Characterization of infectious Murray Valley encephalitis virus derived from a stably cloned genome-length cDNA. *The Journal of general virology*. 1999;80 (Pt 12):3115-25.
45. Yamshchikov VF, Wengler G, Perelygin AA, Brinton MA, Compans RW. An infectious clone of the West Nile flavivirus. *Virology*. 2001;281(2):294-304.
46. Mandl CW, Ecker M, Holzmann H, Kunz C, Heinz FX. Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudoerfl and high virulence strain Hypr. *The Journal of general virology*. 1997;78 (Pt 5):1049-57.
47. Shan C, Xie X, Muruato AE, Rossi SL, Roundy CM, Azar SR, et al. An Infectious cDNA Clone of Zika Virus to Study Viral Virulence, Mosquito Transmission, and Antiviral Inhibitors. *Cell host & microbe*. 2016;19(6):891-900.
48. Tsetsarkin KA, Kenney H, Chen R, Liu G, Manukyan H, Whitehead SS, et al. A Full-Length Infectious cDNA Clone of Zika Virus from the 2015 Epidemic in Brazil as a Genetic Platform for Studies of Virus-Host Interactions and Vaccine Development. *mBio*. 2016;7(4).
49. Deng CL, Zhang QY, Chen DD, Liu SQ, Qin CF, Zhang B, et al. Recovery of the Zika virus through an in vitro ligation approach. *The Journal of general virology*. 2017;98(7):1739-43.
50. Weger-Lucarelli J, Duggal NK, Bullard-Feibelman K, Veselinovic M, Romo H, Nguyen C, et al. Development and Characterization of Recombinant Virus Generated from a New World Zika Virus Infectious Clone. *Journal of virology*. 2017;91(1).
51. Widman DG, Young E, Yount BL, Plante KS, Gallichotte EN, Carbaugh DL, et al. A Reverse Genetics Platform That Spans the Zika Virus Family Tree. *mBio*. 2017;8(2).
52. Tumban E, Mitzel DN, Maes NE, Hanson CT, Whitehead SS, Hanley KA. Replacement of the 3' untranslated variable region of mosquito-borne dengue virus with that of tick-borne Langat virus does not alter vector specificity. *The Journal of general virology*. 2011;92(Pt 4):841-8.
53. Charlier N, Davidson A, Dallmeier K, Molenkamp R, De Clercq E, Neyts J. Replication of not-known-vector flaviviruses in mosquito cells is restricted by intracellular host factors rather than by the viral envelope proteins. *The Journal of general virology*. 2010;91(Pt 7):1693-7.
54. Saiyasombat R, Carrillo-Tripp J, Miller WA, Bredenbeek PJ, Blitvich BJ. Substitution of the premembrane and envelope protein genes of Modoc virus with the homologous sequences of West Nile virus generates a chimeric virus that replicates in vertebrate but not mosquito cells. *Virology journal*. 2014;11:150.
55. Liu WJ, Chen HB, Khromykh AA. Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication. *Journal of virology*. 2003;77(14):7804-13.
56. Op De Beeck A, Molenkamp R, Caron M, Ben Younes A, Bredenbeek P, Dubuisson J. Role of the transmembrane domains of prM and E proteins in the formation of yellow fever virus envelope. *Journal of virology*. 2003;77(2):813-20.
57. Liu WJ, Wang XJ, Clark DC, Lobigs M, Hall RA, Khromykh AA. A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice. *Journal of virology*. 2006;80(5):2396-404.

58. Fritz R, Stiasny K, Heinz FX. Identification of specific histidines as pH sensors in flavivirus membrane fusion. *The Journal of cell biology*. 2008;183(2):353-61.
59. Wang CC, Huang ZS, Chiang PL, Chen CT, Wu HN. Analysis of the nucleoside triphosphatase, RNA triphosphatase, and unwinding activities of the helicase domain of dengue virus NS3 protein. *FEBS letters*. 2009;583(4):691-6.
60. Lin SR, Zou G, Hsieh SC, Qing M, Tsai WY, Shi PY, et al. The helical domains of the stem region of dengue virus envelope protein are involved in both virus assembly and entry. *Journal of virology*. 2011;85(10):5159-71.
61. Blazevic J, Rouha H, Bradt V, Heinz FX, Stiasny K. Membrane Anchors of the Structural Flavivirus Proteins and Their Role in Virus Assembly. *Journal of virology*. 2016;90(14):6365-78.
62. Zou G, Xu HY, Qing M, Wang QY, Shi PY. Development and characterization of a stable luciferase dengue virus for high-throughput screening. *Antiviral research*. 2011;91(1):11-9.
63. Schoggins JW, Dorner M, Feulner M, Imanaka N, Murphy MY, Ploss A, et al. Dengue reporter viruses reveal viral dynamics in interferon receptor-deficient mice and sensitivity to interferon effectors in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(36):14610-5.
64. Zhang Y, Feng Y, Li L, Ye X, Wang J, Wang Q, et al. Immunization with an adenovirus-vectored TB vaccine containing Ag85A-Mtb32 effectively alleviates allergic asthma. *Journal of molecular medicine*. 2018.
65. A CG, Gomez CE, Diaz-Brito V, Pich J, Arnaiz JA, Perdiguero B, et al. Safety and vaccine-induced HIV-1 immune responses in healthy volunteers following a late MVA-B boost 4 years after the last immunization. *PloS one*. 2017;12(10):e0186602.
66. Matassov D, Marzi A, Latham T, Xu R, Ota-Setlik A, Feldmann F, et al. Vaccination With a Highly Attenuated Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Vector Protects Against Challenge With a Lethal Dose of Ebola Virus. *The Journal of infectious diseases*. 2015;212 Suppl 2:S443-51.
67. Bonaldo MC, Sequeira PC, Galler R. The yellow fever 17D virus as a platform for new live attenuated vaccines. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2014;10(5):1256-65.
68. Assenberg R, Mastrangelo E, Walter TS, Verma A, Milani M, Owens RJ, et al. Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. *Journal of virology*. 2009;83(24):12895-906.
69. Guirakhoo F, Zhang ZX, Chambers TJ, Delagrave S, Arroyo J, Barrett AD, et al. Immunogenicity, genetic stability, and protective efficacy of a recombinant, chimeric yellow fever-Japanese encephalitis virus (ChimeriVax-JE) as a live, attenuated vaccine candidate against Japanese encephalitis. *Virology*. 1999;257(2):363-72.
70. Monath TP, Soike K, Levenbook I, Zhang ZX, Arroyo J, Delagrave S, et al. Recombinant, chimaeric live, attenuated vaccine (ChimeriVax) incorporating the envelope genes of Japanese encephalitis (SA14-14-2) virus and the capsid and nonstructural genes of yellow fever (17D) virus is safe, immunogenic and protective in non-human primates. *Vaccine*. 1999;17(15-16):1869-82.
71. Arroyo J, Miller CA, Catalan J, Monath TP. Yellow fever vector live-virus vaccines: West Nile virus vaccine development. *Trends in molecular medicine*. 2001;7(8):350-4.
72. Monath TP, Arroyo J, Miller C, Guirakhoo F. West Nile virus vaccine. *Current drug targets Infectious disorders*. 2001;1(1):37-50.
73. Guirakhoo F, Arroyo J, Pugachev KV, Miller C, Zhang ZX, Weltzin R, et al. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. *Journal of virology*. 2001;75(16):7290-304.
74. Caufour PS, Motta MC, Yamamura AM, Vazquez S, Ferreira, II, Jabor AV, et al. Construction, characterization and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 viruses. *Virus research*. 2001;79(1-2):1-14.

75. Pugachev KV, Guirakhoo F, Ocran SW, Mitchell F, Parsons M, Penal C, et al. High fidelity of yellow fever virus RNA polymerase. *Journal of virology*. 2004;78(2):1032-8.
76. Chokephaibulkit K, Sirivichayakul C, Thisyakorn U, Pancharoen C, Boaz M, Bouckennooghe A, et al. Long-term follow-up of Japanese encephalitis chimeric virus vaccine: Immune responses in children. *Vaccine*. 2016;34(46):5664-9.
77. Chokephaibulkit K, Houillon G, Feroldi E, Bouckennooghe A. Safety and immunogenicity of a live attenuated Japanese encephalitis chimeric virus vaccine (IMOJEV(R)) in children. *Expert review of vaccines*. 2016;15(2):153-66.
78. Chokephaibulkit K, Sirivichayakul C, Thisyakorn U, Sabchareon A, Pancharoen C, Bouckennooghe A, et al. Safety and immunogenicity of a single administration of live-attenuated Japanese encephalitis vaccine in previously primed 2- to 5-year-olds and naive 12- to 24-month-olds: multicenter randomized controlled trial. *The Pediatric infectious disease journal*. 2010;29(12):1111-7.
79. Monath TP, Guirakhoo F, Nichols R, Yoksan S, Schrader R, Murphy C, et al. Chimeric live, attenuated vaccine against Japanese encephalitis (ChimeriVax-JE): phase 2 clinical trials for safety and immunogenicity, effect of vaccine dose and schedule, and memory response to challenge with inactivated Japanese encephalitis antigen. *The Journal of infectious diseases*. 2003;188(8):1213-30.
80. De Groot AS, Martin W, Moise L, Guirakhoo F, Monath T. Analysis of ChimeriVax Japanese Encephalitis Virus envelope for T-cell epitopes and comparison to circulating strain sequences. *Vaccine*. 2007;25(47):8077-84.
81. Biedenbender R, Bevilacqua J, Gregg AM, Watson M, Dayan G. Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study to investigate the immunogenicity and safety of a West Nile virus vaccine in healthy adults. *The Journal of infectious diseases*. 2011;203(1):75-84.
82. De Filette M, Ulbert S, Diamond M, Sanders NN. Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Veterinary research*. 2012;43:16.
83. 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.
84. Villar LA, Rivera-Medina DM, Arredondo-Garcia JL, Boaz M, Starr-Spires L, Thakur M, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant tetravalent dengue vaccine in 9-16 year olds: a randomized, controlled, phase II trial in Latin America. *The Pediatric infectious disease journal*. 2013;32(10):1102-9.
85. Dayan GH, Thakur M, Boaz M, Johnson C. Safety and immunogenicity of three tetravalent dengue vaccine formulations in healthy adults in the USA. *Vaccine*. 2013;31(44):5047-54.
86. Dayan GH, Garbes P, Noriega F, Izoton de Sadosky AD, Rodrigues PM, Giuberti C, et al. Immunogenicity and safety of a recombinant tetravalent dengue vaccine in children and adolescents ages 9-16 years in Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2013;89(6):1058-65.
87. Capeding RZ, Luna IA, Bomasang E, Lupisan S, Lang J, Forrat R, et al. Live-attenuated, tetravalent dengue vaccine in children, adolescents and adults in a dengue endemic country: randomized controlled phase I trial in the Philippines. *Vaccine*. 2011;29(22):3863-72.
88. Qiao M, Shaw D, Forrat R, Wartel-Tram A, Lang J. Priming effect of dengue and yellow fever vaccination on the immunogenicity, infectivity, and safety of a tetravalent dengue vaccine in humans. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2011;85(4):724-31.
89. Plennevaux E, Moureau A, Arredondo-Garcia JL, Villar L, Pitisuttithum P, Tran NH, et al. Impact of Dengue Vaccination on Serological Diagnosis: Insights From Phase III Dengue Vaccine Efficacy Trials. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2017.

90. McAllister A, Arbetman AE, Mandl S, Pena-Rossi C, Andino R. Recombinant yellow fever viruses are effective therapeutic vaccines for treatment of murine experimental solid tumors and pulmonary metastases. *Journal of virology*. 2000;74(19):9197-205.
91. Tao D, Barba-Spaeth G, Rai U, Nussenzweig V, Rice CM, Nussenzweig RS. Yellow fever 17D as a vaccine vector for microbial CTL epitopes: protection in a rodent malaria model. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(2):201-9.
92. 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 journal*. 2011;8:127.
93. Bonaldo MC, Garratt RC, Freire MS, Galler R. Expression of foreign protein epitopes at the surface of recombinant yellow fever 17D viruses based on three-dimensional modeling of its envelope protein. *Cell biochemistry and biophysics*. 2006;44(3):313-24.
94. Bonaldo MC, Garratt RC, Caufour PS, Freire MS, Rodrigues MM, Nussenzweig RS, et al. Surface expression of an immunodominant malaria protein B cell epitope by yellow fever virus. *Journal of molecular biology*. 2002;315(4):873-85.
95. Bonaldo MC, Garratt RC, Marchevisky RS, Coutinho ES, Jabor AV, Almeida LF, et al. Attenuation of recombinant yellow fever 17D viruses expressing foreign protein epitopes at the surface. *Journal of virology*. 2005;79(13):8602-13.
96. Corver J, Lenches E, Smith K, Robison RA, Sando T, Strauss EG, et al. Fine mapping of a cis-acting sequence element in yellow fever virus RNA that is required for RNA replication and cyclization. *Journal of virology*. 2003;77(3):2265-70.
97. Stoyanov CT, Boscardin SB, Deroubaix S, Barba-Spaeth G, Franco D, Nussenzweig RS, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant yellow fever vaccine against the murine malarial parasite *Plasmodium yoelii*. *Vaccine*. 2010;28(29):4644-52.
98. Franco D, Li W, Qing F, Stoyanov CT, Moran T, Rice CM, et al. Evaluation of yellow fever virus 17D strain as a new vector for HIV-1 vaccine development. *Vaccine*. 2010;28(35):5676-85.
99. 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.
100. Nogueira RT, Nogueira AR, Pereira MC, Rodrigues MM, Neves PC, Galler R, et al. Recombinant yellow fever viruses elicit CD8+ T cell responses and protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *PloS one*. 2013;8(3):e59347.
101. Martins MA, Bonaldo MC, Rudersdorf RA, Piaskowski SM, Rakasz EG, Weisgrau KL, et al. Immunogenicity of seven new recombinant yellow fever viruses 17D expressing fragments of SIVmac239 Gag, Nef, and Vif in Indian rhesus macaques. *PloS one*. 2013;8(1):e54434.
102. Bredenbeek PJ, Molenkamp R, Spaan WJ, Deubel V, Marianneau P, Salvato MS, et al. A recombinant Yellow Fever 17D vaccine expressing Lassa virus glycoproteins. *Virology*. 2006;345(2):299-304.
103. Jiang X, Dalebout TJ, Bredenbeek PJ, Carrion R, Jr., Brasky K, Patterson J, et al. Yellow fever 17D-vectored vaccines expressing Lassa virus GP1 and GP2 glycoproteins provide protection against fatal disease in guinea pigs. *Vaccine*. 2011;29(6):1248-57.
104. Trindade GF, Santana MG, Santos JR, Galler R, Bonaldo MC. Retention of a recombinant GFP protein expressed by the yellow fever 17D virus in the E/NS1 intergenic region in the endoplasmic reticulum. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012;107(2):262-72.
105. Bonaldo MC, Mello SM, Trindade GF, Rangel AA, Duarte AS, Oliveira PJ, et al. Construction and characterization of recombinant flaviviruses bearing insertions between E and NS1 genes. *Virology journal*. 2007;4:115.

106. Lima NS. Estudos biológicos e imunológicos de novas plataformas de expressão de proteínas pelo vírus da febre amarela vacinal 17D. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Oswaldo Cruz; 2015.
107. de Borba L, Strottmann DM, de Noronha L, Mason PW, Dos Santos CN. Synergistic interactions between the NS3(hel) and E proteins contribute to the virulence of dengue virus type 1. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(4):e1624.
108. Grant D, Tan GK, Qing M, Ng JK, Yip A, Zou G, et al. A single amino acid in nonstructural protein NS4B confers virulence to dengue virus in AG129 mice through enhancement of viral RNA synthesis. *Journal of virology*. 2011;85(15):7775-87.
109. Despres P, Frenkiel MP, Ceccaldi PE, Duarte Dos Santos C, Deubel V. Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent dengue viruses. *Journal of virology*. 1998;72(1):823-9.
110. Duarte dos Santos CN, Frenkiel MP, Courageot MP, Rocha CF, Vazeille-Falcoz MC, Wien MW, et al. Determinants in the envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. *Virology*. 2000;274(2):292-308.
111. Bordignon J, Strottmann DM, Mosimann AL, Probst CM, Stella V, Noronha L, et al. Dengue neurovirulence in mice: identification of molecular signatures in the E and NS3 helicase domains. *Journal of medical virology*. 2007;79(10):1506-17.
112. Tan GK, Ng JK, Trasti SL, Schul W, Yip G, Alonso S. A non mouse-adapted dengue virus strain as a new model of severe dengue infection in AG129 mice. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(4):e672.
113. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature reviews Microbiology*. 2005;3(1):13-22.
114. Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceicao TM, Higa LM, Castanho MA, Da Poian AT. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS microbiology reviews*. 2015;39(2):155-70.
115. van der Schaar HM, Rust MJ, Chen C, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Zhuang X, et al. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS pathogens*. 2008;4(12):e1000244.
116. Klein DE, Choi JL, Harrison SC. Structure of a dengue virus envelope protein late-stage fusion intermediate. *Journal of virology*. 2013;87(4):2287-93.
117. Pangerl K, Heinz FX, Stiasny K. Mutational analysis of the zipper reaction during flavivirus membrane fusion. *Journal of virology*. 2011;85(17):8495-501.
118. Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *Journal of virology*. 1991;65(5):2467-75.
119. Ruiz-Linares A, Cahour A, Despres P, Girard M, Bouloy M. Processing of yellow fever virus polyprotein: role of cellular proteases in maturation of the structural proteins. *Journal of virology*. 1989;63(10):4199-209.
120. Li H, Clum S, You S, Ebner KE, Padmanabhan R. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *Journal of virology*. 1999;73(4):3108-16.
121. Yon C, Teramoto T, Mueller N, Phelan J, Ganesh VK, Murthy KH, et al. Modulation of the nucleoside triphosphatase/RNA helicase and 5'-RNA triphosphatase activities of Dengue virus type 2 nonstructural protein 3 (NS3) by interaction with NS5, the RNA-dependent RNA polymerase. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(29):27412-9.
122. Junaid M, Angsuthanasombat C, Wikberg JE, Ali N, Katzenmeier G. Modulation of enzymatic activity of dengue virus nonstructural protein NS3 nucleoside triphosphatase/helicase by poly(U). *Biochemistry Biokhimiia*. 2013;78(8):925-32.

123. 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.
124. Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker J, Buhler S, Bartenschlager R. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(12):8873-82.
125. Miorin L, Romero-Brey I, Maiuri P, Hoppe S, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R, et al. Three-dimensional architecture of tick-borne encephalitis virus replication sites and trafficking of the replicated RNA. *Journal of virology*. 2013;87(11):6469-81.
126. 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.
127. Lodeiro MF, Filomatori CV, Gamarnik AV. Structural and functional studies of the promoter element for dengue virus RNA replication. *Journal of virology*. 2009;83(2):993-1008.
128. Lo MK, Tilgner M, Bernard KA, Shi PY. Functional analysis of mosquito-borne flavivirus conserved sequence elements within 3' untranslated region of West Nile virus by use of a reporting replicon that differentiates between viral translation and RNA replication. *Journal of virology*. 2003;77(18):10004-14.
129. Wengler G, Wengler G, Gross HJ. Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flaviviruses. *Virology*. 1978;89(2):423-37.
130. Cleaves GR, Ryan TE, Schlesinger RW. Identification and characterization of type 2 dengue virus replicative intermediate and replicative form RNAs. *Virology*. 1981;111(1):73-83.
131. Raviprakash K, Sinha M, Hayes CG, Porter KR. Conversion of dengue virus replicative form RNA (RF) to replicative intermediate (RI) by nonstructural proteins NS-5 and NS-3. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1998;58(1):90-5.
132. Li L, Lok SM, Yu IM, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J, et al. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science*. 2008;319(5871):1830-4.
133. Sanchez-San Martin C, Liu CY, Kielian M. Dealing with low pH: entry and exit of alphaviruses and flaviviruses. *Trends in microbiology*. 2009;17(11):514-21.
134. Blazquez AB, Escribano-Romero E, Merino-Ramos T, Saiz JC, Martin-Acebes MA. Stress responses in flavivirus-infected cells: activation of unfolded protein response and autophagy. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:266.
135. Perera N, Miller JL, Zitzmann N. The role of the unfolded protein response in dengue virus pathogenesis. *Cellular microbiology*. 2017;19(5).
136. Vishnu N, Jadoon Khan M, Karsten F, Groschner LN, Waldeck-Weiermair M, Rost R, et al. ATP increases within the lumen of the endoplasmic reticulum upon intracellular Ca²⁺ release. *Molecular biology of the cell*. 2014;25(3):368-79.
137. Jankowsky E. RNA helicases at work: binding and rearranging. *Trends in biochemical sciences*. 2011;36(1):19-29.
138. Sepulveda-Salinas KJ, Ramos-Castaneda J. Participation of dengue virus NS4B protein in the modulation of immune effectors dependent on ER stress in insect cells. *Cell stress & chaperones*. 2017;22(6):799-810.
139. Chen TH, Chiang YH, Hou JN, Cheng CC, Sofiyatun E, Chiu CH, et al. XBP1-Mediated BiP/GRP78 Upregulation Copes with Oxidative Stress in Mosquito Cells during Dengue 2 Virus Infection. *BioMed research international*. 2017;2017:3519158.
140. Furtado ND. Efeitos de mutações nas proteínas E, NS3 e NS4B no vírus vacinal da febre amarela 17D. Rio de Janeiro: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ); 2016.
141. Sirohi D, Chen Z, Sun L, Klose T, Pierson TC, Rossmann MG, et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*. 2016;352(6284):467-70.
142. Wu J, Bera, A.K., Kuhn, R.J., Smith, J.L. Crystal structure of yellow fever virus NS3 helicase. 2005.

143. Luo D, Xu T, Watson RP, Scherer-Becker D, Sampath A, Jahnke W, et al. Insights into RNA unwinding and ATP hydrolysis by the flavivirus NS3 protein. *The EMBO journal*. 2008;27(23):3209-19.
144. Li Y, Wong YL, Lee MY, Li Q, Wang QY, Lescar J, et al. Secondary Structure and Membrane Topology of the Full-Length Dengue Virus NS4B in Micelles. *Angewandte Chemie*. 2016;55(39):12068-72.
145. de Santana MG, Neves PC, dos Santos JR, Lima NS, dos Santos AA, Watkins DI, et al. Improved genetic stability of recombinant yellow fever 17D virus expressing a lentiviral Gag gene fragment. *Virology*. 2014;452-453:202-11.
146. Galler R, Marchevsky RS, Caride E, Almeida LF, Yamamura AM, Jabor AV, et al. Attenuation and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 virus for rhesus monkeys. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 2005;38(12):1835-46.
147. Trindade GF, Marchevsky RS, Fillipis AM, Nogueira RM, Bonaldo MC, Acero PC, et al. Limited replication of yellow fever 17DD and 17D-Dengue recombinant viruses in rhesus monkeys. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 2008;80(2):311-21.
148. Silveira GF, Strottmann DM, de Borba L, Mansur DS, Zanchin NI, Bordignon J, et al. Single point mutations in the helicase domain of the NS3 protein enhance dengue virus replicative capacity in human monocyte-derived dendritic cells and circumvent the type I interferon response. *Clinical and experimental immunology*. 2016;183(1):114-28.
149. History and Characterization of the Vero Cell Line.: Hearing before the Report for the Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee (May 12, 2000, 2000).
150. Naoki Osada AK, Toshiyuki Yamaji, Noriko Hirayama, Fumio Kasai, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda & Kentaro Hanada. The Genome Landscape of the African Green Monkey Kidney-Derived Vero Cell Line. *DNA Research*. 2014;21:673 - 83.
151. Brackney DE, Scott JC, Sagawa F, Woodward JE, Miller NA, Schilkey FD, et al. C6/36 *Aedes albopictus* cells have a dysfunctional antiviral RNA interference response. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(10):e856.
152. Vecchi C, Montosi G, Pietrangelo A. Huh-7: a human "hemochromatotic" cell line. *Hepatology*. 2010;51(2):654-9.
153. Pantopoulos K. Function of the hemochromatosis protein HFE: Lessons from animal models. *World journal of gastroenterology*. 2008;14(45):6893-901.
154. Zhang T, Lin RT, Li Y, Douglas SD, Maxcey C, Ho C, et al. Hepatitis C virus inhibits intracellular interferon alpha expression in human hepatic cell lines. *Hepatology*. 2005;42(4):819-27.
155. Chao LH, Klein DE, Schmidt AG, Pena JM, Harrison SC. Sequential conformational rearrangements in flavivirus membrane fusion. *eLife*. 2014;3:e04389.
156. Smit JM, Moesker B, Rodenhuis-Zybert I, Wilschut J. Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses*. 2011;3(2):160-71.
157. Zhang W, Kaufmann B, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG. Membrane curvature in flaviviruses. *Journal of structural biology*. 2013;183(1):86-94.
158. Tsai WY, Hsieh SC, Lai CY, Lin HE, Nerurkar VR, Wang WK. C-terminal helical domains of dengue virus type 4 E protein affect the expression/stability of prM protein and conformation of prM and E proteins. *PloS one*. 2012;7(12):e52600.
159. Zheng A, Umashankar M, Kielian M. In vitro and in vivo studies identify important features of dengue virus pr-E protein interactions. *PLoS pathogens*. 2010;6(10):e1001157.
160. Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *The EMBO journal*. 2011;30(17):3481-500.
161. Randolph VB, Stollar V. Low pH-induced cell fusion in flavivirus-infected *Aedes albopictus* cell cultures. *The Journal of general virology*. 1990;71 (Pt 8):1845-50.
162. Nour AM, Li Y, Wolenski J, Modis Y. Viral membrane fusion and nucleocapsid delivery into the cytoplasm are distinct events in some flaviviruses. *PLoS pathogens*. 2013;9(9):e1003585.

163. Nour AM, Modis Y. Endosomal vesicles as vehicles for viral genomes. *Trends in cell biology*. 2014;24(8):449-54.
164. Kaufusi PH, Kelley JF, Yanagihara R, Nerurkar VR. Induction of endoplasmic reticulum-derived replication-competent membrane structures by West Nile virus non-structural protein 4B. *PloS one*. 2014;9(1):e84040.
165. Sellers RS, Clifford CB, Treuting PM, Brayton C. Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice. *Veterinary pathology*. 2012;49(1):32-43.
166. Santos AP, Matos DC, Bertho AL, Mendonca SC, Marcovistz R. Detection of Th1/Th2 cytokine signatures in yellow fever 17DD first-time vaccinees through ELISpot assay. *Cytokine*. 2008;42(2):152-5.
167. Watson AM, Lam LK, Klimstra WB, Ryman KD. The 17D-204 Vaccine Strain-Induced Protection against Virulent Yellow Fever Virus Is Mediated by Humoral Immunity and CD4+ but not CD8+ T Cells. *PLoS pathogens*. 2016;12(7):e1005786.
168. Watson AM, Klimstra WB. T Cell-Mediated Immunity towards Yellow Fever Virus and Useful Animal Models. *Viruses*. 2017;9(4).
169. Conde JN, Silva EM, Barbosa AS, Mohana-Borges R. The Complement System in Flavivirus Infections. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:213.
170. Recher M, Lang KS, Hunziker L, Freigang S, Eschli B, Harris NL, et al. Deliberate removal of T cell help improves virus-neutralizing antibody production. *Nature immunology*. 2004;5(9):934-42.
171. Zhang W, Li X, Lin Y, Tian D. Identification of three H-2K(d) restricted CTL epitopes of NS4A and NS4B protein from Yellow fever 17D vaccine. *Journal of virological methods*. 2013;187(2):304-13.

ANEXO I – Lista de meios e soluções

Meio Earle's 199 completo

10 mL	Meio 199 10X (Gibco)
5 mL	Bicarbonato de sódio - NaHCO ₃ (Sigma)
5 mL	Soro fetal bovino (Gibco)
80 µL	Gentamicina 50 mg/mL (Gibco)
q.s.p. 100 mL	Água tipo I estéril

Meio diluente

10 mL	Meio 199 10X (Gibco)
0,5 mL	Bicarbonato de sódio - NaHCO ₃ (Sigma)
2,5 mL	HEPES 1M (Gibco)
5 mL	Soro fetal bovino (Gibco)
80 µL	Gentamicina 50 mg/mL (Gibco)
q.s.p. 100 mL	Água tipo I estéril

Meio CMC completo

10 mL	Meio 199 10X (Gibco)
5 mL	Bicarbonato de sódio - NaHCO ₃ (Sigma)
5 mL	Soro fetal bovino (Gibco)
80 µL	Gentamicina 50 mg/mL (Gibco)
q.s.p. 100 mL	Carboximetilcelulose 3,0 % (m/v) (Sigma)

Caldo triptose 2,6 % (10 X)

5,20 g	Caldo triptose (Tryptose Phosphate Broth; Sigma)
200 mL	Água do tipo I

Esterilização por autoclavação

Meio Leibovitz's L-15 completo

5 mL	Soro fetal bovino (Gibco)
10 mL	Caldo triptose 2,0 %
80 µL	Gentamicina 50 mg/mL (Gibco)
q.s.p. 100 mL	Meio Leibovitz's L-15 com L-glutamina (Sigma) dissolvido em água e filtrado, com pH 7,41

Meio DMEM completo

10 mL	Soro fetal bovino (Gibco)
1 mL	Glutamax (100X, Gibco)
1 mL	Penicilina/Estreptomicina 10000 U/mL (Gibco)
q.s.p. 100 mL	Meio DMEM Low Glucose (LGC)

Formaldeído 10,0 % (v/v)

270 mL Formaldeído 37 % (Merck)
q.s.p. 1 L Água tipo I

Cristal violeta 2,0 % (m/v)

4,0 g Cristal violeta (Merck)
10,0 mL Metanol (Merck)
q.s.p. 200 mL Água tipo I

Cristal violeta 0,04 % (v/v)

20 mL Cristal violeta 2,0 %
q.s.p. 1 L Água tipo I

Meio LB líquido

10 g Triptona (Bacto Tryptona – BD)
5 g Extrato de levedura (Bacto Yeast Extract – BD)
10 g Cloreto de sódio - NaCl (Sigma)
q.s.p. 1 L Água tipo I
Esterilização por autoclavação

Meio LB sólido

3,75 g Bacto agar (BD)
250 mL Meio LB líquido
Esterilização por autoclavação

Meio SOC (Invitrogen)

2 % Triptona
0,5 % Extrato de levedura
10 nM NaCl
2,5 nM KCl
10 nM MgCl₂
10 nM MgSO₄
20 nM Glicose

Tampão tris-acetato-EDTA (TAE) 50 X

242 g Tris-base (Sigma)
57,1 mL Ácido acético (Merck)
100 mL Solução de 0,5 M EDTA dissódico (Sigma) em água tipo 2 pH 8,0
q.s.p. 1 L Água tipo I

Tampão tris-acetato-EDTA (TAE) 1 X

20 mL Tampão tris-acetato-EDTA (TAE) 50 X
q.s.p. 1 L Água tipo I

Agarose 0,8 % (m/v)

1,6 g Agarose (Promega)
200 mL TAE 1 X

Aquecer gradativamente no micro-ondas até total dissolução da agarose no TAE.

Tampão de amostra 6X

0,25% Azul de bromofenol (Sigma)
0,25% Xileno cianol (Sigma)
30% Glicerol (Sigma)
10 mL Tampão tris-EDTA (TE – Qiagen)

Solução de brometo de etídio

0,01 mL Brometo de etídio (Bio-Rad)
200 mL Água tipo I

Glicerol 50,0 % (v/v)

50 mL Glicerol 99+ % (Sigma)
50 mL Água tipo I

Tampão AVE (Qiagen)

0,04 % NaN₃ (azida sódica)
Água livre de RNAses

Tampão salina fosfato (PBS) 10 X

87 g Cloreto de sódio - NaCl (Sigma)
13,6 g Fosfato de sódio monobásico - NaH₂PO₄ (Sigma)
12,78 g Fosfato de sódio dibásico - Na₂HPO₄ (Sigma)
q.s.p. 1 L Água tipo I
Ajustar pH para 7,0

PBS-DEPC

87 g Cloreto de sódio - NaCl (Sigma)
13,6 g Fosfato de sódio monobásico - NaH₂PO₄ (Sigma)
12,78 g Fosfato de sódio dibásico - Na₂HPO₄ (Sigma)
q.s.p. 1 L Água tratada com DEPC (0,01 %)
Ajustar pH para 7,0

PBS-T

1L	PBS
0,5 mL	Tween 20 (Sigma)

Tampão de bloqueio

5,0 g	Leite desnatado (Molico)
100 mL	PBS-T

Tampão carbonato/bicarbonato 0,1M

0,1 M	Tampão carbonato - Na_2CO_3 (Sigma) em água tipo 2 pH 8,3
0,1 M	Tampão bicarbonato - NaHCO_3 (Sigma) em água tipo 2 pH 11,2

Ajustar pH para 8,6

Substrato para peroxidase

0,04 g	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB), Sigma
0,04 g	Urea (Sigma)
10 mL	DMSO

Alíquotas de 0,5 mL armazenadas a 4 °C.

Tampão fosfato/citrato 0,2M

0,2 M	Tampão fosfato - Na_2HPO_4 (Sigma) em água tipo I pH 9,0
0,2 M	Tampão citrato – Ácido cítrico (Sigma) em água tipo I pH 2,0

Ajustar pH para 5,0

ANEXO II – Análises estatísticas do estudo de proliferação viral

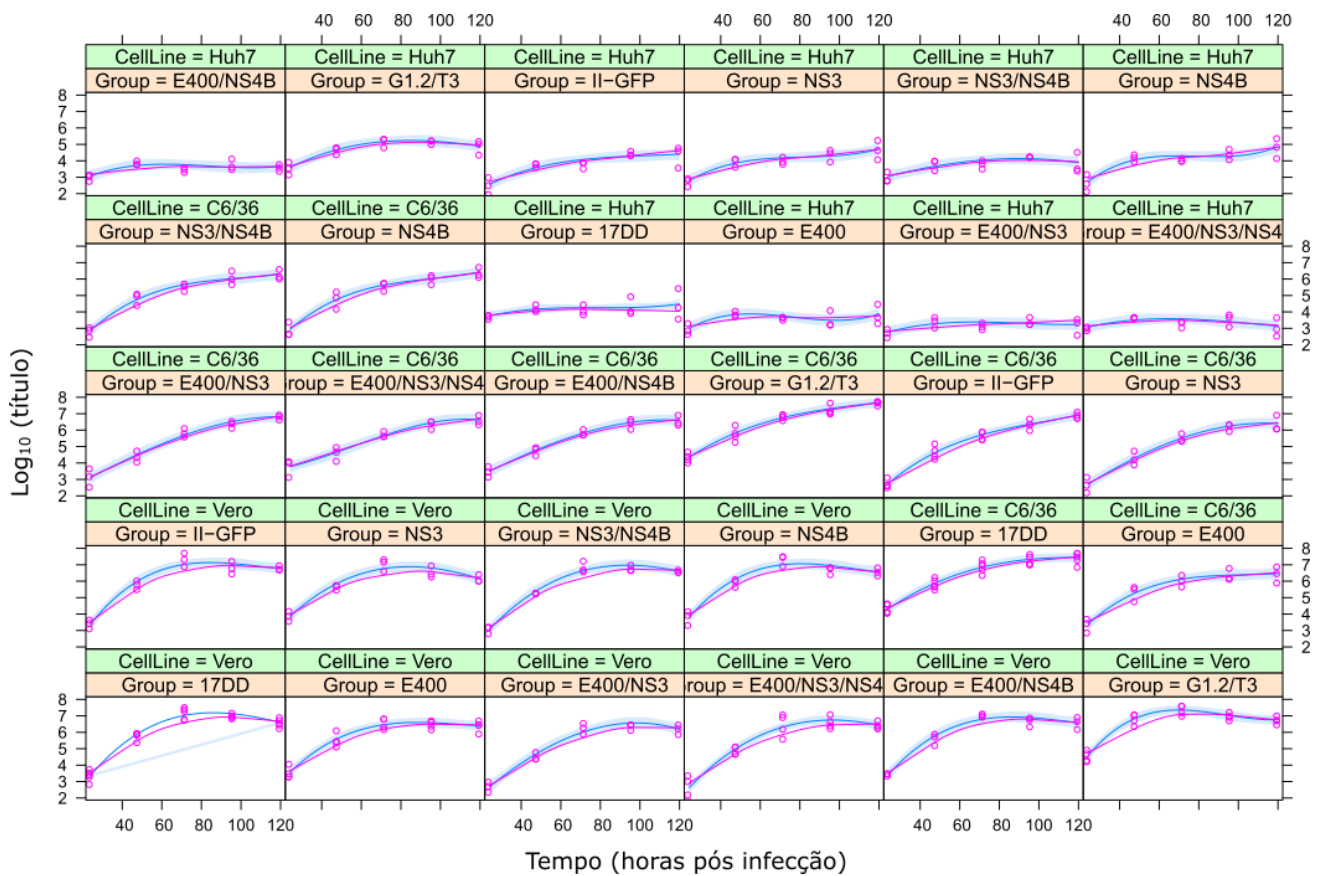


Figura A1 – Curvas de proliferação ajustadas ao modelo linear misto.

As linhagens celulares estão indicadas nas caixas verdes, e os vírus FA nas caixas rosas. Em todos os gráficos, o eixo das abscissas representa o tempo decorrido pós infecção e o eixo das ordenadas, os títulos virais (\log_{10} -transformados). As curvas em azul representam os valores médios das titulações virais, e o sombreado em azul claro, o intervalo de confiança. Os pontos rosa indicam os valores de \log_{10} dos títulos virais calculados. A curva em rosa é a aproximação pelo modelo linear misto.

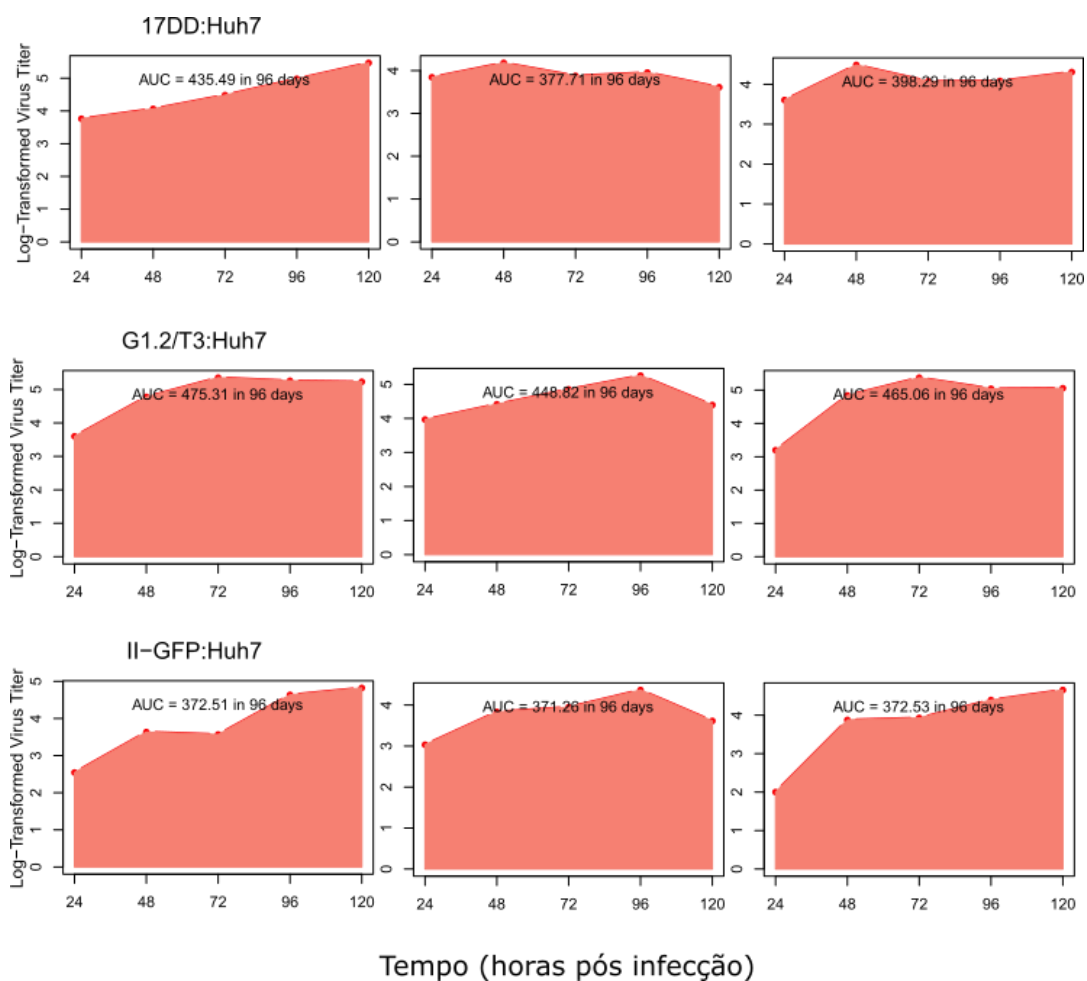
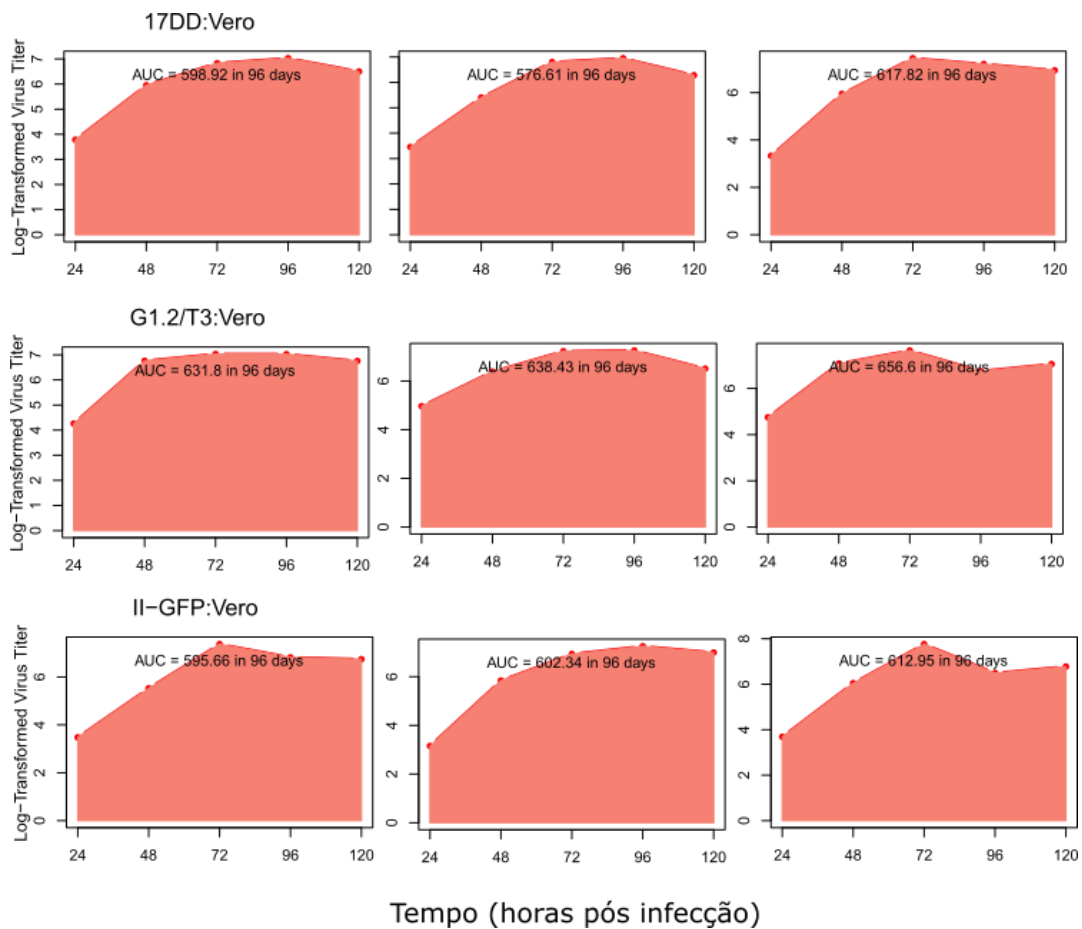
Tabela A1 – Diferenças significativas entre os vírus FA controles e mutantes nas linhagens celulares e nos tempos pós infecção, determinadas após ajuste em modelo linear misto

<i>Comparação</i>	<i>Horas p.i.</i>	<i>Linhagem celular</i>	<i>Diferença de títulos virais log₁₀-transformados</i>	<i>p-valor</i>
<i>17DD - E400/NS3</i>	24	Vero	0,693	0,0590
<i>17DD - E400/NS3/NS4B</i>	24	Vero	0,760	0,0081
<i>17DD - G1.2/T3</i>	24	Vero	-1,194	3,98e-07
<i>E400 - G1.2/T3</i>	24	Vero	-1,008	0,0001
<i>E400/NS3 - G1.2/T3</i>	24	Vero	-1,887	7,34e-11
<i>E400/NS3/NS4B - G1.2/T3</i>	24	Vero	-1,954	7,33e-11
<i>E400/NS3/NS4B - II-GFP</i>	24	Vero	-0,769	0,0333
<i>E400/NS4B - G1.2/T3</i>	24	Vero	-1,138	5,63e-05
<i>G1.2/T3 - II-GFP</i>	24	Vero	1,185	2,10e-05
<i>G1.2/T3 - NS3</i>	24	Vero	0,709	0,0711
<i>G1.2/T3 - NS3/NS4B</i>	24	Vero	1,502	1,08e-08
<i>G1.2/T3 - NS4B</i>	24	Vero	0,786	0,0263
<i>17DD - E400/NS3</i>	48	Vero	1,209	1,01e-07
<i>17DD - E400/NS3/NS4B</i>	48	Vero	0,896	5,23e-05
<i>17DD - G1.2/T3</i>	48	Vero	-0,926	2,34e-05
<i>E400 - G1.2/T3</i>	48	Vero	-1,232	1,53e-08
<i>E400/NS3 - G1.2/T3</i>	48	Vero	-2,135	0
<i>E400/NS3 - II-GFP</i>	48	Vero	-1,305	3,38e-07
<i>E400/NS3/NS4B - G1.2/T3</i>	48	Vero	-1,822	0
<i>E400/NS3/NS4B - II-GFP</i>	48	Vero	-0,992	9,99e-05
<i>E400/NS4B - G1.2/T3</i>	48	Vero	-1,035	3,72e-05
<i>G1.2/T3 - II-GFP</i>	48	Vero	0,830	0,0028
<i>G1.2/T3 - NS3</i>	48	Vero	0,972	0,0001
<i>G1.2/T3 - NS3/NS4B</i>	48	Vero	1,407	1,56e-09
<i>G1.2/T3 - NS4B</i>	48	Vero	0,691	0,0312
<i>17DD - E400</i>	72	Vero	0,567	0,0057
<i>17DD - E400/NS3</i>	72	Vero	0,998	7,53e-08
<i>17DD - E400/NS3/NS4B</i>	72	Vero	0,700	0,0001
<i>E400 - G1.2/T3</i>	72	Vero	-0,881	1,49e-06
<i>E400 - II-GFP</i>	72	Vero	-0,560	0,0327
<i>E400/NS3 - G1.2/T3</i>	72	Vero	-1,313	4,38e-12
<i>E400/NS3 - II-GFP</i>	72	Vero	-0,991	3,28e-06
<i>E400/NS3/NS4B - G1.2/T3</i>	72	Vero	-1,015	1,24e-08
<i>E400/NS3/NS4B - II-GFP</i>	72	Vero	-0,693	0,0019
<i>E400/NS3/NS4B - NS4B</i>	72	Vero	-0,674	0,0030
<i>E400/NS4B - G1.2/T3</i>	72	Vero	-0,551	0,0385
<i>G1.2/T3 - NS3</i>	72	Vero	0,573	0,0255
<i>G1.2/T3 - NS3/NS4B</i>	72	Vero	0,690	0,0020
<i>17DD - E400</i>	96	Vero	0,545	0,0847
<i>17DD - E400</i>	24	C6/36	0,947	0,0009
<i>17DD - E400/NS3</i>	24	C6/36	1,195	5,06e-06
<i>17DD - E400/NS4B</i>	24	C6/36	0,828	0,0081
<i>17DD - II-GFP</i>	24	C6/36	1,564	7,76e-11
<i>17DD - NS3</i>	24	C6/36	1,626	1,18e-10
<i>17DD - NS3/NS4B</i>	24	C6/36	1,465	4,92e-09
<i>17DD - NS4B</i>	24	C6/36	1,390	3,75e-08

<i>Comparação</i>	<i>Horas p.i.</i>	<i>Linhagem celular</i>	<i>Diferença de títulos virais log₁₀-transformados</i>	<i>p-valor</i>
<i>E400 - G1.2/T3</i>	24	C6/36	-0,967	0,0015
<i>E400/NS3 - G1.2/T3</i>	24	C6/36	-1,215	1,09e-05
<i>E400/NS3/NS4B - II-GFP</i>	24	C6/36	1,009	0,0007
<i>E400/NS4B - G1.2/T3</i>	24	C6/36	-0,848	0,0107
<i>E400/NS4B - II-GFP</i>	24	C6/36	0,735	0,0515
<i>G1.2/T3 - II-GFP</i>	24	C6/36	1,584	1,07e-10
<i>G1.2/T3 - NS3</i>	24	C6/36	1,646	2,89e-10
<i>G1.2/T3 - NS3/NS4B</i>	24	C6/36	1,485	1,68e-08
<i>G1.2/T3 - NS4B</i>	24	C6/36	1,410	1,12e-07
<i>17DD - E400</i>	48	C6/36	0,612	0,0651
<i>17DD - E400/NS3</i>	48	C6/36	1,376	5,81e-10
<i>17DD - E400/NS3/NS4B</i>	48	C6/36	1,231	5,26e-08
<i>17DD - E400/NS4B</i>	48	C6/36	1,097	2,30e-06
<i>17DD - II-GFP</i>	48	C6/36	1,248	1,03e-09
<i>17DD - NS3</i>	48	C6/36	1,582	0
<i>17DD - NS3/NS4B</i>	48	C6/36	1,123	1,15e-06
<i>17DD - NS4B</i>	48	C6/36	1,128	9,94e-07
<i>E400 - II-GFP</i>	48	C6/36	0,636	0,0687
<i>E400/NS3 - G1.2/T3</i>	48	C6/36	-1,319	2,12e-08
<i>E400/NS3/NS4B - G1.2/T3</i>	48	C6/36	-1,174	1,15e-06
<i>E400/NS4B - G1.2/T3</i>	48	C6/36	-1,040	3,24e-05
<i>G1.2/T3 - II-GFP</i>	48	C6/36	1,1915	5,43e-08
<i>G1.2/T3 - NS3</i>	48	C6/36	1,525	3,11e-11
<i>G1.2/T3 - NS3/NS4B</i>	48	C6/36	1,066	1,77e-05
<i>G1.2/T3 - NS4B</i>	48	C6/36	1,071	1,54e-05
<i>17DD - E400</i>	72	C6/36	0,733	0,0003
<i>17DD - E400/NS3</i>	72	C6/36	1,155	2,17e-10
<i>17DD - E400/NS3/NS4B</i>	72	C6/36	1,173	1,04e-10
<i>17DD - E400/NS4B</i>	72	C6/36	1,024	2,92e-08
<i>17DD - II-GFP</i>	72	C6/36	1,127	1,27e-11
<i>17DD - NS3</i>	72	C6/36	1,332	7,63e-13
<i>17DD - NS3/NS4B</i>	72	C6/36	1,189	5,63e-11
<i>17DD - NS4B</i>	72	C6/36	1,221	1,60e-11
<i>E400 - G1.2/T3</i>	72	C6/36	-0,640	0,0064
<i>E400/NS3 - G1.2/T3</i>	72	C6/36	-1,061	4,12e-08
<i>E400/NS3/NS4B - G1.2/T3</i>	72	C6/36	-1,080	2,16e-08
<i>E400/NS4B - G1.2/T3</i>	72	C6/36	-0,931	2,85e-06
<i>G1.2/T3 - II-GFP</i>	72	C6/36	1,033	6,10e-09
<i>G1.2/T3 - NS3</i>	72	C6/36	1,238	6,87e-11
<i>G1.2/T3 - NS3/NS4B</i>	72	C6/36	1,096	1,25e-08
<i>G1.2/T3 - NS4B</i>	72	C6/36	1,128	4,08e-09
<i>17DD - E400</i>	96	C6/36	0,967	6,37e-05
<i>17DD - E400/NS3</i>	96	C6/36	0,811	0,0020
<i>17DD - E400/NS3/NS4B</i>	96	C6/36	0,870	0,0005
<i>17DD - E400/NS4B</i>	96	C6/36	0,857	0,0007
<i>17DD - II-GFP</i>	96	C6/36	0,963	8,45e-06
<i>17DD - NS3</i>	96	C6/36	1,080	3,64e-06
<i>17DD - NS3/NS4B</i>	96	C6/36	1,308	5,06e-09
<i>17DD - NS4B</i>	96	C6/36	1,306	5,48e-09
<i>E400/NS3 - G1.2/T3</i>	96	C6/36	-0,793	0,0057

<i>Comparação</i>	<i>Horas p.i.</i>	<i>Linhagem celular</i>	<i>Diferença de títulos virais log₁₀-transformados</i>	<i>p-valor</i>
<i>E400/NS3/NS4B - G1.2/T3</i>	96	C6/36	-0,852	0,0018
<i>E400/NS4B - G1.2/T3</i>	96	C6/36	-0,839	0,0024
<i>G1.2/T3 - II-GFP</i>	96	C6/36	0,945	5,19e-05
<i>G1.2/T3 - NS3</i>	96	C6/36	1,062	1,93e-05
<i>G1.2/T3 - NS3/NS4B</i>	96	C6/36	1,290	4,88e-08
<i>G1.2/T3 - NS4B</i>	96	C6/36	1,288	5,25e-08
<i>17DD - E400</i>	120	C6/36	0,968	0,0006
<i>17DD - E400/NS3/NS4B</i>	120	C6/36	0,809	0,0109
<i>17DD - E400/NS4B</i>	120	C6/36	0,844	0,0062
<i>17DD - NS3</i>	120	C6/36	1,035	0,00017
<i>17DD - NS3/NS4B</i>	120	C6/36	1,125	2,51e-05
<i>17DD - NS4B</i>	120	C6/36	1,021	0,0002
<i>E400 - G1.2/T3</i>	120	C6/36	-1,207	1,30e-05
<i>E400/NS3 - G1.2/T3</i>	120	C6/36	-0,865	0,0081
<i>E400/NS3/NS4B - G1.2/T3</i>	120	C6/36	-1,049	0,0003
<i>E400/NS4B - G1.2/T3</i>	120	C6/36	-1,083	0,0001
<i>G1.2/T3 - II-GFP</i>	120	C6/36	0,758	0,0164
<i>G1.2/T3 - NS3</i>	120	C6/36	1,275	2,89e-06
<i>G1.2/T3 - NS3/NS4B</i>	120	C6/36	1,365	3,47e-07
<i>G1.2/T3 - NS4B</i>	120	C6/36	1,261	3,97e-06
<i>17DD - E400</i>	24	Huh7	0,764	0,0664
<i>17DD - E400/NS3</i>	24	Huh7	0,976	0,0037
<i>17DD - II-GFP</i>	24	Huh7	1,183	0,0001
<i>17DD - NS3</i>	24	Huh7	0,961	0,0047
<i>17DD - NS4B</i>	24	Huh7	1,036	0,0014
<i>E400/NS3 - G1.2/T3</i>	24	Huh7	-0,806	0,0405
<i>G1.2/T3 - II-GFP</i>	24	Huh7	1,013	0,0021
<i>G1.2/T3 - NS3</i>	24	Huh7	0,791	0,0485
<i>G1.2/T3 - NS4B</i>	24	Huh7	0,866	0,0188
<i>17DD - E400/NS3</i>	48	Huh7	0,886	0,0029
<i>17DD - E400/NS3/NS4B</i>	48	Huh7	0,661	0,0865
<i>E400 - G1.2/T3</i>	48	Huh7	-0,846	0,0058
<i>E400/NS3 - G1.2/T3</i>	48	Huh7	-1,403	2,63e-08
<i>E400/NS3/NS4B - G1.2/T3</i>	48	Huh7	-1,178	7,31e-06
<i>E400/NS4B - G1.2/T3</i>	48	Huh7	-0,966	0,0006
<i>G1.2/T3 - II-GFP</i>	48	Huh7	1,090	5,26e-05
<i>G1.2/T3 - NS3</i>	48	Huh7	0,817	0,0094
<i>G1.2/T3 - NS3/NS4B</i>	48	Huh7	1,004	0,0003
<i>17DD - E400/NS3</i>	72	Huh7	0,874	8,03e-05
<i>17DD - E400/NS3/NS4B</i>	72	Huh7	0,680	0,0071
<i>17DD - G1.2/T3</i>	72	Huh7	-0,923	2,18e-05
<i>E400 - G1.2/T3</i>	72	Huh7	-1,432	1,91e-12
<i>E400/NS3 - G1.2/T3</i>	72	Huh7	-1,797	6,10e-13
<i>E400/NS3 - II-GFP</i>	72	Huh7	-0,710	0,0037
<i>E400/NS3/NS4B - G1.2/T3</i>	72	Huh7	-1,603	6,06e-13
<i>E400/NS4B - G1.2/T3</i>	72	Huh7	-1,414	3,17e-12
<i>G1.2/T3 - II-GFP</i>	72	Huh7	1,086	1,89e-07
<i>G1.2/T3 - NS3</i>	72	Huh7	0,986	3,75e-06
<i>G1.2/T3 - NS3/NS4B</i>	72	Huh7	1,125	5,58e-08
<i>G1.2/T3 - NS4B</i>	72	Huh7	0,877	7,28e-05

<i>Comparação</i>	<i>Horas p.i.</i>	<i>Linhagem celular</i>	<i>Diferença de títulos virais log₁₀-transformados</i>	<i>p-valor</i>
<i>17DD - E400</i>	96	Huh7	0,776	0,0179
<i>17DD - E400/NS3</i>	96	Huh7	0,980	0,0005
<i>17DD - E400/NS3/NS4B</i>	96	Huh7	0,866	0,0041
<i>17DD - E400/NS4B</i>	96	Huh7	0,660	0,0883
<i>17DD - G1.2/T3</i>	96	Huh7	-0,928	0,0013
<i>E400 - G1.2/T3</i>	96	Huh7	-1,704	0
<i>E400 - II-GFP</i>	96	Huh7	-0,791	0,0143
<i>E400/NS3 - G1.2/T3</i>	96	Huh7	-1,908	0
<i>E400/NS3 - II-GFP</i>	96	Huh7	-0,995	0,0003
<i>E400/NS3/NS4B - G1.2/T3</i>	96	Huh7	-1,794	0
<i>E400/NS3/NS4B - II-GFP</i>	96	Huh7	-0,881	0,0032
<i>E400/NS4B - G1.2/T3</i>	96	Huh7	-1,588	1,33e-10
<i>E400/NS4B - II-GFP</i>	96	Huh7	-0,674	0,0736
<i>G1.2/T3 - II-GFP</i>	96	Huh7	0,913	0,0018
<i>G1.2/T3 - NS3</i>	96	Huh7	0,901	0,0022
<i>G1.2/T3 - NS3/NS4B</i>	96	Huh7	1,067	8,65e-05
<i>G1.2/T3 - NS4B</i>	96	Huh7	0,915	0,0017
<i>17DD - E400/NS3</i>	120	Huh7	1,244	3,29e-05
<i>17DD - E400/NS3/NS4B</i>	120	Huh7	1,348	3,97e-06
<i>17DD - E400/NS4B</i>	120	Huh7	0,817	0,0355
<i>E400 - G1.2/T3</i>	120	Huh7	-1,016	0,0020
<i>E400/NS3 - G1.2/T3</i>	120	Huh7	-1,655	3,28e-09
<i>E400/NS3 - II-GFP</i>	120	Huh7	-1,173	0,0001
<i>E400/NS3/NS4B - G1.2/T3</i>	120	Huh7	-1,758	2,97e-10
<i>E400/NS3/NS4B - II-GFP</i>	120	Huh7	-1,276	1,73e-05
<i>E400/NS4B - G1.2/T3</i>	120	Huh7	-1,227	4,60e-05
<i>E400/NS4B - II-GFP</i>	120	Huh7	-0,745	0,0823
<i>G1.2/T3 - NS3/NS4B</i>	120	Huh7	1,003	0,0024



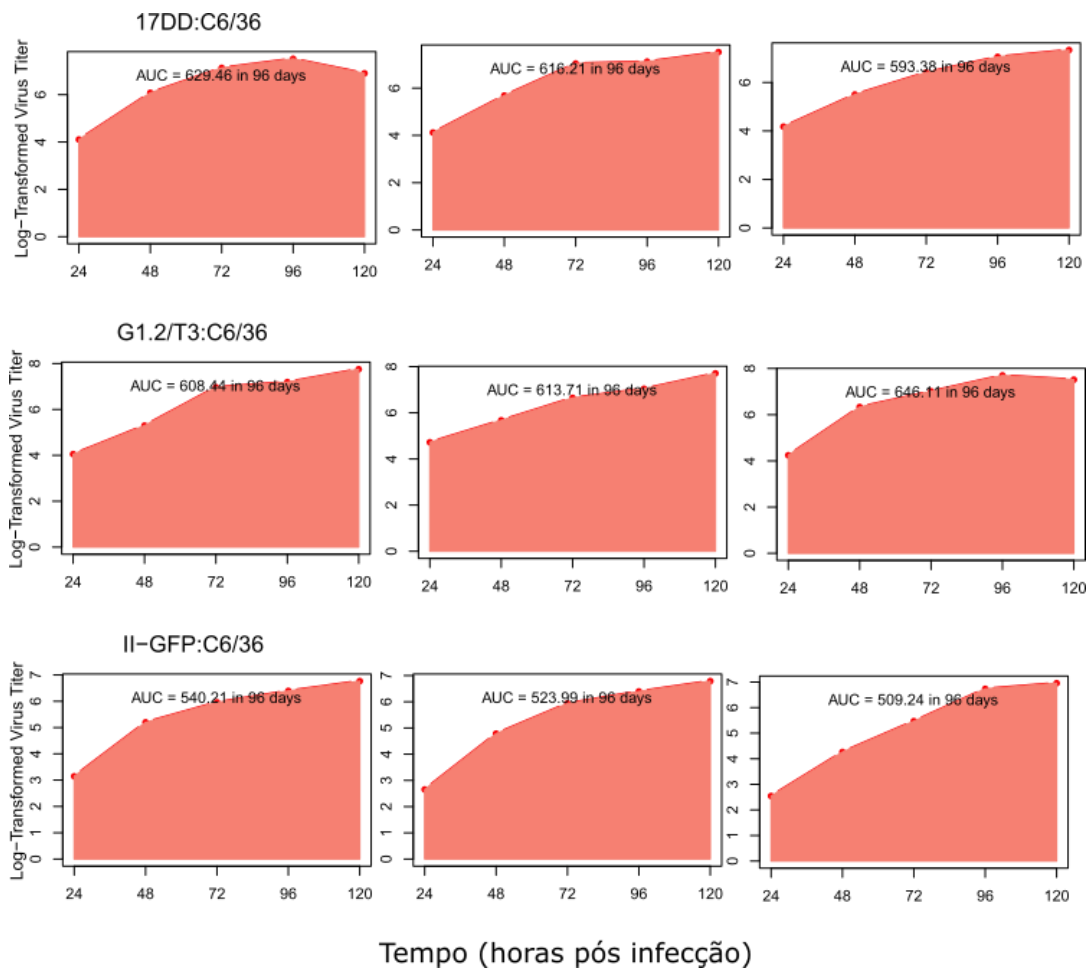


Figura A2 – Análise de área sob a curva das curvas de proliferação dos vírus FA controles nas três linhagens celulares.

As áreas sob as curvas de proliferação geradas para cada replicata experimental dos vírus FA controles foram calculadas, e estão representadas em rosa.

Tabela A2 – Comparação da área sob a curva entre os vírus FA controles em cada linhagem celular

<i>Comparação</i>	<i>Linhagem celular</i>	<i>Diferença de área sob a curva</i>	<i>p-valor</i>
<i>17DD - G1.2/T3</i>	Vero	-44,135	0,0012
<i>17DD - II-GFP</i>	Vero	-2,575	0,9784
<i>G1.2/T3 - II-GFP</i>	Vero	41,559	0,0085
<i>17DD - G1.2/T3</i>	C6/36	1,003	0,9960
<i>17DD - II-GFP</i>	C6/36	104,746	0,0000
<i>G1.2/T3 - II-GFP</i>	C6/36	103,743	0,0000
<i>17DD - G1.2/T3</i>	Huh7	-59,230	0,0003
<i>17DD - II-GFP</i>	Huh7	31,733	0,0798
<i>G1.2/T3 - II-GFP</i>	Huh7	90,963	7,78e-08

ANEXO III – Análise de qualidade das estruturas tridimensionais das proteínas E e NS3

Estrutura molde 5IRE

ERRAT: 71, 523

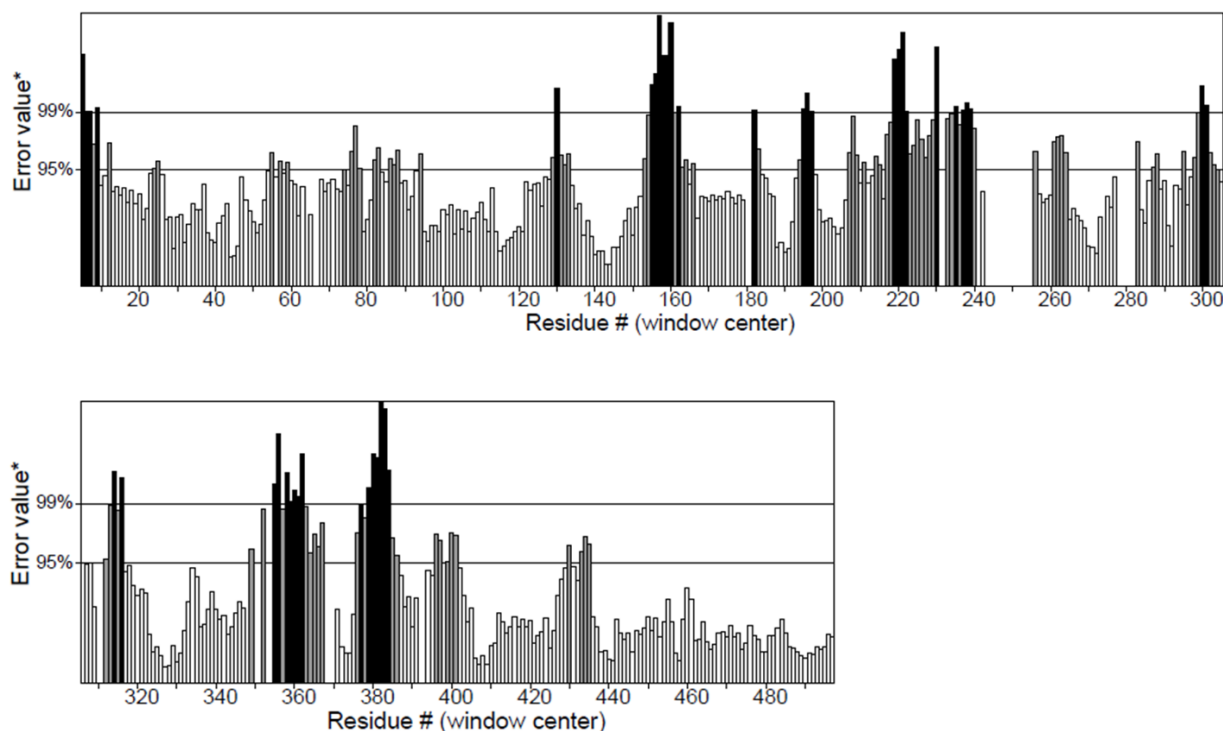


Figura A3 – Gráfico dos valores de ERRAT por resíduo da estrutura molde 5IRE da proteína E.

O histograma foi gerado pelo programa *online* ERRAT, onde as barras escuras representam regiões com maior probabilidade de erro, ultrapassando o limiar de 95 % ou 99 %.

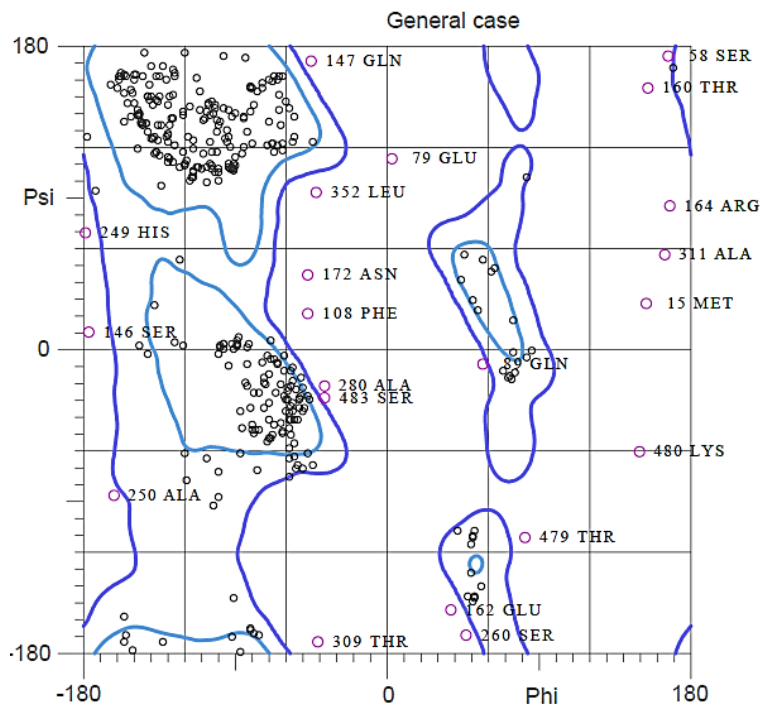


Figura A4 – Gráfico de Ramachandran da estrutura molde 5IRE da proteína E.

O gráfico foi gerado pelo programa *online* MolProbity, onde as áreas delimitadas em azul claro representam as regiões favorecidas, e em azul escuro, as regiões permitidas. Os círculos rosas representam os resíduos da estrutura que são considerados *outliers*.

Estrutura da proteína E de referência

ERRAT: 78, 914

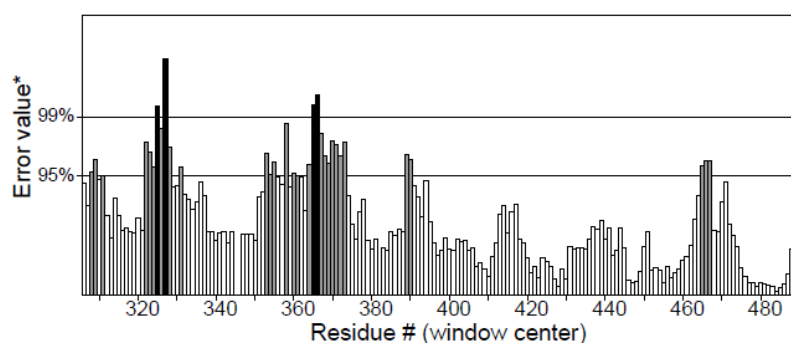
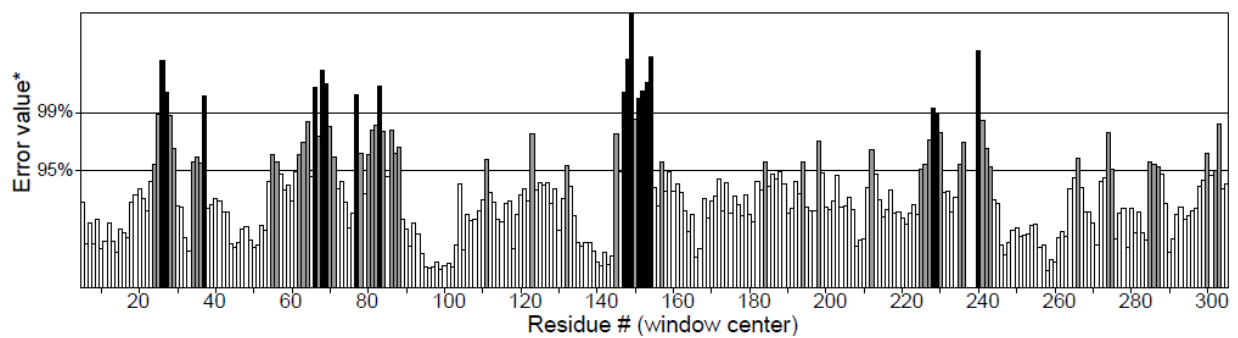


Figura A5 – Gráfico dos valores de ERRAT por resíduo da estrutura da proteína E de referência.

O histograma foi gerado pelo programa *online* ERRAT, onde as barras escuras representam regiões com maior probabilidade de erro, ultrapassando o limiar de 95 % ou 99 %.

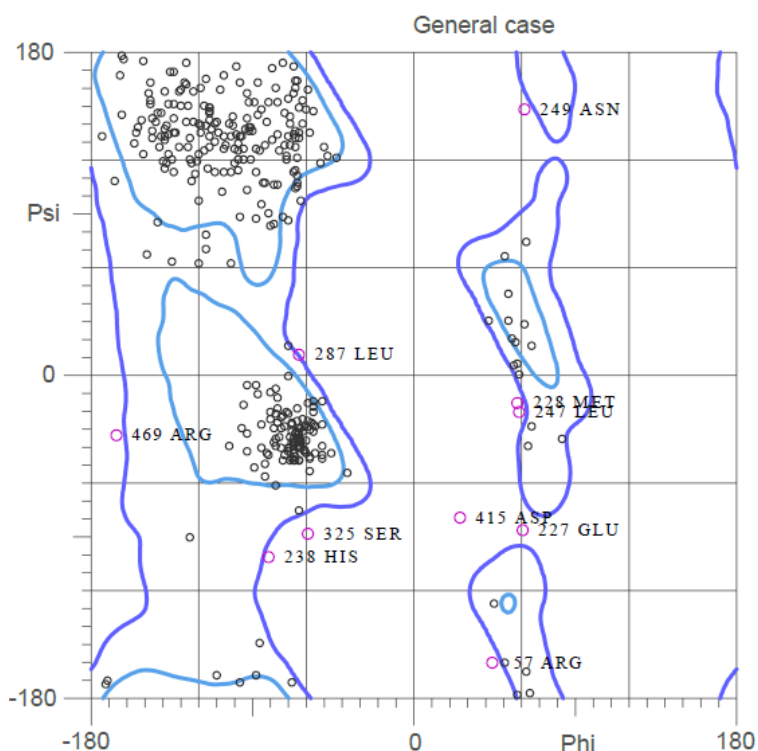
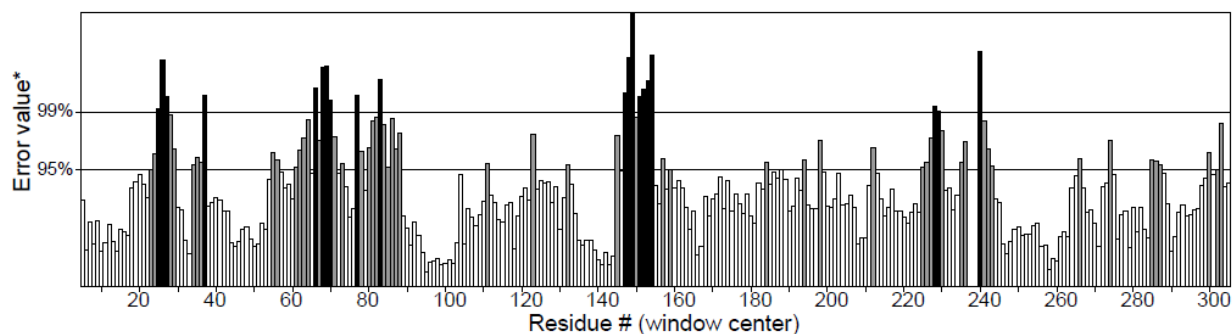


Figura A6 – Gráfico de Ramachandran da estrutura da proteína E de referência.

O gráfico foi gerado pelo programa *online* MolProbity, onde as áreas delimitadas em azul claro representam as regiões favorecidas, e em azul escuro, as regiões permitidas. Os círculos rosas representam os resíduos da estrutura que são considerados *outliers*.

Estrutura da proteína E₄₀₀

ERRAT: 77, 406



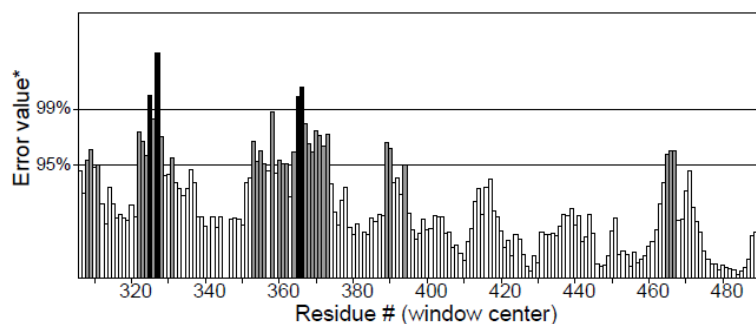


Figura A7 – Gráfico dos valores de ERRAT por resíduo da estrutura da proteína E400. O histograma foi gerado pelo programa *online* ERRAT, onde as barras escuras representam regiões com maior probabilidade de erro, ultrapassando o limiar de 95 % ou 99 %.

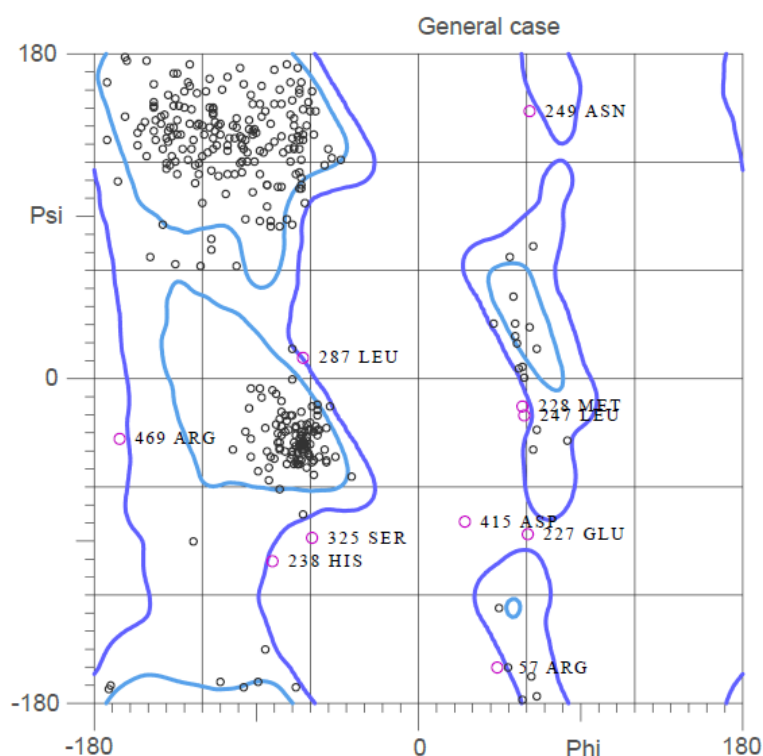


Figura A6 – Gráfico de Ramachandran da estrutura da proteína E400. O gráfico foi gerado pelo programa *online* MolProbity, onde as áreas delimitadas em azul claro representam as regiões favorecidas, e em azul escuro, as regiões permitidas. Os círculos rosas representam os resíduos da estrutura que são considerados *outliers*.

Estrutura da proteína E₄₀₃

ERRAT: 78, 033

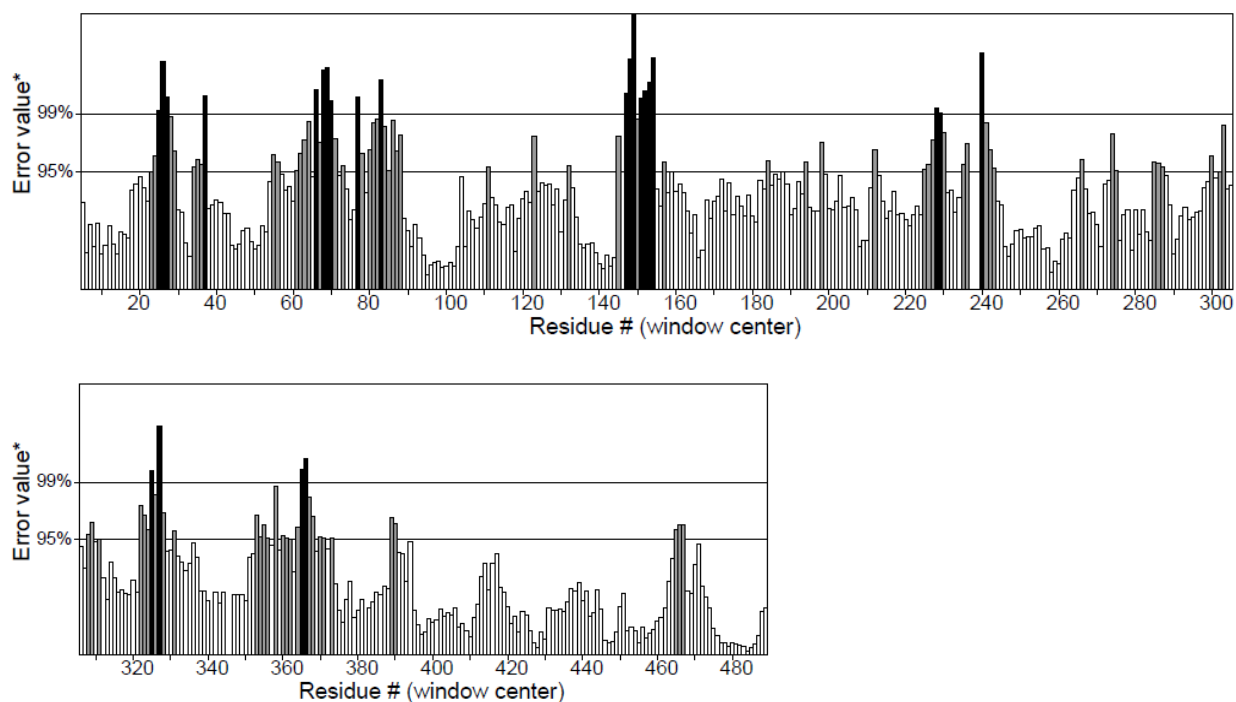


Figura A8 – Gráfico dos valores de ERRAT por resíduo da estrutura da proteína E₄₀₃. O histograma foi gerado pelo programa *online* ERRAT, onde as barras escuras representam regiões com maior probabilidade de erro, ultrapassando o limiar de 95 % ou 99 %.

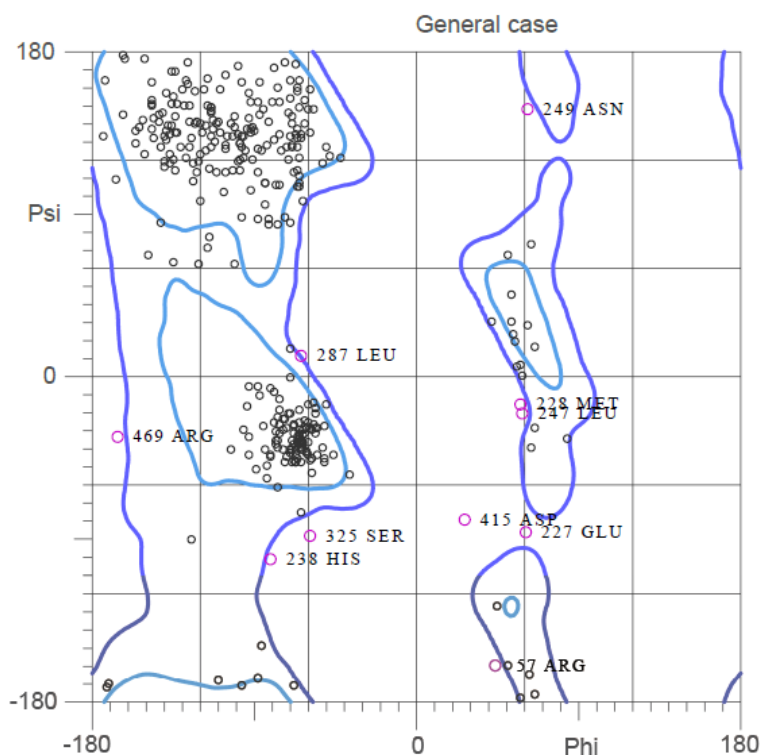
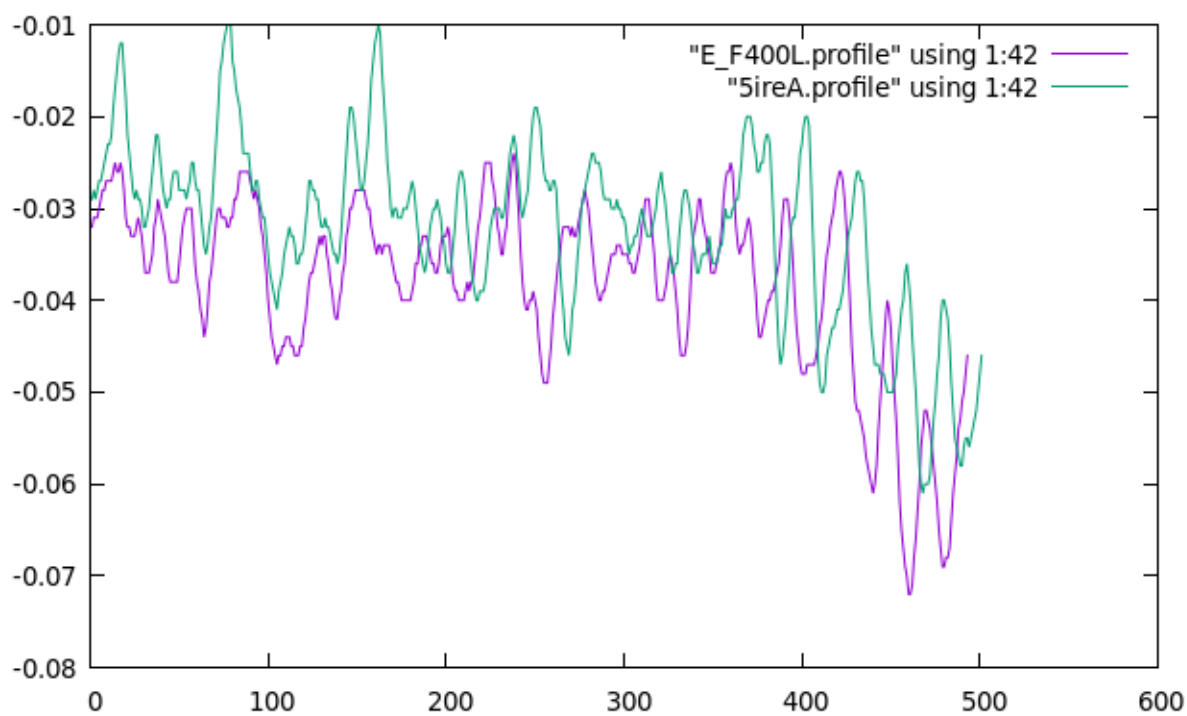
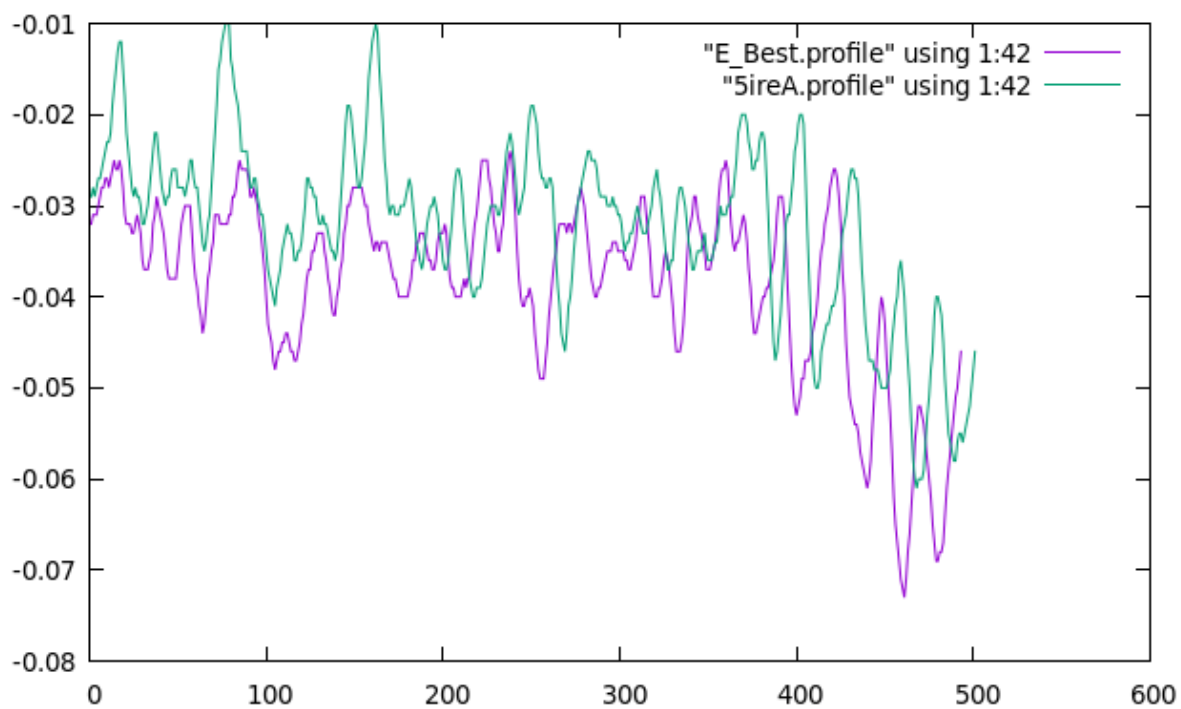


Figura A9 – Gráfico de Ramachandran da estrutura da proteína E₄₀₃.

O gráfico foi gerado pelo programa *online* MolProbity, onde as áreas delimitadas em azul claro representam as regiões favorecidas, e em azul escuro, as regiões permitidas. Os círculos rosas representam os resíduos da estrutura que são considerados *outliers*.



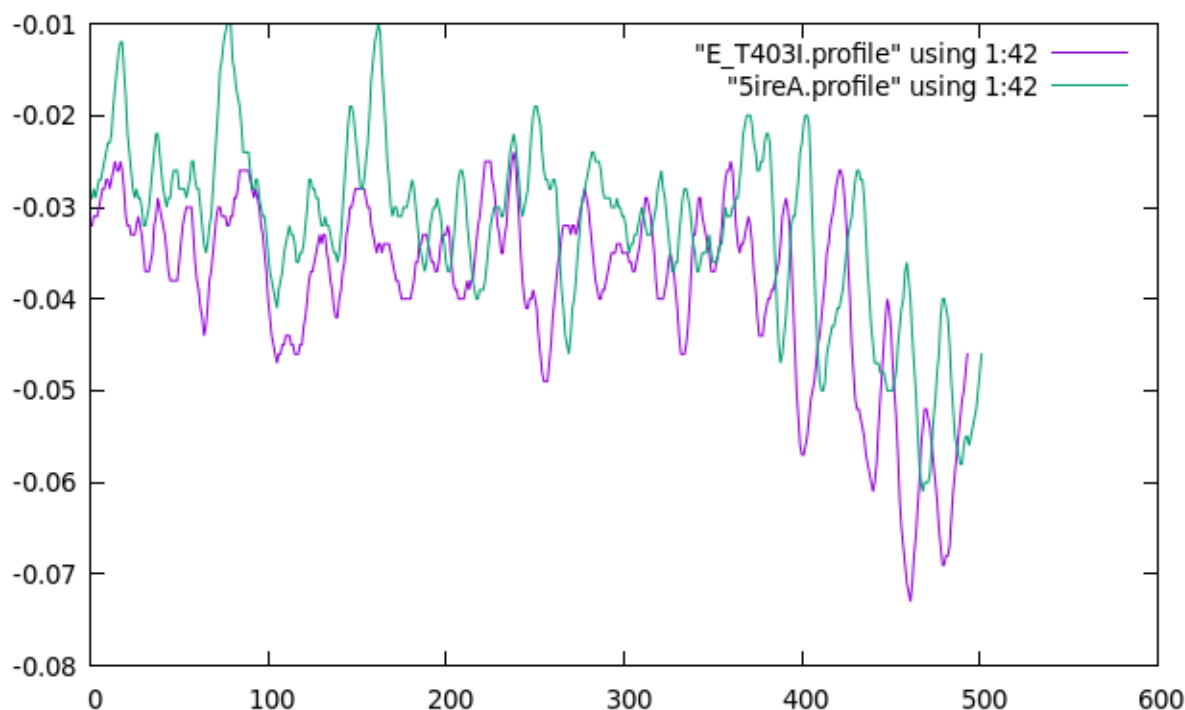


Figura A10 - Gráficos comparativos do DOPE score da estrutura molde e das estruturas modeladas da proteína E.

Os gráficos foram obtidos pelo programa gnuplot utilizando os valores de DOPE score por aminoácido do perfil de energia das estruturas geradas pelo programa Modeller 9.18. A estrutura molde está identificada como 5ireA e os valores de DOPE score referentes aos resíduos desta estrutura estão representados pela curva em verde claro. O perfil das estruturas modeladas está sempre representado pelas curvas em lilás. A estrutura da proteína E de referência está identificada como E_Best, a estrutura da proteína E₄₀₀, como E_F400L, e a estrutura da proteína E₄₀₃, como E_T403I.

Estrutura molde 1YKS

ERRAT: 93, 451

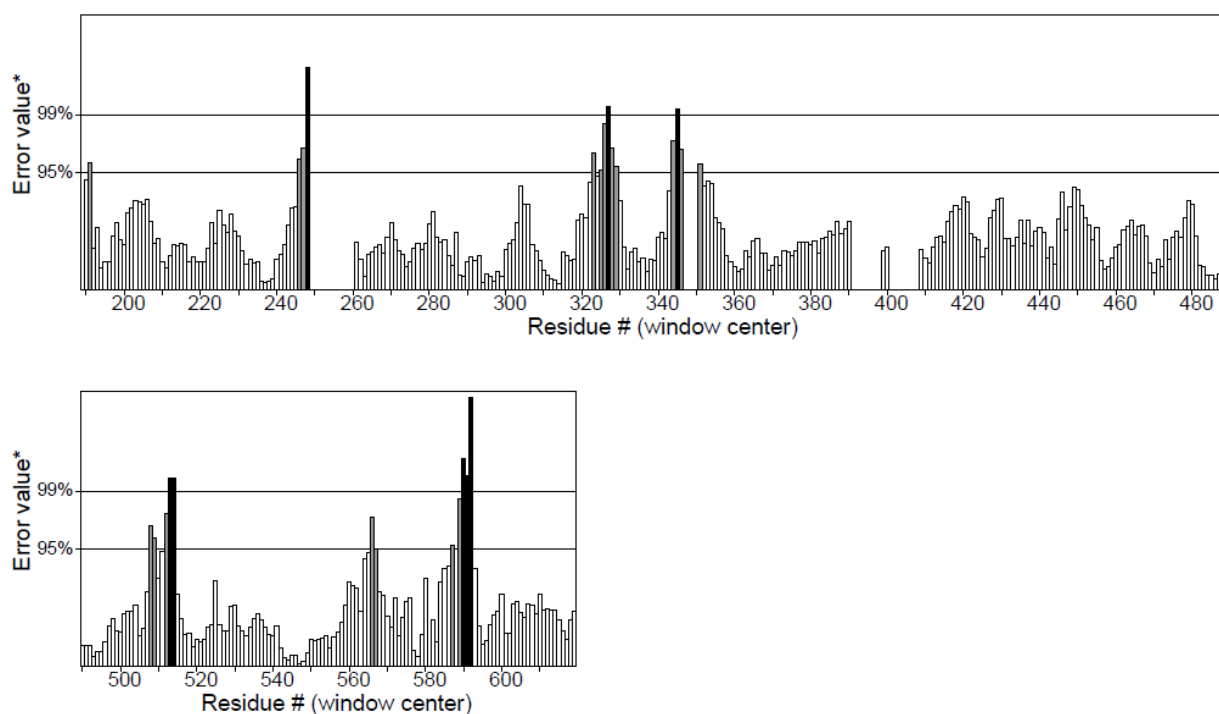


Figura A11 – Gráfico dos valores de ERRAT por resíduo da estrutura molde 1YKS do domínio helicase da proteína NS3.

O histograma foi gerado pelo programa *online* ERRAT, onde as barras escuras representam regiões com maior probabilidade de erro, ultrapassando o limiar de 95 % ou 99 %.

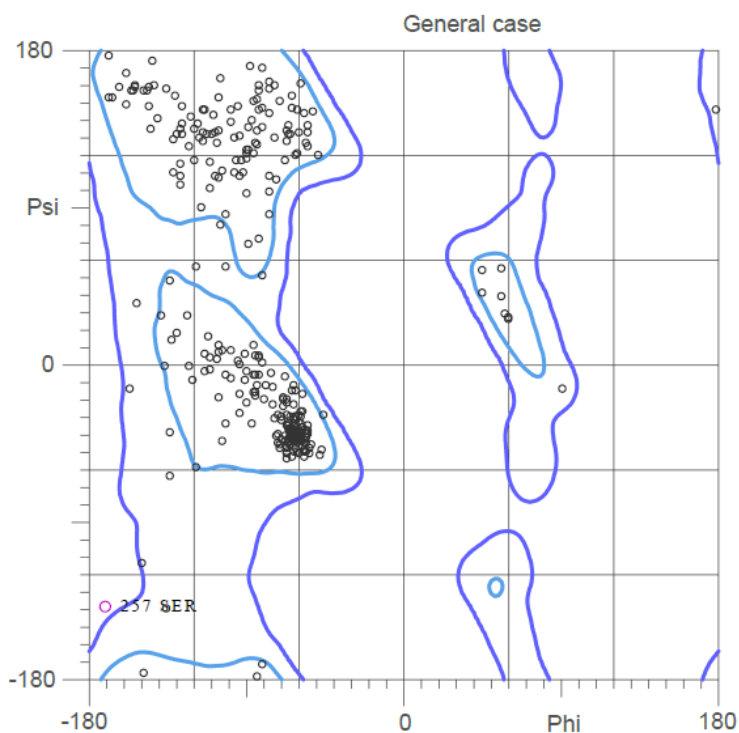


Figura A12 – Gráfico de Ramachandran da estrutura molde 1YKS da proteína NS3_{hel}.

O gráfico foi gerado pelo programa *online* MolProbity, onde as áreas delimitadas em azul claro representam as regiões favorecidas, e em azul escuro, as regiões permitidas. Os círculos rosas representam os resíduos da estrutura que são considerados *outliers*.

Estrutura da proteína NS3 de referência

ERRAT: 95, 192

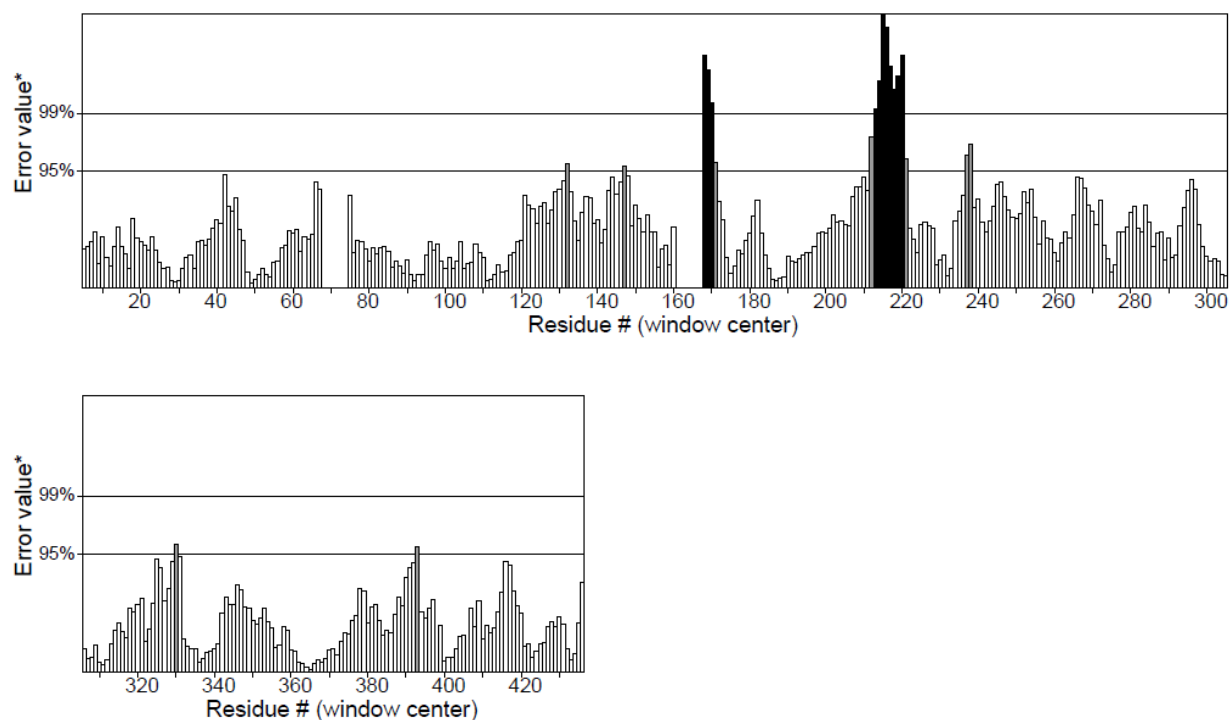


Figura A13 – Gráfico dos valores de ERRAT por resíduo da estrutura do domínio helicase da proteína NS3 de referência.

O histograma foi gerado pelo programa *online* ERRAT, onde as barras escuras representam regiões com maior probabilidade de erro, ultrapassando o limiar de 95 % ou 99 %. Apenas o domínio helicase foi modelado, a partir da estrutura molde 1YKS. Portanto, o resíduo de interesse, que se encontra na posição 439 na proteína NS3, se encontra na posição 296 do domínio helicase.

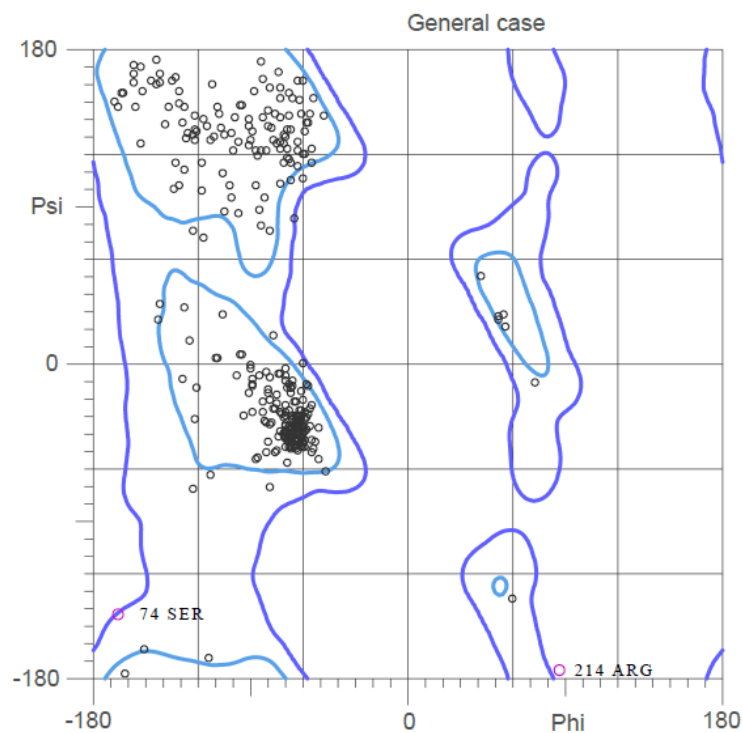
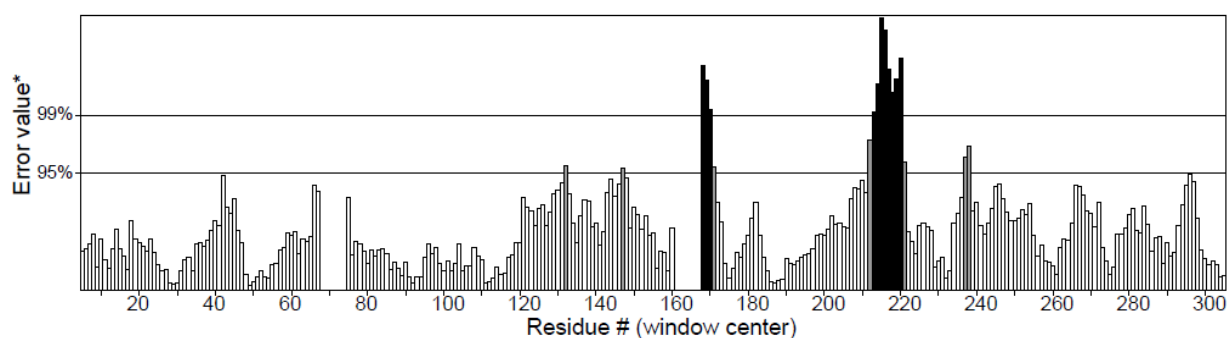


Figura A14 – Gráfico de Ramachandran da estrutura da proteína NS3_{hel} de referência.

O gráfico foi gerado pelo programa *online* MolProbity, onde as áreas delimitadas em azul claro representam as regiões favorecidas, e em azul escuro, as regiões permitidas. Os círculos rosas representam os resíduos da estrutura que são considerados *outliers*. Apenas o domínio helicase foi modelado, a partir da estrutura molde 1YKS. Portanto, o resíduo de interesse, que se encontra na posição 439 na proteína NS3, se encontra na posição 296 do domínio helicase.

Estrutura da proteína NS3₄₃₉

ERRAT: 77, 406



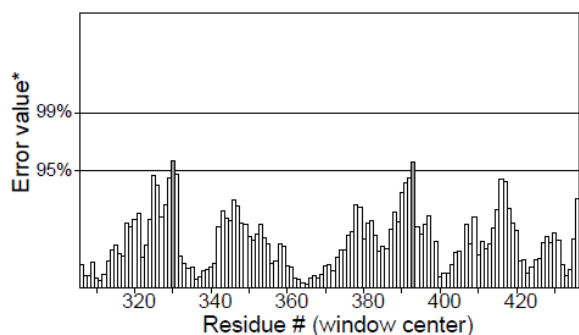


Figura A15 – Gráfico dos valores de ERRAT por resíduo da estrutura do domínio helicase da proteína NS3₄₃₉.

O histograma foi gerado pelo programa *online* ERRAT, onde as barras escuras representam regiões com maior probabilidade de erro, ultrapassando o limiar de 95 % ou 99 %. Apenas o domínio helicase foi modelado, a partir da estrutura molde 1YKS. Portanto, o resíduo de interesse, que se encontra na posição 439 na proteína NS3, se encontra na posição 296 do domínio helicase.

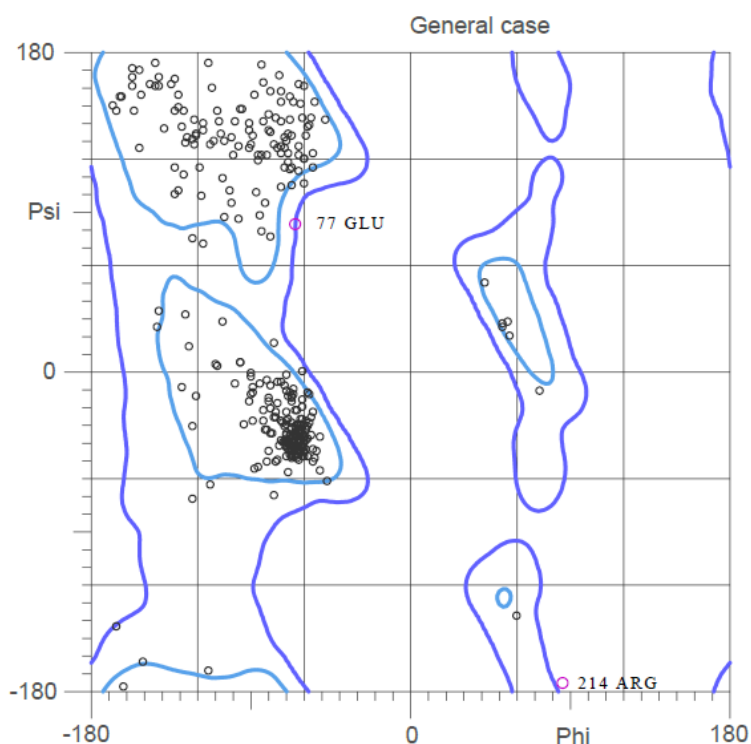


Figura A16 – Gráfico de Ramachandran da estrutura do domínio helicase da proteína NS3₄₃₉.

O gráfico foi gerado pelo programa *online* MolProbity, onde as áreas delimitadas em azul claro representam as regiões favorecidas, e em azul escuro, as regiões permitidas. Os círculos rosas representam os resíduos da estrutura que são considerados *outliers*. Apenas o domínio helicase foi modelado, a partir da estrutura molde 1YKS. Portanto, o resíduo de interesse, que se encontra na posição 439 na proteína NS3, se encontra na posição 296 do domínio helicase.

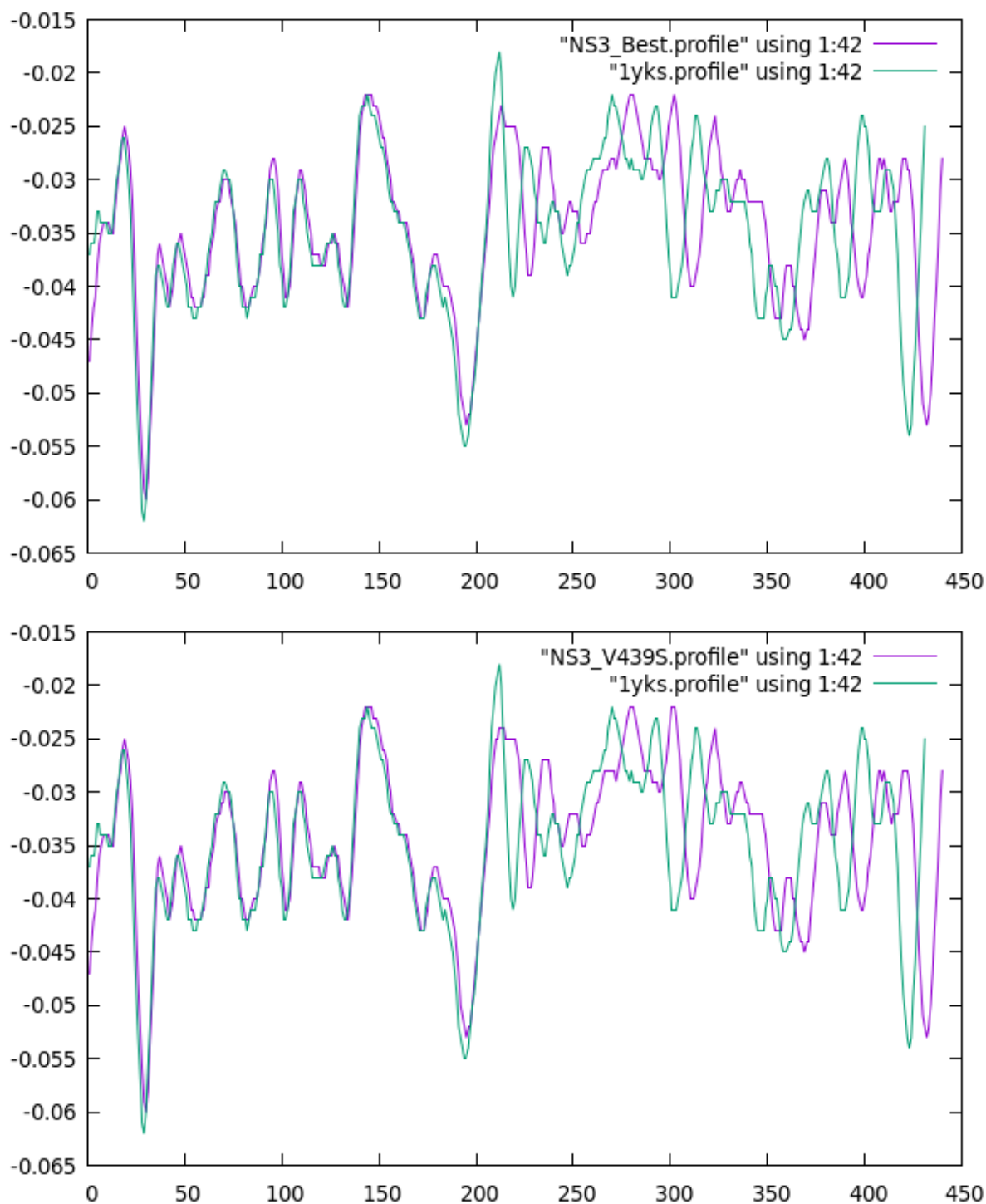


Figura A17 - Gráficos comparativos do DOPE score da estrutura molde e das estruturas modeladas da proteína NS3_{hel}.

Os gráficos foram obtidos pelo programa gnuplot utilizando os valores de DOPE score por aminoácido do perfil de energia das estruturas geradas pelo programa Modeller 9.18. A estrutura molde está identificada como 1yks e os valores de DOPE score referentes aos resíduos desta estrutura estão representados pela curva em verde claro. O perfil das estruturas modeladas está sempre representado pelas curvas em lilás. A estrutura da proteína NS3 de referência está identificada como NS3_Best e a estrutura da proteína NS3₄₃₉, como NS3_V439S.

ANEXO IV – Medidas das áreas superficiais acessíveis por resíduo da proteína E

Tabela A3 – Medidas de SASA dos aminoácidos da α -hélice H1 das estruturas das proteínas E de referência e E₄₀₀.

<i>Proteína E de referência</i>			<i>Proteína E₄₀₀</i>		
Resíduo	Posição	SASA	Resíduo	Posição	SASA
I	:396	141,721	I	:396	163,016
G	:397	21,265	G	:397	23,560
K	:398	75,559	K	:398	75,918
L	:399	114,114	L	:399	119,297
F	:400	159,257	F	:400	139,827
T	:401	73,163	T	:401	67,888
Q	:402	73,923	Q	:402	74,034
T	:403	74,979	T	:403	70,863
M	:404	123,360	M	:404	112,342
K	:405	15,854	K	:405	15,814
G	:406	23,909	G	:406	23,964
V	:407	30,702	V	:407	30,741
E	:408	26,092	E	:408	26,188
R	:409	3,920	R	:409	3,970
L	:410	36,543	L	:410	36,569
A	:411	12,216	A	:411	12,188
V	:412	93,156	V	:412	93,115
M	:413	26,457	M	:413	26,483
G	:414	7,031	G	:414	7,030
D	:415	45,235	D	:415	45,311
T	:416	8,918	T	:416	8,965
A	:417	5,023	A	:417	4,979
W	:418	51,906	W	:418	52,346
D	:419	1,753	D	:419	1,769
F	:420	30,298	F	:420	30,650
S	:421	53,111	S	:421	51,802
S	:422	9,458	S	:422	9,905