

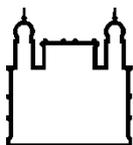
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE CÉLULAS MUSCULARES
ESQUELÉTICAS DE EMBRIÕES DE *GALLUS GALLUS DOMESTICUS*
(LINNEAUS, 1758) PELO VÍRUS DA FEBRE AMARELA 17DD

YULI RODRIGUES MAIA DE SOUZA

Rio de Janeiro
Agosto de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

YULI RODRIGUES MAIA DE SOUZA

Infecção experimental de células musculares esqueléticas de embriões de *Gallus gallus domesticus* (Linneaus, 1758) pelo vírus da febre amarela 17DD.

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Paulo de Abreu Manso

RIO DE JANEIRO

Agosto de 2017

Souza, Yuli Rodrigues Maia de.

Infecção experimental de células musculares esqueléticas de embriões de *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus, 1758) pelo vírus da febre amarela 17DD.
/ Yuli Rodrigues Maia de Souza. - Rio de Janeiro, 2017.

128 f.

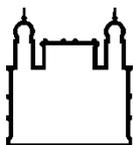
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientador: Marcelo Pelajo Machado.

Co-orientador: Pedro Paulo de Abreu Manso.

Bibliografia: f. 118-128

1. Febre Amarela. 2. Vacina FA17DD. 3. Embrião de galinha. 4. Células musculares esqueléticas. 5. Cultura de células . I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: YULI RODRIGUES MAIA DE SOUZA

INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS DE EMBRIÕES DE *GALLUS GALLUS DOMESTICUS* (LINNEAUS, 1758) PELO VÍRUS DA FEBRE AMARELA 17DD

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Pedro Paulo de Abreu Manso

Aprovada em: 24/08/2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Nome – Myrna Cristina Bonaldo - Presidente (IOC - FIOCRUZ)

Prof. Dr. Nome – Débora Ferreira Barreto Vieira (IOC - FIOCRUZ)

Prof. Dr. Nome – Cláudia dos Santos Mermelstein (UFRJ)

Prof. Dr. Nome – Priscila Tavares Guedes (UNIRIO)

Prof. Dr. Nome – Jaqueline Mendes de Oliveira (IOC - FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 24 de Agosto de 2017

Dedico este trabalho à minha amada mãe, Yasue Rodrigues, que entre todas as pessoas foi quem mais se desdobrou para que eu chegasse a este momento.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus.

Agradeço também a minha família que esteve comigo durante essa jornada. Especialmente a minha mãe Yasue, pelos melhores conselhos, minhas irmãs Priscila e Marcelle, ao meu Pai João Luiz e meu padrasto Josemar.

Agradeço também aos amigos da vida, em especial à Dora Moura e Andressa Silva.

Agradeço a todos os professores que já passaram na minha vida, desde o colégio até agora. Alguns me marcaram e me estimularam a buscar cada vez mais o conhecimento. Os mais recentes professores possuem o nome de orientadores, e são eles o Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado, Prof. Dr. Pedro Paulo de Abreu Manso e Profa. Dra. Barbara Cristina Euzébio Pereira Dias de Oliveira.

Agradeço a todos integrantes do Laboratório de Patologia. Em especial, gostaria de agradecer aos amigos: Márcia Terra, Juliane Siqueira, Nathália Portilho, Thalita Paschoal, Fernanda Bottino, Leonardo Oliveira e Igor José da Silva.

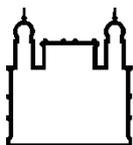
Agradeço à Dra. Myrna Bonaldo e à Lidiane Menezes do Laboratório de Biologia de Flavivírus/IOC por toda ajuda intelectual e com a titulação viral, à Dra. Andrea Henriques Pons do Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos/IOC pelos anticorpos, em especial ao Pax7, à Dra. Rita Nogueira do Laboratório de Flavivírus/IOC pelo anticorpo anti- febre amarela, à Dra. Cláudia Mermelstein e Dra. Ivone Rosa do Laboratório de Diferenciação Mucular e Citoesqueleto/UFRJ e Dra. Helene dos Santos Barbosa do laboratório de Biologia Estrutural/IOC que me auxiliaram com a cultura de células.

Gostaria de agradecer a FIOCRUZ, ao IOC, a pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, em especial a Dra. Leila Mendonça Lima e a Julimar Ferreira. Por fim, agradeço também ao CNPq e à FAPERJ pelo fomento.

A todos, o meu muito obrigada.

“Acho que o amor pelo trabalho e a dedicação são a base da felicidade. Para um pesquisador, os momentos inesquecíveis de sua vida são aqueles raros momentos que chegam após anos de trabalho difícil, quando o véu que recobre um segredo da natureza parece subitamente erguer-se e o que era escuro e caótico surge sob uma bela forma e uma clara luz”

- Gerty Radnitz Cori



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

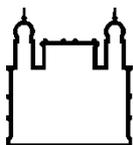
ESTUDO DAS CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS DE *GALLUS GALUS DOMESTICUS* (LINNAEUS, 1758) INFECTADAS COM VÍRUS DA FEBRE AMARELA 17DD

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Yuli Rodrigues Maia de Souza

A vacina contra febre amarela é produzida a partir da inoculação da amostra FA 17DD em ovos embrionados de galinha no nono dia de desenvolvimento. Os embriões inteiros são coletados no décimo segundo dia de desenvolvimento para formulação da vacina. Este processo de produção permite que uma grande quantidade de proteína de galinha faça parte da formulação final da vacina, contraindicando o seu uso a pessoas que são alérgicas a estes componentes. No momento da coleta, após 72 horas de infecção, o tecido muscular esquelético é o principal tecido infectado e responsável pela biossíntese de partículas virais. Neste tecido, as primeiras células a serem infectadas possuem morfologia sugestiva de mioblasto. O presente trabalho descreveu fenotipicamente estas células como precursoras miogênicas que expressam em alguns casos o fator de transcrição Pax7. Além disso, células musculares esqueléticas de embrião de galinha são susceptíveis e permissíveis à infecção *in vitro*, e mantém o padrão de infecção observado *in vivo*. Precusores miogênicos e mioblastos são alvos preferenciais de infecção, porém o estabelecimento da infecção não depende da presença destes tipos celulares. *In vitro*, o pico de produção viral ocorre em 48 horas após a infecção e decai após 72 horas acompanhado da observação de um efeito citopático da cultura. *In vivo*, a infecção se esgota no tecido muscular esquelético após 120 horas de infecção sem a presença de infiltrado inflamatório associado ao fim da infecção. Os dados deste trabalho nos permitem concluir que a cultura de células musculares esqueléticas é um bom modelo para o estudo da infecção pelo vírus 17DD, pois apresenta boa reprodutibilidade do fenômeno observado *in vivo*, e nos leva a perspectiva do desenvolvimento de métodos alternativos de produção da vacina baseados em uma plataforma de cultura de células.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

STUDY OF GALLUS GALUS DOMESTICUS SKELETAL MUSCLE CELLS (LINNAEUS, 1758) INFECTED WITH YELLOW FEVER VIRUS 177DD

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Yuli Rodrigues Maia de Souza

The yellow fever vaccine is produced from the inoculation of the YF 17DD sample in chicken embryonic eggs on the ninth day of development. The whole embryos are collected on the twelfth day of development for vaccine formulation. This production process allows a large amount of chicken protein to be part of the final formulation of the vaccine, contraindicating its use to people who are allergic to these compounds. At the time of collection, after 72 hours of infection, the skeletal muscle tissue is the main infected tissue and responsible for the biosynthesis of viral particles. In this tissue, the first cells to be infected have morphology suggestive of myoblast. The present work has phenotypically described these cells as myogenic precursors that in some cases express the Pax7 transcription factor. In addition, skeletal chicken embryo muscle cells are susceptible and permissive for *in vitro* infection, besides to the maintenance of the pattern of infection observed *in vivo*. Myogenic precursors and myoblasts are preferred targets of infection, but the establishment of infection does not depend on the presence of these cell types. *In vitro*, peak viral production occurs within 48 hours after infection and decays after 72 hours accompanied by the observation of a cytopathic effect of the culture. *In vivo*, the infection is depleted in skeletal muscle tissue after 120 hours of infection without the presence of inflammatory infiltrate associated with the end of infection. The data of this work allow us to conclude that the skeletal muscle cell primary culture is a good model for the study of the infection of muscle cells with 17DD virus, since it presents good reproducibility of the phenomenon observed *in vivo*, contributing to the understanding of the virus infection and leads us to the perspective of developing alternative methods of producing the vaccine based on a cell culture platform.

ÍNDICE

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Vírus da febre amarela	16
1.2 Patogênese da febre amarela	19
1.3 Epidemiologia da febre amarela.....	24
1.4 Desenvolvimento da vacina contra febre amarela e características atuais da FA17DD	28
1.5 Infecção em ovos embrionados de <i>Gallus gallus domesticus</i>	31
1.6 Desenvolvimento do tecido muscular esquelético	32
1.7 Cultura de células musculares esqueléticas	37
1.8 Justificativa.....	39
2 OBJETIVOS	41
2.1 Objetivo Geral.....	41
2.2 Objetivos Específicos	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 Avaliação <i>in vivo</i> do tecido muscular esquelético de embriões de galinha.....	42
3.1.1 Coleta dos embriões.....	42
3.1.2 Processamento histológico dos embriões.....	42
3.1.3 Coloração pela Hematoxilina e Eosina	43
3.1.4 Detecção de proteínas intracelulares por imunomarcacão indireta em embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i>	43
3.2 Avaliação <i>in vitro</i> de culturas primárias de células musculares esqueléticas.....	45
3.2.1 Obtenção do vírus da febre amarela 17DD	45
3.2.2 Cultura de células musculares esqueléticas	45
3.2.3 Infecção das células musculares esqueléticas em cultura pelo vírus da febre amarela 17DD	46
3.2.4 Passagem do virus produzido in vitro em células musculares esqueléticas obtidas de embrião de galinha.....	48

3.2.5	Imunomarcação indireta para detecção de proteínas intracelulares em cultura de células musculares esqueléticas.....	51
3.2.6	Titulação viral.....	51
3.2.7	Extração do RNA total das células cultivadas.....	52
3.2.8	Transcrição reversa e PCR.....	53
4	RESULTADOS	55
4.1	Avaliação <i>in vivo</i> do tecido muscular esquelético de embriões de galinha entre 11 e 18 dias de desenvolvimento.....	55
4.2	Avaliação <i>in vitro</i> da infecção pelo vírus 17DD em culturas primárias de músculo esquelético de galinha	66
4.2.1	Avaliação da infecção pelo vírus da febre amarela 17DD quanto ao momento de infecção em cultura de células musculares esqueléticas.....	66
4.2.2	Análise morfológica da susceptibilidade à infecção de fibras musculares esqueléticas de galinha expostas ao vírus da febre amarela 17DD 120 horas após o plaqueamento (T120).....	85
4.2.3	Avaliação da infecção de células musculares esqueléticas em cultura pelo vírus da febre amarela 17DD em diferentes MOI	88
4.2.4	Avaliação de uma passagem do vírus FA17DD produzido em cultura de células musculares esqueléticas de Gallus gallus domesticus	103
5	DISCUSSÃO	106
6	CONCLUSÕES	117
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Esquema do genoma viral de um flavivírus.....	16
Figura 1.2 - Esquema estrutural de um flavivírus.....	17
Figura 1.3 - Biossíntese das partículas virais dos flavivírus.....	18
Figura 1.4 - Patogênese de febre amarela.....	20
Figura 1.5 - Ácinos hepáticos evidenciando as zonas do lóbulo.....	21
Figura 1.6 - Fígado humano de paciente com febre amarela.	21
Figura 1.7 - Fases clínicas da forma clássica da febre amarela.....	23
Figura 1.8 – Distribuição das formas clínicas da febre amarela.	23
Figura 1.9 - Mapa das áreas de risco para febre amarela.	25
Figura 1.10 - Ciclos biológicos da febre amarela.	26
Figura 1.11 – Organização e estrutura do tecido muscular esquelético.	32
Figura 1.12 – Expressão temporal dos fatores de transcrição envolvidos na determinação e regulação miogênica.....	33
Figura 1.13 – Expressão temporal das proteínas sarcoméricas em células musculares esqueléticas.....	35
Figura 1.14 – Molécula de Miosina.....	36
Figura 1.15 – Estrutura do sarcômero.....	37
Figura 3.1 - Fluxograma representativo do delineamento experimental dos momentos de infecção e pontos de coletas das culturas de células musculares esqueléticas de embriões de galinha infectadas <i>in vitro</i> pelo vírus da febre amarela 17DD utilizando a MOI de 0,1.....	50
Figura 4.1 – Tecido muscular esquelético de embriões de galinha apresentou pouca diferença morfológica entre os animais infectados e controles com 48 hpi.....	58
Figura 4.2 – Precusores miogênicos e fibras musculares esqueléticas foram positivas para marcação de FA.....	59
Figura 4.3 – Células com núcleos apoptóticos e cariorex foram observadas próximas a precusores miogênicos infectados.	60
Figura 4.4 – Precusores miogênicos infectados pelo vírus FA17DD foram observados próximos a fibras musculares também infectadas.	61
Figura 4.5 – Células uninucleadas infectadas são Pax7 ⁺	62
Figura 4.6 – Tecido muscular esquelético infectado (120 e 144 hpi) apresentou desorganização estrutural em relação aos animais controles.....	63

Figura 4.7 – Reorganização estrutural do tecido muscular esquelético de embriões após 144 horas de infecção.....	64
Figura 4.8 – Imunodeteção de proteínas virais fraca e escassa no tecido muscular esquelético de embriões com 120 e 144 horas pós infecção.	65
Figura 4.9 – Cultura pouco confluenta com presença de precursores miogênicos, mioblastos e fibras neoformadas.	69
Figura 4.10 – Precursores miogênicos, mioblastos e fibras neoformadas foram observadas infectadas pelo vírus 17DD.....	70
Figura 4.11 – Miócitos foram observados infectados acompanhados por fibras delgadas também infectadas e núcleos picnóticos.	71
Figura 4.12 – Fibras musculares infectadas eram, em sua maioria, delgadas em relação as não infectadas e ao controle.....	72
Figura 4.13 – Em momentos iniciais da infecção, preferencialmente mioblastos foram observados infectados.	75
Figura 4.14 – Raras fibras musculares foram observadas infectadas e um aparente efeito citopático está associado a infecção.....	76
Figura 4.15 – Culturas infectadas possuíam fibras menos robustas em relação as fibras observadas no controle.	77
Figura 4.16 – Fibras musculares esqueléticas foram observadas infectadas em 24 hpi quando infectadas em T24.	80
Figura 4.17 – Fibras musculares e miócitos foram susceptíveis a infecção com efeito citopático associado em 48 hpi.	81
Figura 4.18 – Fibras espessas e delgadas foram observadas infectadas em pequeno número frente a confluência da cultura.	82
Figura 4.19 – Miofibras foram susceptíveis a infecção pelo vírus 17DD.....	86
Figura 4.20 – Proteínas virais intercalam com a marcação da miosina em miofibras.	87
Figura 4.21 – A susceptibilidade da cultura a infecção pelo vírus 17DD foi confirmada pela detecção do RNA genômico viral e do intermediário replicativo por RT-PCR.....	89
Figura 4.22 – Mioblastos foram observados infectados com a MOI de 0,01 em 24 hpi.....	92
Figura 4.23 – Mioblastos aglomerados e próximos a fibras musculares foram positivos para o vírus 17DD.	93

Figura 4.24 – Debris celulares acompanhados de raros miócitos foram observados positivos para febre amarela em 72 hpi.	94
Figura 4.25 – Poucas células infectadas foram observadas em 24 hpi na MOI de 0,002.	95
Figura 4.26 – Quase a totalidade das células musculares em diferentes estágios de diferenciação na cultura de 48 hpi foram susceptíveis à infecção na MOI 0,002.	96
Figura 4.27 – Fibroblastos infectados foram observados na cultura de células musculares esqueléticas pela primeira vez.	97
Figura 4.28 – Intenso efeito citopático na cultura em 72 hpi.	98
Figura 4.29 – Baixo índice de infecção da cultura primária de células musculares esqueléticas utilizando a MOI de 0,1.	99
Figura 4.30 – Alto índice de infecção foi observado em 48 hpi na MOI 0,002, quando comparado às demais MOI.	100
Figura 4.31 – Confirmação da susceptibilidade da cultura de células musculares à infecção pelo vírus 17DD produzido pela cultura de células a partir da detecção do RNA genômico viral e do intermediário replicativo por RT-PCR.	104
Figura 4.32 – A infecção com o vírus produzido pela cultura primária de células musculares esqueléticas foi bem sucedida, reproduzindo o padrão de infecção.	105

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 3.1 - Relação dos anticorpos primários utilizados para imunomarcção	44
Tabela 3.2 - Relação dos anticorpos secundários utilizados para imunomarcção	45
Tabela 3.3 - Master Mix para transcriptase reversa (RT).....	53
Tabela 3.4 - Master Mix para PCR	53
Tabela 4.1 – Critérios utilizados para identificar os tipos celulares estudados:	55
Tabela 4.2 – Resumo dos resultados da infecção da cultura primária de células musculares esqueléticas de embrião de galinha em três momentos de infecção (T0, T5 e T24) utilizando o inóculo na MOI de 0,1	84
Tabela 4.3 - Resumo dos resultados da infecção da cultura primária de células musculares esqueléticas de embrião de galinha no momento do plaqueamento (T0) com diferentes concentrações do inóculo (MOI 0,1; 0,01 e 0,002)	102
Gráfico 4.1 Avaliação da cinética da produção de partículas virais infecciosas pela cultura de células musculares esqueléticas de embrião de galinha, em diferentes métodos de infecção utilizando a MOI de 0,1.	67
Gráfico 4.2 – Análise da cinética da produção de partículas virais infecciosas pela cultura muscular esquelética de embrião de galinha, infectada no momento do plaqueamento com o vírus da febre amarela 17DD em diferentes multiplicidades de infecção (MOI).....	88
Gráfico 4.3 - Análise da cinética da produção de partículas virais infecciosas após passagem do vírus <i>in vitro</i>	103

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
dd	Dias de desenvolvimento
CEF	<i>Chicken embryo fibroblasts</i>
FA	Febre amarela
hpi	Horas pós-inoculação
hpp	Horas pós-plaqueamento
IFN	Interferon
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MPC	<i>Myogenic precursor cell</i>
NS	Não-estrutural
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFU	<i>Plaque-forming unit</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vírus da febre amarela

A família *Flaviviridae* é uma grande família de vírus que contém três gêneros, sendo *Flavivirus* o maior deles. O vírus da febre amarela é o protótipo do gênero *Flavivirus*, o qual corresponde a um grupo com mais de 70 vírus envelopados de fita simples de RNA de polaridade positiva. É um vírus com capsídeo de simetria icosaédrica que mede em torno de 50 nanômetros de diâmetro, seu genoma possui aproximadamente 10.8 kb, incluindo as regiões do extremo 5' e 3', com uma única fase aberta de leitura que codifica três proteínas estruturais que compõem a partícula viral – capsídeo (C), membrana (M) e envelope (E) – e sete proteínas não estruturais – NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 – que fazem parte da maquinaria de replicação viral (Figura 1.1) (1–4).

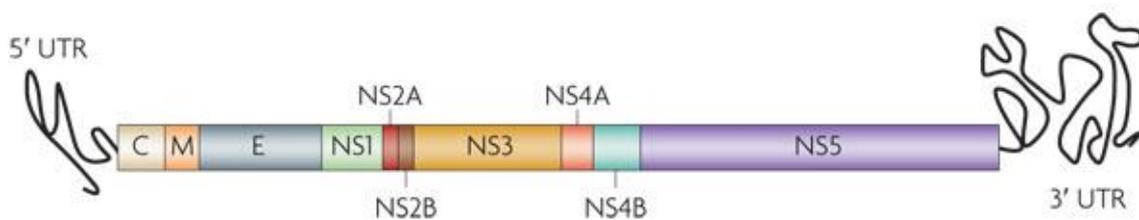


Figura 1.1 Esquema do genoma viral de um flavivírus.

Genes C, M e E codificam proteínas estruturais. Genes NS codificam proteínas não-estruturais. Retirado de Guzman *et al.*, 2010 (4).

A superfície do virion é composta por duas das três proteínas estruturais, a proteína M e a proteína E. A proteína M (aproximadamente 75 aminoácidos) inicialmente é expressa como prM (aproximadamente 165 aminoácidos) e passa por um processo de maturação – que consiste na clivagem do peptídeo pr, restando o peptídeo M – e assim como a proteína E, são glicoproteínas com duas hélices transmembrana. A proteína E (aproximadamente 495 aminoácidos) é responsável pela indução da principal resposta imunológica do hospedeiro contra a infecção, além de conter o sítio de ligação virus-célula e o peptídeo de fusão. A terceira proteína estrutural, a proteína C (aproximadamente 120 aminoácidos), está envolvida no empacotamento do genoma viral formando então o nucleocapsídeo (NC), onde fica armazenado o material genético (Figura 1.2) (2,5,6).

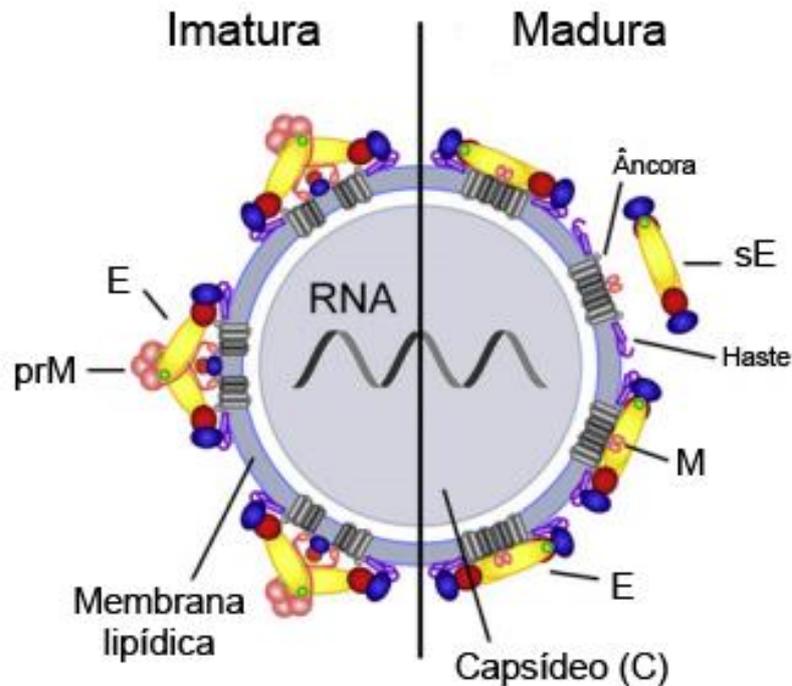


Figura 1.2 - Esquema estrutural de um flavivírus.

À esquerda, partícula viral imatura. À direita, partícula viral infecciosa. Adaptado de Heinz e Stiasny, 2012 (6).

O primeiro contato do vírus com a célula hospedeira é realizado pela glicoproteína E presente no envelope viral que interage com glicosaminoglicanos e proteoglicanos que estão na membrana celular (7). Os receptores envolvidos nessa interação não estão muito bem caracterizados, porém acredita-se há participação de moléculas de heparan sulfato e receptores das famílias TIM e TAM (7). A endocitose da partícula viral ocorre por uma vesícula endocítica, revestida por clatrina, que se liga a um endossoma primário no citoplasma da célula (2,8). O ambiente ácido do endossoma promove uma mudança conformacional da proteína E, que deixa de ser um homodímero, passa a ser um monômero, e depois organiza-se em homotrímeros. Esse rearranjo expõe o peptídeo de fusão que permite a fusão do envelope viral com a membrana do endossoma (3,8,9). Após a fusão, o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma celular, a proteína do capsídeo é dissociada e o RNA viral é disponibilizado no citoplasma para iniciar a replicação (2). A partir do RNA genômico, de polaridade positiva, é codificada uma poliproteína precursora, que é processada tanto por proteínas da célula quanto por aquelas codificadas pelo genoma viral, formando as proteínas virais estruturais – proteínas E, M e C - e não estruturais – NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (3).

A replicação das partículas virais ocorre no citoplasma e no retículo endoplasmático rugoso da célula hospedeira. Uma das etapas deste processo consiste na transcrição de RNA de polaridade negativa, chamado intermediário replicativo, a partir do RNA genômico de polaridade positiva, pelo complexo de replicação formado por proteínas não estruturais. O intermediário replicativo servirá de molde para síntese de novos RNAs de polaridade positiva das próximas partículas virais que serão empacotadas por um polímero de proteínas C, formando o núcleocapsídeo (3,5). Inicialmente, partículas imaturas são formadas no lúmen do retículo endoplasmático. Essas partículas não são infecciosas, mas posteriormente passam pelo complexo de Golgi onde ocorre a clivagem da prM em M pela ação de furinas, liberando o peptídeo pr, processo que torna essa partícula infecciosa. As partículas maduras são liberadas pela célula hospedeira por exocitose nas vesículas de Golgi (Figura 1.3) (2,3,5).

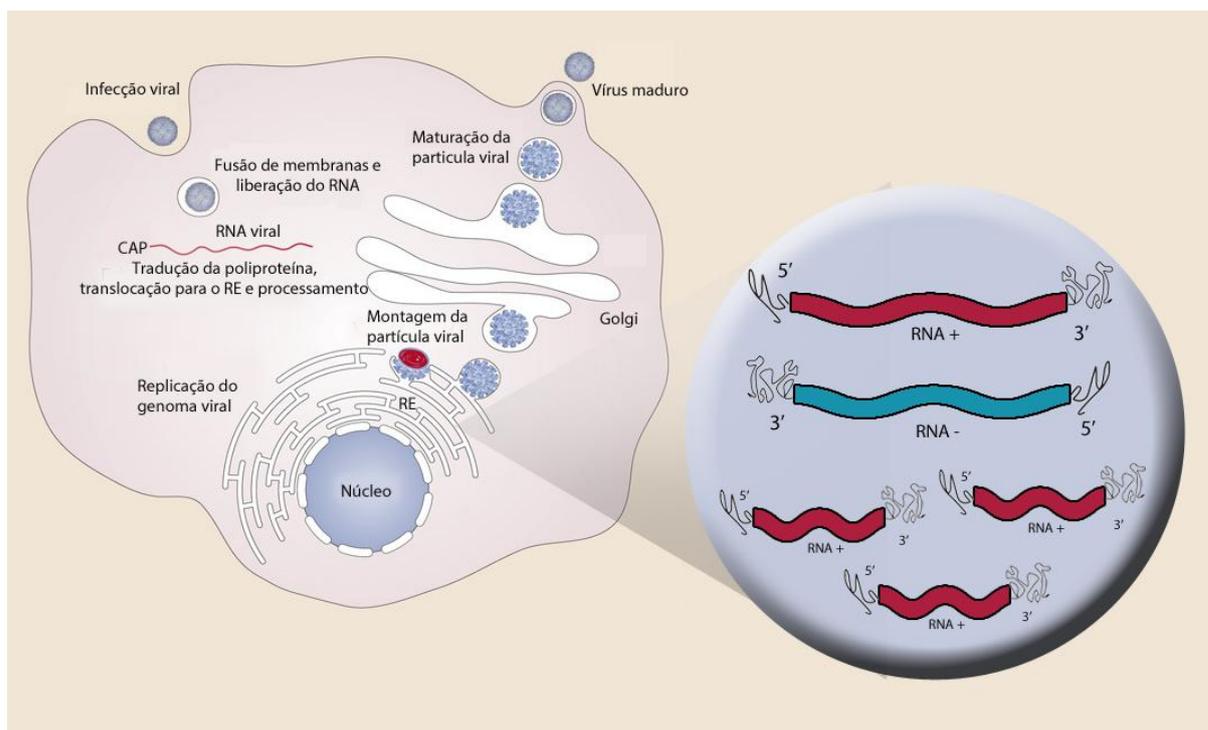


Figura 1.3 - Biossíntese das partículas virais dos flavivírus.

Esquema da produção de partículas virais, ressaltando o RNA genômico (RNA de polaridade positiva) e o intermediário replicativo (RNA de polaridade negativa. Adaptado Mukhopadhyay *et al.*, 2005 (2)

As proteínas não estruturais desempenham um papel muito importante na replicação, virulência e patogenicidade do vírus (10). A NS1 é uma glicoproteína altamente conservada entre os flavivírus, que pode se apresentar como um

monômero, dímero e hexâmetro (11). Essa proteína possui um papel central na replicação viral, no desencadeamento, modulação e evasão da resposta imune, na interação com proteínas da célula hospedeira, além de ser extensivamente utilizada para o diagnóstico de infecções por flavivírus e ainda ser apontada como uma excelente proteína antigênica para o desenvolvimento de vacinas quiméricas (11)

A NS2A é uma proteína hidrofóbica, com domínios transmembranares, que está envolvida no processo de montagem da partícula viral e interage com outras proteínas não-estruturais e partes do genoma, o que sugere que essa proteína seja responsável por coordenar o empacotamento e a replicação do RNA (12). Uma mutação nessa proteína pode impedir a produção de novas partículas virais (5). A NS2B é uma proteína associada à membrana, hidrofóbica, que junto à NS3 forma o complexo proteolítico viral (5,13).

A NS3 é uma proteína de aproximadamente 70 kDa e desempenha múltiplas funções. Essa proteína atua como protease, NTPase, helicase e RTPase. Além disso, a NS3 também está envolvida na indução da apoptose e, em alguns casos, ativando a caspase 8 (5).

As proteínas NS4A e NS4B são ambas hidrofóbicas. A NS4A interage com a NS1 e a atuação dessa proteína com o complexo de replicação suporta a hipótese de que ela está envolvida nesse processo de replicação. Aparentemente a NS4A também está envolvida na indução do rearranjo da membrana. A NS4B colocaliza com a NS3 e a fita dupla de RNA viral compõe o complexo de replicação (5).

A NS5 é uma proteína altamente conservada e possui atividades metiltransferase e de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). Essa proteína está envolvida na modificação do extremo 5' por adição do cap, possui também atividade polimerase e forma um complexo com a NS3 que pode estimular as atividades NTPase e RT-Pase da NS3 (5).

1.2 Patogênese da febre amarela

A febre amarela é uma doença infecciosa viral aguda com período de incubação médio entre 3 e 6 dias, na qual os casos podem variar de assintomáticos a malignos (14). São descritas na literatura duas formas de desenvolvimento da febre amarela, a neurotrópica e a visceral (15).

A forma neurotrópica da febre amarela está, na maioria dos casos, associada a um efeito adverso associado à infecção pelo vírus vacinal. É um evento raro, que

acomete uma pessoa a cada 125 mil vacinados (16). Trata-se de um efeito adverso da vacina que pode causar encefalite, febre, cefaléia e disfunção neurológica. Acomete com maior frequência crianças menores de seis meses, adultos acima dos 60 anos e pessoas imunossuprimidas, o que justifica a recomendação de não vacinar esses grupos (16,17).

A febre amarela visceral é a forma clássica da doença e ocorre em infecções naturais, onde o mosquito infectado transmite o vírus da febre amarela pela saliva durante a picada. Em sequência, partículas virais infectam células dendríticas da epiderme da pele, e estas células vão para o linfonodo realizar a apresentação antigênica. As partículas virais são replicadas nos linfonodos e depois caem na corrente sanguínea iniciando o período de viremia. Posteriormente, os principais órgãos infectados são rins, baço, coração e fígado, sendo esse último o mais importante (Figura 1.4). No fígado a primeiras células a serem infectadas são as células de Kupffer. Depois é possível observar a infecção dos hepatócitos da zona medial, o que sugere maior suscetibilidade das células dessa região à infecção (Figura 1.4 e Figura 1.5) (18,19).

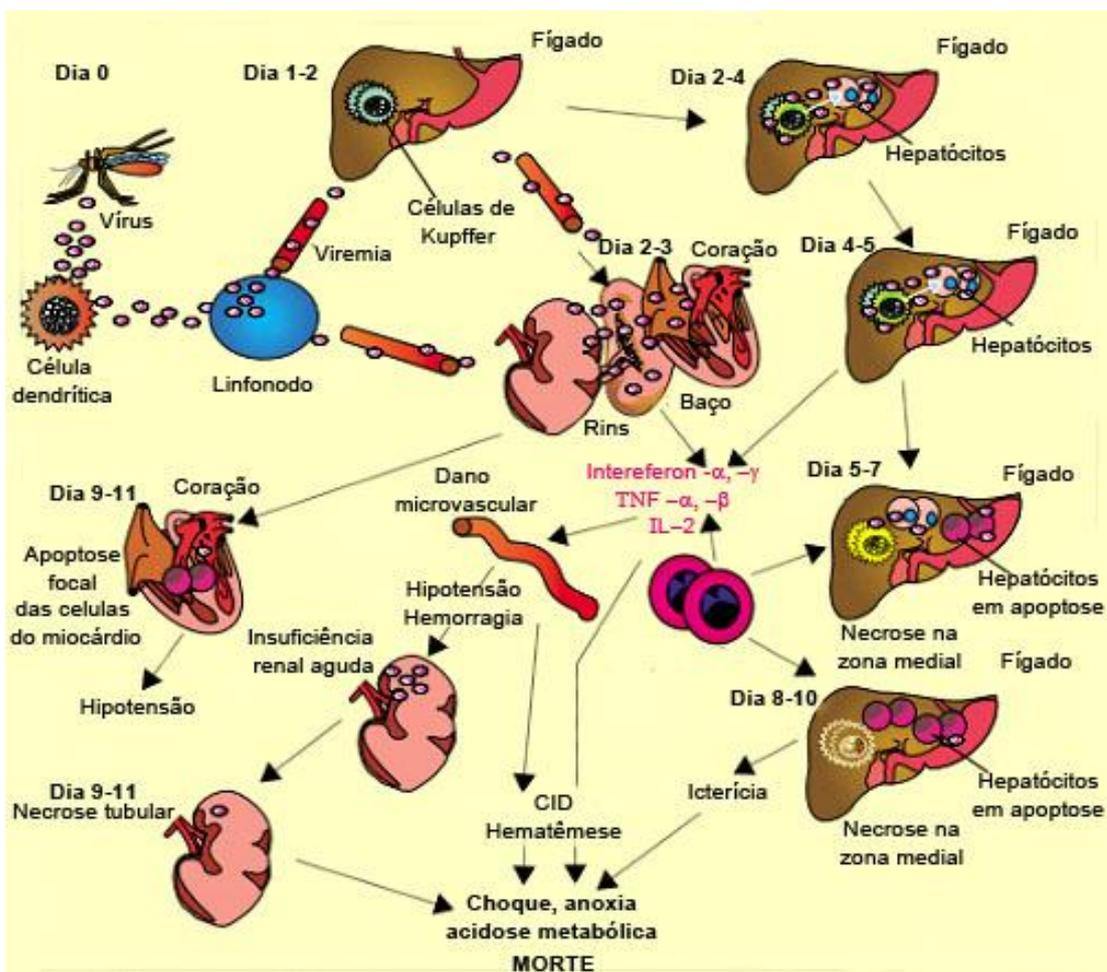


Figura 1.4 - Patogênese de febre amarela.

Esquema da evolução natural da doença. Adaptado de Monath, 2001 (18).

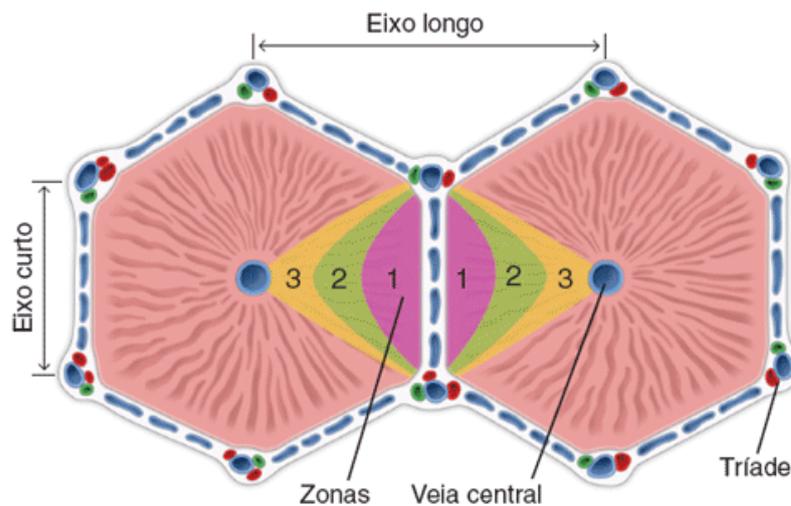


Figura 1.5 - Ácinos hepáticos evidenciando as zonas do lóbululo.

As lesões dos hepatócitos ocorrem preferencialmente na zona 2. Retirado de Ross, 2016 (20).

Conforme ocorre o avanço da infecção, é possível observar a apoptose dos hepatócitos infectados junto com a presença de corpúsculos de Councilman-Rocha Lima que podem estar relacionados a diferentes estágios de apoptose (Figura 1.6) (19).

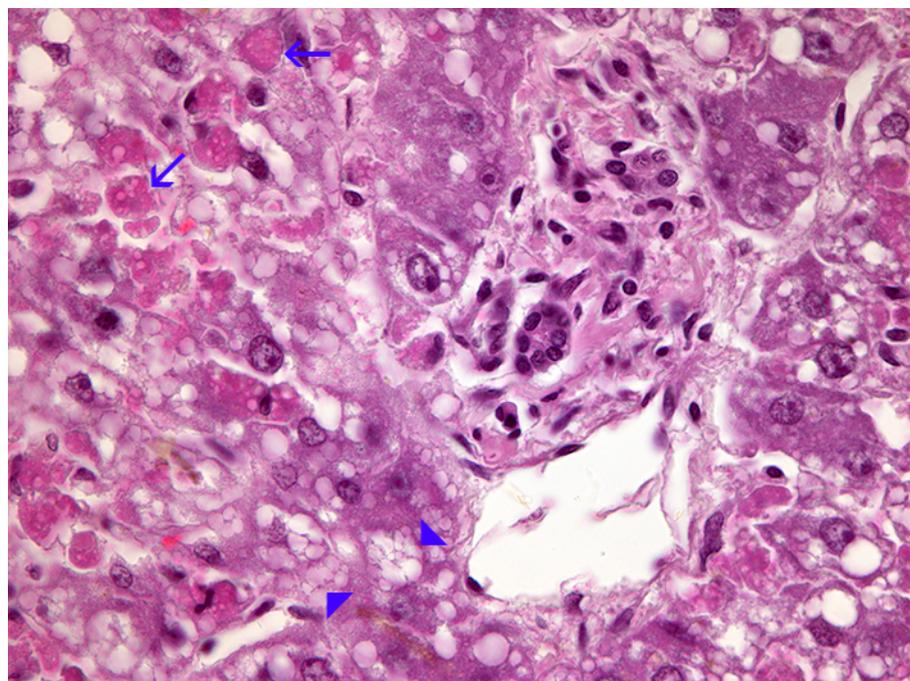


Figura 1.6 - Fígado humano de paciente com febre amarela.

Aspecto histológico de um caso da Coleção de febre amarela do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Corte corado por Hematoxilina e Eosina. Áreas com → indicam os corpúsculos de Councilman-Rocha Lima e áreas com ► indicam microesteatose.

Microesteatose e esteatose no fígado são achados morfológicos característicos da infecção pelo vírus da febre amarela (Figura 1.6) e esse acometimento do fígado se reflete em icterícia do paciente, sinal clássico da doença (19). Além disso, a infecção dos rins pode levar à hipotensão e até mesmo a insuficiência renal. No coração, ocorre a infecção das células musculares cardíacas que também sofrem apoptose focal. A resposta imune envolve interferons, interleucinas e fatores de necrose tumoral, e pode provocar dano vascular, incluindo hemorragias. Todo esse quadro é bastante severo e pode levar o indivíduo à morte (Figura 1.4) (18).

Três estágios clínicos da febre amarela clássica são descritos em humanos: [1] período de infecção, [2] remissão e [3] intoxicação. Após 3-6 dias da picada do mosquito, começa o período de infecção que dura entre 3-5 dias e é caracterizado por febre alta, cefaléia, mal-estar, fotofobia, dor nas costas, dores musculares, irritabilidade, agitação, náuseas e vômitos (15,21), sintomas que caracterizam a forma leve e/ou moderada da doença (14). Durante esse período o paciente apresenta partículas virais infecciosas no sangue em concentração suficiente para que outros mosquitos se infectem ao realizar o repasto sanguíneo. Depois, começa o período de remissão que dura entre 2-12 horas e é caracterizado por uma aparente melhora do paciente (21). Alguns pacientes se recuperam, porém outros podem voltar a ficar doentes de forma severa com sinais de alterações do fígado e rins, que são sintomas característicos do terceiro e último estágio, o período de intoxicação (15,21), que é a forma mais grave da doença caracterizada por icterícia, hematêmese e oligúria (14). Caso a infecção persista, a forma clínica pode evoluir para maligna, onde todos os sintomas clássicos são observados. A presença dos sintomas clássicos caracteriza a falência hepato-renal (14). O paciente desenvolve uma febre hemorrágica severa e disfunções em múltiplos órgãos, acompanhado de icterícia, vômito negro e instabilidade cardíaca (Figura 1.7) (15).



Figura 1.7 - Fases clínicas da forma clássica da febre amarela.
Retirado de Manso, 2014 (22), com base em Gardner e Ryman, 2010 (21).

Estima-se que 90 % dos casos de febre amarela são leves ou com poucos sintomas, sendo apenas 10 % dos casos classificados como graves. Estes, entretanto apresentam alta taxa de letalidade (Figura 1.8) (14).



Figura 1.8 – Distribuição das formas clínicas da febre amarela.
Esquema representativo da distribuição em porcentagem da manifestação das formas clínicas da febre amarela. Vasconcelos, 2003 (14).

1.3 Epidemiologia da febre amarela

Estudos presumem que o vírus da febre amarela surgiu na África Central e tenha sido inserido na América do Sul no século XVI através do tráfico de escravos (23). O combate às severas epidemias que ocorreram durante os séculos XVII, XVIII e XIX estimularam o desenvolvimento de pesquisas sobre o agente etiológico, forma de transmissão e fatores envolvidos na mortalidade e morbidade, que culminaram em grande desenvolvimento científico e tecnológico (24). A descoberta da transmissão vetorial, a biologia dos até então “elementos filtráveis”, e o desenvolvimento da vacina, são exemplos desses avanços. Até o início do século XX, a febre amarela era uma doença de muito impacto nos centros urbanos que foi minimizada devido ao intenso controle vetorial e ao desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz (25). A febre amarela é uma doença infecciosa que permanece endêmica nas regiões Subsaariana da África e Tropical da América do Sul (Figura 1.9), cujo vírus é transmitido por mosquitos. Atualmente é estimada, por modelagem matemática, a ocorrência de 84 mil – 170 mil casos de febre amarela por ano, com 60 mil mortes, e que 900 milhões de pessoas residam em áreas de risco (26). Deste número, 90 % dos casos ocorrem na África (27), o que se deve a alta densidade de vetores próximos a um grande número de pessoas não vacinadas. Na América do Sul, as campanhas de vacinação propiciaram uma alta cobertura vacinal da população, o que se reflete no menor número de casos reportados e consequentemente em um melhor controle da doença (28).

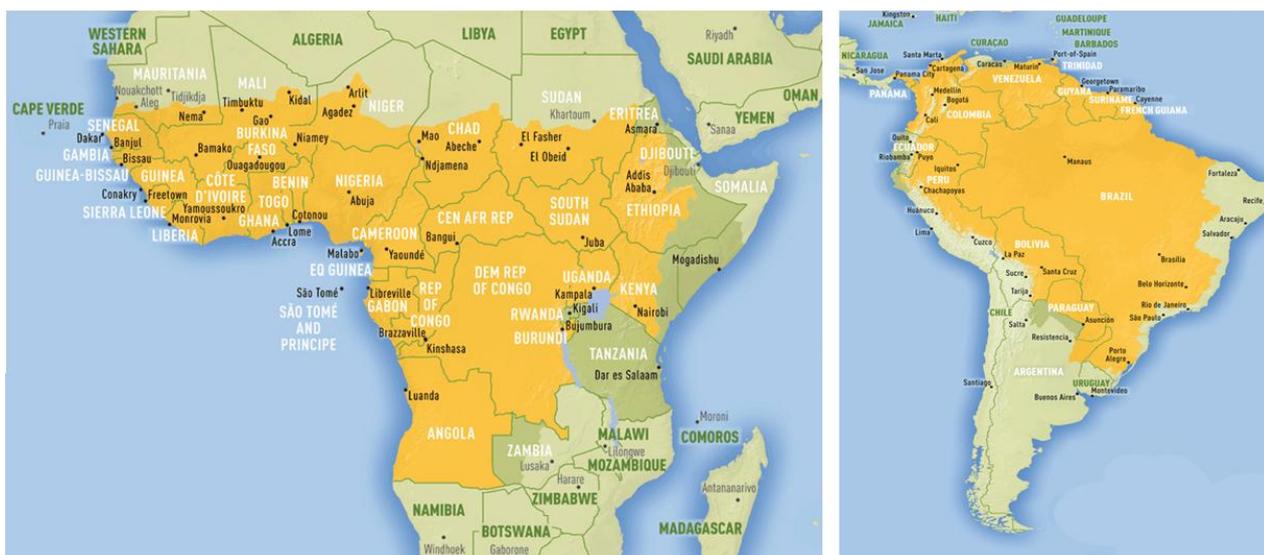


Figura 1.9 - Mapa das áreas de risco para febre amarela.

Áreas de recomendação da vacina contra febre amarela na África (esquerda) e na América do Sul (direita). Retirado de *Centers for Disease Control and Prevention - CDC*, 2016 (29).

A época de maior risco de transmissão da febre amarela na África é entre Julho e Outubro, enquanto na América do Sul, especialmente no Brasil, é entre Janeiro e Março (30), o que se deve à maior incidência do vetor devido a temperaturas mais altas e ao período de chuvas que beneficiam a proliferação do mosquito nesses meses, além de diminuir o período de incubação extrínseca do vírus (31,32).

A febre amarela possui dois ciclos de transmissão bem distintos, um silvestre e outro urbano. A febre amarela Silvestre ocorre em regiões de floresta com ciclo que se mantém entre mosquitos e primatas não-humanos. As espécies de vetores envolvidas neste ciclo pertencem aos gêneros *Aedes* spp., *Haemagogus* spp. e *Sabethes* spp. O homem não vacinado, ao adentrar a mata, pode se contaminar acidentalmente e, ao retornar à cidade ainda no período de viremia, pode dar início à febre amarela urbana. Esta se mantém entre mosquitos e humanos e o vetor envolvido na transmissão é o *Aedes aegypti*. Existe ainda um ciclo intermediário que é descrito apenas na savana africana que ocorre entre mosquitos, primatas não-humanos e humanos, onde mosquitos do gênero *Aedes* spp. com hábito semi-doméstico, seriam responsáveis pela transmissão da doença para população residente próxima à floresta (Figura 1.10) (33).

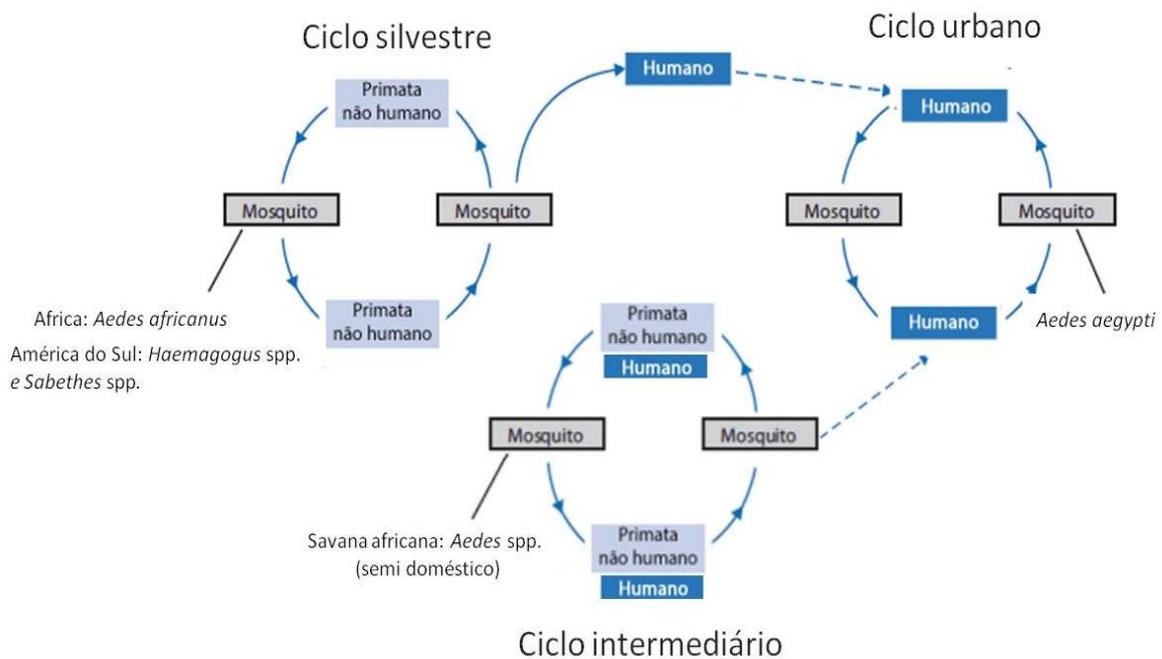


Figura 1.10 - Ciclos biológicos da febre amarela.

Esquema representativo dos ciclos silvestre, urbano e intermediário. Retirado de *Centers for Disease Control and Prevention - CDC 2010 (34)*

A erradicação da febre amarela se torna inviável uma vez que é impossível cessar o ciclo silvestre já que o mesmo é mantido pelo vetor artrópode, que transmite o vírus aos seus descendentes via transovariana (10) e também pelo duplo papel desempenhado pelos primatas não-humanos como amplificadores e reservatórios do vírus (35). As características ecológicas e a susceptibilidade à infecção das espécies de primatas não-humanos, faz com que estes desempenhem um papel importantíssimo na manutenção da febre amarela silvestre. Os primatas não-humanos oriundos das Américas, ao serem infectados, adoecem e a infecção normalmente é fatal. Esses eventos, que geram ondas epizóticas a cada 8-10 anos na região da Amazônia, fazem com que este hospedeiro seja um indicador da circulação do vírus. Os macacos que conseguem sobreviver à infecção se tornam imunes (35). No continente africano, os macacos são mais resistentes ao desenvolvimento da patogenia decorrente da infecção. Neles a infecção é, na maioria dos casos, sem sintomas aparentes ou branda, dificultando a identificação da circulação do vírus. Ao mesmo tempo, eles possuem um período de viremia bem mais intenso e prolongado, o que os torna melhores amplificadores da doença, uma vez que os mosquitos ficam expostos a se infectar durante um período maior (35).

Recentes surtos (2015 - 2017) de febre amarela na África e no Brasil (36) apontam para uma antiga preocupação que é a reemergência da doença em áreas urbanas (27). Aproximadamente um bilhão de pessoas que residem em 46 países

estão em áreas de risco de infecção (37). O risco de reemergência da febre amarela vem crescendo desde as últimas décadas do século passado em consequência de alguns fatores como: baixa cobertura vacinal e intensa migração de pessoas das áreas rurais para áreas urbanas, especialmente na África, que pode inserir o vírus em lugares onde a população seja susceptível (não imunizada), além das consequências naturais do crescimento desordenado das cidades que faz com que as condições inadequadas de saneamento básico e frequente necessidade de armazenamento de água potável em recipientes abertos aumentem a proliferação de mosquitos *Ae. aegypti*, transmissor do vírus no ciclo urbano (21). Entre 2015 e 2016 foram reportados 962 casos confirmados de febre amarela em Angola e na República do Congo (38).

No Brasil, um surto silvestre está em curso (desde dezembro de 2016), mas ainda não foram encontrados mosquitos da espécie *Aedes aegypti* infectados para suportar a hipótese de reemergência da febre amarela Urbana (37). Os primeiros casos suspeitos foram reportados pelo Ministério da Saúde no dia 6 de janeiro de 2017 em seis municípios do estado de Minas Gerais, e se tratavam de 12 indivíduos do sexo masculino cujas idades variavam entre 7 e 53 anos (39). Seis dias depois, o número de casos suspeitos subiu para 110, incluindo 30 mortes, em 15 municípios do estado mineiro (39). Dia 24 de janeiro, apenas 18 dias da primeira notificação, os casos humanos foram confirmados em três estados, sendo eles Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo, além de seis casos que estavam sob investigação na Bahia (37) que foram descartados. Em meados de março o estado do Rio de Janeiro entrou na lista de casos humanos confirmados para febre amarela (37). Ao todo, 642 eventos epizooticos de febre amarela foram confirmados em diversos estados do país até final de maio de 2017 (37), indicando a circulação do vírus em território nacional. Em 31 de maio, o número de casos humanos reportados chegou a 3.240, sendo 792 confirmados, 519 suspeitos e 1.929 descartados, incluindo 435 mortes sendo 274 confirmadas, 37 suspeitas e 124 descartadas (40). No total, o Distrito Federal e sete estados brasileiros tiveram casos confirmados de febre amarela, sendo eles: Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Pará, Rio de Janeiro, São Paulo e Tocantins (40). A maior parte dos casos confirmados era de indivíduos do sexo masculino, com idade entre 21 e 60 anos (37) e a taxa de mortalidade estimada entre os casos confirmados foi de 34,5 % (40). A região sudeste do Brasil lidera o *ranking* de casos humanos notificados (40,41) e compartilha o mesmo ecossistema entre os estados – florestas tropicais e sub-tropicais - (37) o que sugere uma

circulação do vírus nessas florestas. A análise do genoma viral obtido do sangue de macacos infectados provenientes do Espírito Santo, revelou que o vírus circulante neste surto possui mutações genéticas que nunca foram observadas antes (42). O Ministério da Saúde distribuiu entre janeiro e maio de 2017 aproximadamente 26,3 milhões das doses de vacina contra febre amarela para os estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia e Rio de Janeiro, que estão realizando vacinação temporária de forma seletiva, além das 5,9 milhões de doses de vacina contra febre amarela de rotina para todos os estados brasileiros (40).

1.4 Desenvolvimento da vacina contra febre amarela e características atuais da FA17DD

O vírus da febre amarela foi isolado pela primeira vez em junho de 1927. Este isolamento foi obtido do sangue de um paciente africano de 28 anos que teve a forma leve/moderada da doença, e sobreviveu (43). Esta amostra, chamada Asibi em função do nome do doador, foi inoculada em um macaco Rhesus que foi susceptível à infecção, o que estabeleceu pela primeira vez a infecção experimental em laboratório utilizando um modelo animal adequado (44). Cinco dias depois da inoculação este macaco morreu, sendo feita a passagem do vírus em outro, que também evoluiu a óbito. Diversas passagens foram feitas, de macaco em macaco, todas resultando em casos fatais, até que, depois da 30^o passagem, o animal inoculado manifestou febre e se recuperou (44). A propagação do vírus em macacos foi continuada até a 53^o passagem (45). A necessidade de um hospedeiro mais acessível para as passagens fez com que Max Theiler experimentasse, em novembro de 1928, a inoculação da amostra viral em cérebro de camundongos, que foi bem sucedida e repetida por 75 vezes até a publicação dos resultados em abril de 1930. Nesta, foi observada a morte dos camundongos em tempos cada vez mais curtos após a inoculação (46), sugerindo a adaptação do vírus ao sistema. Em 1932, Theiler e Haagen descreveram a propagação do vírus *in vitro* utilizando culturas de tecidos de cobaias, coelhos e embriões de galinha, tendo a infecção em tecido de embrião de galinha entre 8 e 10 dias de desenvolvimento apresentado resultados mais uniformes em relação à virulência da amostra (47). Após 18 passagens da amostra viral em culturas de tecidos embrionários de camundongo (45), 58 passagens em culturas de tecidos de embriões de galinha inteiros e mais de 114 passagens em culturas de tecidos obtidos de embriões de galinha desnervado

(totalizando 172 passagens em embriões de galinha), foi obtida a amostra vacinal atenuada 17D (43). Ao testar a amostra vacinal em humanos, observou-se ausência de reações adversas e soroconversão (43). Desta amostra, duas sub-amostras foram obtidas: 17DD e 17D-204, originalmente obtidas nas passagens 195 e 204, respectivamente (48). Foram feitas passagens adicionais de ambas as sub-amostras em culturas de tecido embrionário de galinha destituído de sistema nervoso e, posteriormente, em ovos embrionados de galinha. Em 1945, adotou-se o sistema de lote-semente para evitar a continuação de passagens, sendo utilizada para a formulação da vacina em todo o mundo a 17D-204 entre as passagens 234 e 237, e a 17DD é usada no Brasil na passagem 285 (48).

No Brasil, o processo de imunização começou em 1937 (25) e a produção da vacina sofreu poucas alterações desde então. Esta é feita pela inoculação do lote semente do vírus vacinal 17DD em ovos embrionados de galinha livre de patógenos específicos no 9º dia de desenvolvimento. Estes ovos são incubados a 37,8 °C com umidade entre 55 % e 60 % até o 12º dia de desenvolvimento, quando os embriões são coletados, triturados, centrifugados, o sobrenadante é reservado, envasado a granel, liofilizado e distribuído junto à ampola com diluente (43,49). No mundo, são produzidas cerca de 30 - 60 milhões de doses de vacina contra a febre amarela por ano (1).

A comparação do sequenciamento entre o material genético dos vírus selvagem e vacinal da febre amarela mostrou que ambos os RNAs, que possuem 10.862 nucleotídeos, diferem entre si em apenas 68 nucleotídeos. Essa diferença resulta na tradução de 32 aminoácidos diferentes. A diferença dos nucleotídeos ocorre de forma aleatória no genoma e corresponde a 0,63 % de divergência entre as sequências, enquanto a diferença de aminoácidos, que representa 0,94 % de divergência, ocorre principalmente na proteína do envelope, onde se observa a substituição de 12 aminoácidos. Acredita-se que essa diferença de aminoácidos da proteína do envelope afete a ligação vírus - célula, o que poderia diminuir a patogênese em relação ao vírus selvagem. As outras substituições de aminoácidos são observadas nas proteínas NS1, NS3, NS5, NS2a e NS2b (50).

A vacina contra febre amarela é altamente eficaz, proporcionando a produção de anticorpos neutralizantes em 99 % das pessoas após 30 dias da imunização (32). Atualmente, a Organização Mundial de Saúde preconiza que apenas uma dose da vacina induz imunidade durante toda a vida (51), recomendação esta que em 2017 foi acolhida pelo Ministério da Saúde do Brasil (52).

Algumas tentativas de se alterar a forma de produção da vacina foram feitas, entretanto, sem sucesso (53–56). Em 2004, Freire e colaboradores publicaram a tentativa de desenvolvimento de uma vacina de vírus atenuado (FA17DD) produzida em cultura de fibroblastos de embrião de galinha. A produção viral *in vitro* foi muito eficiente, a plataforma de produção utilizada reduziu drasticamente a quantidade de proteína de galinha por dose, fator limitante da vacinação em pessoas alérgicas a proteínas de galinha, e induziu a produção de anticorpos neutralizantes. Entretanto, ao realizar o teste em macacos Rhesus, a vacina se mostrou mais neurotrópica do que a vacina do vírus 17DD produzida em ovos embrionários, sugerindo uma perda da atenuação, o que inviabilizou a continuação do trabalho (54). Em 2008, Freire e colaboradores investiram no desenvolvimento de uma vacina utilizando a amostra 17DD inativada. As partículas virais foram obtidas a partir da inoculação do vírus FA 17DD em cultura de células Vero, posteriormente inativadas por alta pressão hidrostática. Apesar da sobrevivência dos camundongos frente à dose letal do vírus vacinal da febre amarela, a produção de anticorpos neutralizantes foi baixa (53). Monath e colaboradores descreveram em 2011 os resultados de teste realizado em humanos com a vacina do vírus FA 17D-204, utilizando cultura de células como plataforma de produção viral. As partículas virais foram obtidas em cultura de células Vero e depois inativadas quimicamente com β -propiolactona. O teste clínico foi realizado com a administração de duas doses da vacina com uso de adjuvante que induziram a produção de anticorpos neutralizantes em títulos superiores ao mínimo preconizado para proteção em 90% das pessoas avaliadas. Após 12 meses da última dose, a persistência de anticorpos neutralizantes foi observada em 83% das pessoas envolvidas no estudo (55). Apesar dos resultados deste trabalho serem relativamente satisfatórios, a vacina atual de vírus atenuado produzida em ovos embrionados de galinha é mais eficaz. Outro trabalho de Freire e colaboradores de 2015 descreveu um novo método alternativo de produção utilizando o vírus vacinal (FA17DD) inativado. A plataforma de produção utilizada foi novamente a cultura de células Vero, desta vez inativada pelo mesmo método utilizado por Monath, utilizando β -propiolactona e com adição de adjuvantes. O teste realizado em camundongos mostrou que três doses desta da vacina eram necessárias para induzir a produção de anticorpos neutralizantes e um efeito protetor frente à inoculação intracerebral da 17DD atenuada (56).

Um estudo de nosso grupo sobre a cinética da infecção pelo vírus vacinal em embriões de galinha, apontou a cultura de células musculares esqueléticas de

Gallus gallus domesticus como uma potencial plataforma para a produção da vacina *in vitro*, mimetizando as condições da produção *in vivo* (22), porém a verificação desta sugestão não foi realizada. Este método alternativo apresenta vantagem em relação ao método atual uma vez que diminuiria a quantidade de proteína de ovo presente por dose da vacina uma vez que alérgicos não são recomendados a se vacinarem (54,57). O desenvolvimento de uma nova estratégia para a produção da vacina se torna ainda mais relevante já que o vírus FA 17DD tem sido usado como plataforma de produção de vacinas quiméricas (58–60).

1.5 Infecção em ovos embrionados de *Gallus gallus domesticus*

Embora embriões de galinha sejam utilizados como plataforma para a produção da vacina desde 1937, a histopatologia destes embriões foi descrita apenas 77 anos depois (22). A infecção causa lesões brandas e afeta diferentes tipos de células e tecidos, como por exemplo, o tecido muscular esquelético e cardíaco, tecido nervoso, células dos rins, pulmão e células do tecido conjuntivo da cartilagem e pele (22,61). Interessantemente, não foi detectada a presença de vírus na membrana corioalantoica, saco vitelínico e no fígado (22,62).

Os embriões infectados conforme o protocolo de produção da vacina não apresentam nenhuma alteração histopatológica associada à infecção com 24 horas de infecção, além de o vírus não ter sido detectado pelas técnicas de nested-PCR e imunofluorescência (62). Com 48 horas de infecção o antígeno viral foi detectado por imunofluorescência no tecido muscular esquelético e cardíaco (62). Já com 72 horas de infecção ocorre uma expressiva replicação das partículas virais que foram detectadas por imunofluorescência no tecido muscular esquelético, cardíaco, epitélio tubular renal, células do sistema nervoso central, células no tecido conjuntivo subepitelial, células mesenquimais do parênquima pulmonar, na moela e em células na camada muscular do ducto vitelino (62). Aparentemente, nesse ponto da infecção, o tecido muscular esquelético é o principal sítio de replicação viral onde células com padrão mesenquimal infectadas se aderem a fibras musculares e infectam essas fibras musculares maduras (62). Este trabalho acompanhou a evolução da infecção até 96 horas, quando todos os órgãos e tecidos infectados com 72 horas permaneceram positivos para a detecção de proteínas virais pela técnica de imunofluorescência (62).

1.6 Desenvolvimento do tecido muscular esquelético

O tecido muscular esquelético está presente em toda extensão do corpo. Cada músculo é composto por feixes musculares que por sua vez são formados por numerosas fibras longas e multinucleadas. Estas fibras, também chamadas de miofibras, possuem diversas miofibrilas que são compostas por unidades repetitivas de sarcômeros, onde estão localizadas as proteínas contráteis, que conferem o aspecto estriado característico do tecido. Cada músculo, feixe e fibra muscular estão envoltos por uma camada de tecido conjuntivo que são chamadas de epimísio, perimísio e endomísio, respectivamente, que possuem pouquíssimas células, principalmente fibroblastos (Figura 1.11) (63).

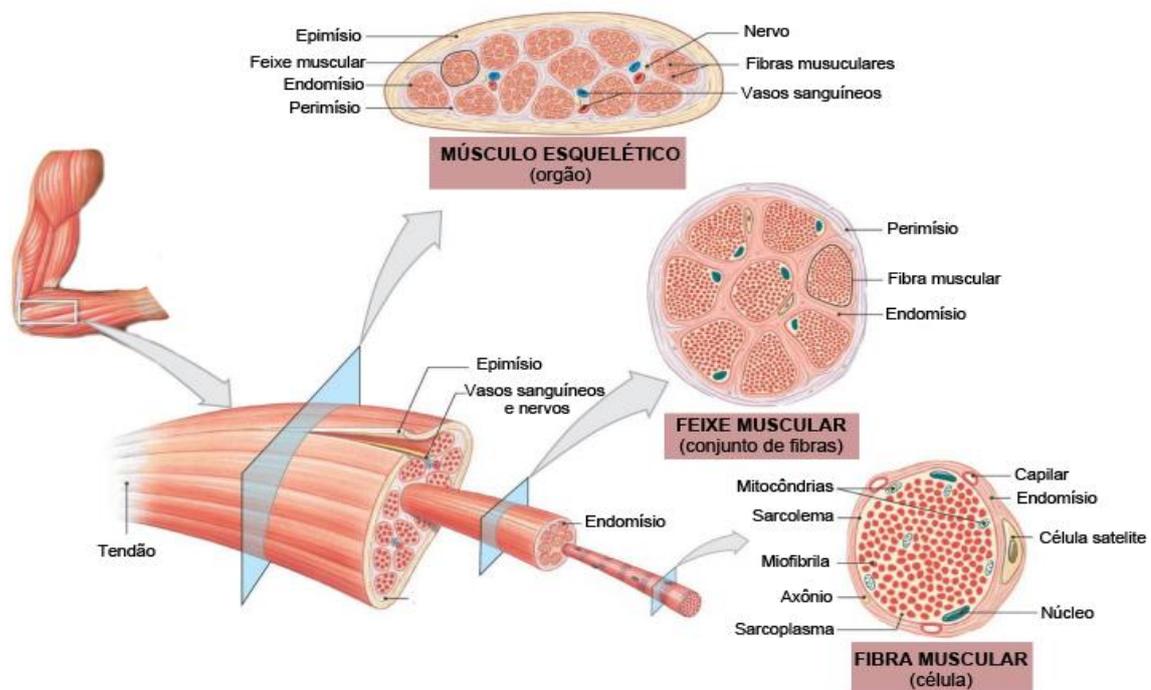


Figura 1.11 – Organização e estrutura do tecido muscular esquelético.

Representação esquemática da divisão do músculo em feixes e fibras musculares. Visualização didática do interior da fibra muscular com suas organelas e miofibrilas. Célula satélite presente no endomísio. Adaptado de LaPress, 2009 (64).

O desenvolvimento deste tecido ocorre pelo processo denominado miogênese (65). Neste processo, as células precursoras miogênicas (MPCs) que derivam do dermomiótomo expressam Pax3 e/ou Pax7 que são fatores de transcrição importantes para a migração destas células (66,67). Posteriormente, estas células entram no programa miogênico que é regulado pelos fatores de regulação miogênica (MRFs) *Myf5*, *MyoD*, *Miogenina* e *MRF4* (Figura 1.12) (68,69). Os MRFs são

membros da família de fatores de transcrição hélice-volta-hélice (70) e a expressão diferencial destes fatores define o estágio de diferenciação em que a célula miogênica se encontra (65).

A célula progenitora comprometida com a linhagem miogênica entra no programa miogênico e, ainda no dermomiótomo, o primeiro MRF a ser expresso é o *Myf5* (71,72). Em seguida, ocorre a expressão de *MyoD* (72,73). *Myf5* e *MyoD* são marcadores iniciais importantes na proliferação e na manutenção dos mioblastos (73). *Miogenina* e *MRF4* são marcadores tardios da miogênese, importantes na diferenciação e maturação dos mioblastos que saem do ciclo celular e se diferenciam em miócitos que se fundem uns aos outros e, posteriormente, darão origem a fibras com muitos sarcômeros, nos quais expressam várias proteínas contráteis (73).

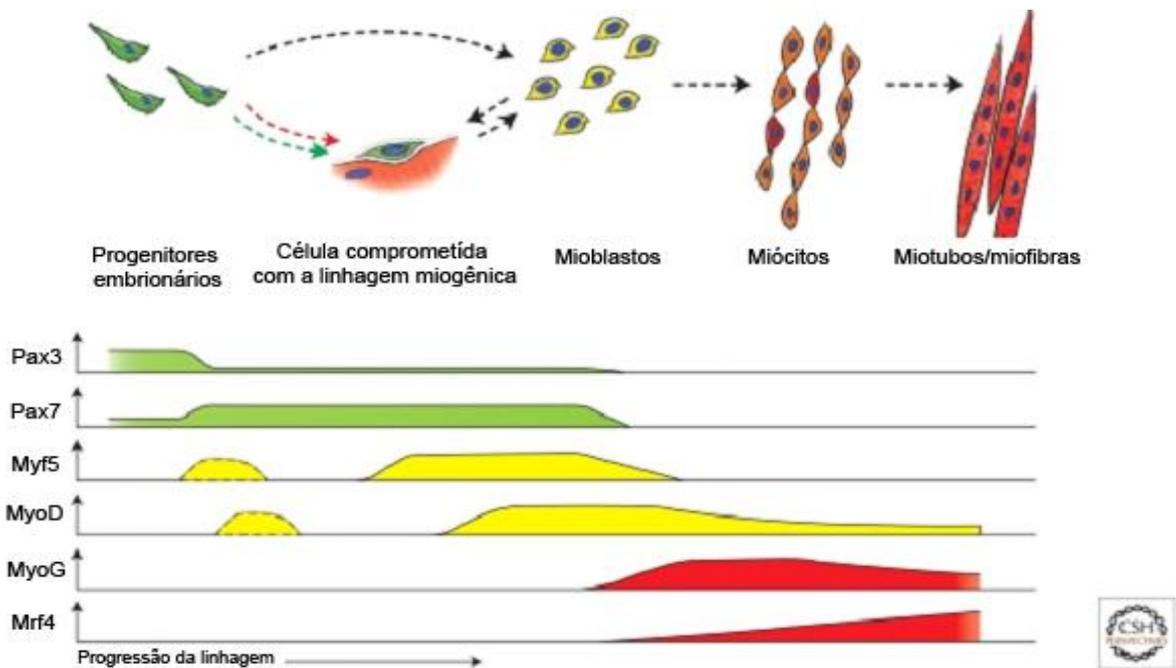


Figura 1.12 – Expressão temporal dos fatores de transcrição envolvidos na determinação e regulação miogênica.

Pax 3 e *7* estão envolvidos no comprometimento da célula com a linhagem miogênica, enquanto *myf5*, *myoD*, *miogenina* e *mrf4* atuam na diferenciação da célula muscular. Adaptado de Bentzinger *et al.*, 2012 (65)

Pax3/7 são fatores de transcrição *paired-box* essenciais para a determinação do destino celular das células miogênicas. A expressão do *Pax3* é primeiramente detectada no mesoderma pré-somítico e se mantém até o somito epitelial do dermomiótomo, sendo também possível detectá-lo no miótomo, que é o primeiro músculo esquelético a ser formado. Uma expressão similar é observada com o

Pax7, que inclusive pode substituir as funções do seu parálogo Pax 3. No miótomo, o Pax 3 e 7 estão colocalizados em 87 % das células e estudos mostram que estas células se originaram do dermomiótomo. Esses progenitores que são duplamente positivos não expressam proteínas do programa miogênico, porém expressam marcadores mitóticos indicando divisão celular, o que sugere que essa população pax 3/7 positiva constitui uma população proliferante, ainda indiferenciada, presente no miótomo (66,67). A expressão de *pax7* ocorre durante a miogênese fetal e continua no tecido muscular esquelético durante a miogênese adulta em células satélites (74).

A desmina é uma proteína de 52 kDa que faz parte do filamento intermediário das células musculares esqueléticas (75), sendo esta a primeira proteína de citoesqueleto músculo-específica a ser expressa, seguidamente da Miosina, α -actinina, α -actina, Troponina, Titina, Nebulina e Zeugmatina (Figura 1.13) não existindo uma ordem de expressão estritamente definida entre estas 7 proteínas (76). A sua expressão ocorre junto com a do *Myf5* e antes do *MyoD* (77). A desmina está presente no disco Z do sarmômero e une as miofibrilas lateralmente, além de conectar o sarcômero ao sarcolema (75). É uma proteína essencial para a manutenção da integridade estrutural e função muscular, apesar de não ser essencial nos estágios iniciais do desenvolvimento muscular. Possui um papel importante na distribuição, posicionamento e função das mitocôndrias e atua nas interações célula-matriz com seus pontos de ancoragem, corpos densos associados à membrana e costâmeros no sarcolema, além de atuar no reparo e regeneração tecidual (78).

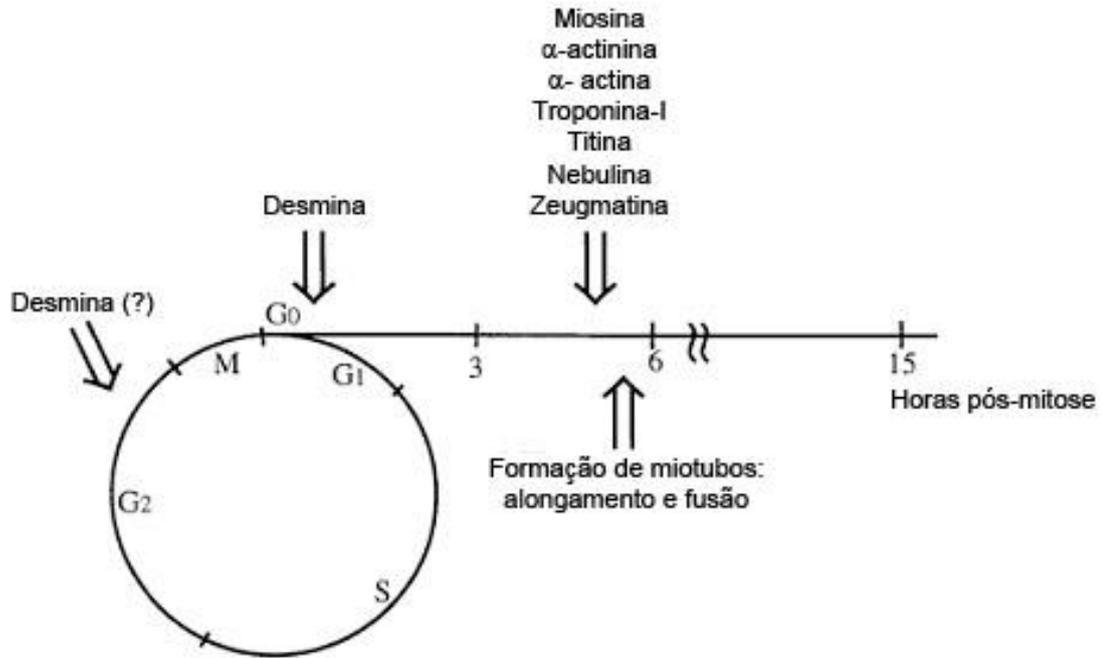


Figura 1.13 – Expressão temporal das proteínas sarcoméricas em células musculares esqueléticas.

Proteínas expressas durante o processo de diferenciação celular. Adaptado de Lin *et al*, 1994 (76).

A família de proteínas da Miosina compreende 35 classes diferentes de moléculas, desempenhando inúmeras funções celulares. Uma dessas funções é a contração muscular que é desempenhada pela miosina da classe II (79). A miosina sarcomérica está presente nos filamentos grossos e é composta por três cadeias que estão dispostas em pares: cadeia pesada, cadeia leve regulatória e cadeia leve essencial. Parte das cadeias pesadas da miosina formam uma cauda que se entrelaçam em espiral. O restante das cadeias pesadas mais as cadeias leves essenciais e regulatórias formam duas cabeças globulares (Figura 1.14) (80).

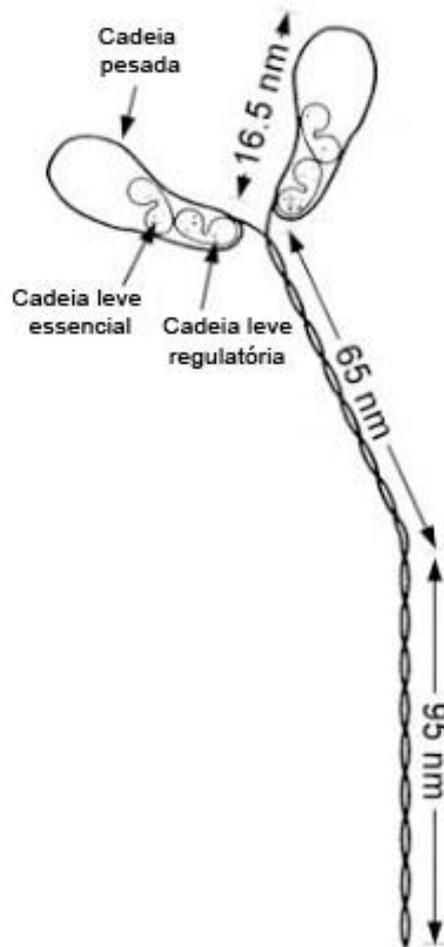


Figura 1.14 – Molécula de Miosina.

Representação esquemática da molécula de miosina, composta por dois pares de cadeias leves, um par de cadeia pesada. Adaptado de Hooper, 2005 (80).

O sarcômero é a unidade contrátil da célula muscular e entre os vertebrados possui uma organização muito similar. Essa estrutura é delimitada pela distância entre duas linhas Z que são compostas principalmente por desmina e α -actinina. As laterais das linhas Z são compostas por filamentos finos de actina, α -actinina, Tropomiosina e Troponina, esse conjunto é denominado de banda I. Uma metade da banda I é pertencente a um sarcômero enquanto a outra metade pertence ao sarcômero adjacente (80) e a união de sarcômeros dispostos longitudinalmente forma uma estrutura chamada de miofibrila e cada fibra muscular é composta por inúmeras miofibrilas (81). Os filamentos finos estão presentes em toda extensão da linha Z e se prolongam para o centro do sarcômero. No centro do sarcômero estão os filamentos grossos que são denominados de banda H. A banda H mais as suas laterais são denominadas de banda A, onde é encontrada a Miosina. Bem no centro da banda H existe uma linha mais densa que é chamada de linha M que é composta

de Miomesina e proteína M. Na linha Z até o início da banda H são encontrados filamentos de actina. A Titina é uma proteína gigante de mais de 2 mil kDa que está presente em toda extensão do sarcômero, conectando as linhas M e Z (Figura 1.15) (80) e, devido a sua elasticidade, possui um papel fundamental na manutenção do preciso arranjo estrutural do sarcômero durante a contração muscular (82).

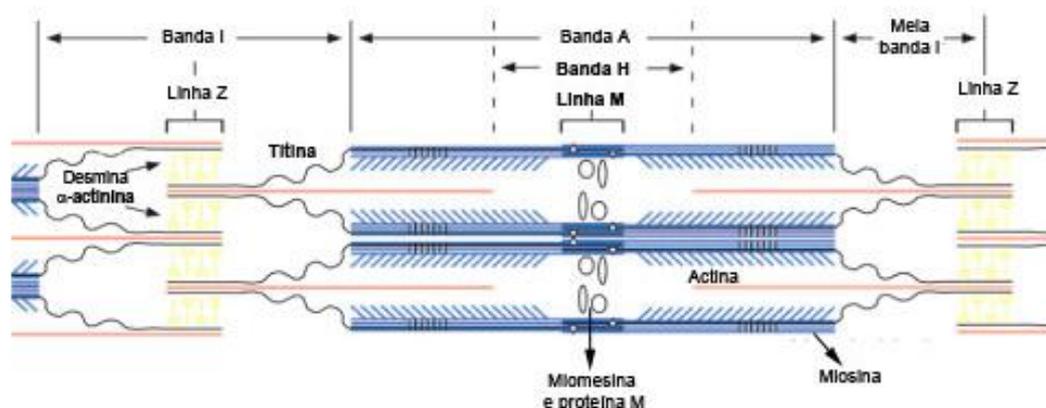


Figura 1.15 – Estrutura do sarcômero.

Representação esquemática estrutural do sarcômero. Desmina e α -actinina (amarelo), miosina (azul), miomesina (elipse), proteína M (círculo), actina (vermelho) e titina (preto). Adaptado de Hooper, 2005 (80).

1.7 Cultura de células musculares esqueléticas

A cultura de células musculares foi desenvolvida com o intuito de observar e explicar os fenômenos envolvidos no processo de formação do músculo e regeneração do tecido muscular. As primeiras observações do comportamento do tecido muscular *in vitro* foram feitas utilizando cultura de tecido muscular de embriões de galinha (83), como por exemplo a experiência feita por Margaret e Warren Lewis em 1917, onde eles observaram o comportamento de células musculares esqueléticas em cultura a partir do explante de embriões de galinha no 7º dia de desenvolvimento (84).

A cultura de células em monocamada só se tornou realidade em meados do século XX com o refinamento das técnicas de cultivo, e a primeira cultura a ser desenvolvida utilizando esses novos recursos foi feita por Aaron Moscona, em 1951, utilizando embrião de galinha, na qual foi possível identificar mioblastos próximos a condrócitos (83). Entretanto, Konigsberg foi o primeiro a demonstrar a miogênese *in vitro* em 1963. Ele mostrou que os mioblastos eram capazes de se diferenciar em

fibras musculares, assim como ocorre *in vivo*, em meio condicionado enriquecido com soro (83,85).

A cultura de células musculares foi então estabelecida pela dissociação mecânica e/ou enzimática do músculo do peito de embrião de galinha com 10 dias de desenvolvimento, e mantidas em meio suplementado com soro de cavalo e extrato embrionário (86,87). A adição do extrato embrionário é importante, pois além de ser mitogênico, ele estimula a fusão das células musculares e a adesão celular (88). A cultura de célula muscular de embrião de galinha forma miotubos grandes e bastante contráteis (89).

As células que são isoladas pela tripsinização do músculo estriado esquelético de embriões de galinha possuem morfologia esférica e rapidamente aderem ao substrato (90). Inicialmente, estas células possuem um intenso caráter mitótico e migratório e, logo após a adesão, algumas células começam a apresentar um formato alongado, que vão se fundir umas às outras para formar miotubos (90). O momento em que a fusão ocorre *in vitro* pode variar de acordo com a composição do meio e da densidade celular (91). De forma geral, com 17 horas de plaqueamento, os mioblastos de embrião de galinha entram em G0 e começam a se alinhar. Com 24 horas após o plaqueamento, é possível observar células com formato fusiforme bem demarcado, e a partir deste ponto começa a fusão destas células para a formação de fibras multinucleadas (91). O pico da fusão ocorre dentro de um período de 10 horas, iniciando-se após 20 horas de plaqueamento, ou seja, aproximadamente entre 20 - 30 horas de cultura (92). Porém, 43 horas após o plaqueamento, este fenômeno ainda pode ser observado (91). Após 72 horas de plaqueamento, as células terminaram de se fundir, estando a cultura totalmente diferenciada (91,92). O maior amadurecimento destas fibras recém formadas ocorre em tempos mais tardios, em torno de uma semana após o plaqueamento (82). É possível determinar cada fase de diferenciação celular com base nos fatores de transcrição que estão sendo expressos (65), na morfologia das células (82,85) e também pela expressão de proteínas específicas de músculo que compõem o citoesqueleto (76).

1.8 Justificativa

O vírus da febre amarela é o protótipo da família *Flaviviridae* onde se inclui o Vírus da Dengue, o Vírus do Oeste do Nilo, o Vírus da Encefalite Japonesa, o Vírus Zika, entre outros. São vírus altamente patogênicos para humanos que são transmitidos por artrópodes, especialmente mosquitos (93). A febre amarela (FA) acomete populações das regiões Subsaariana da África e Tropical da América do Sul. Nos indivíduos acometidos os sintomas são, em sua maioria, brandos, similares aos da gripe e raramente evoluem para a forma grave da doença, os pacientes manifestam febre, hemorragia, lesões miocárdicas, renais e hepáticas e choque, e que apresenta uma taxa de mortalidade de 50 % (1). A melhor forma de prevenção da febre amarela é através da vacinação em massa das pessoas que residem ou que vão viajar para áreas onde a doença é endêmica. Embora a vacina contra FA seja altamente eficaz, conferindo proteção contra a doença pela vida inteira com uma única dose (51), a febre amarela ainda é uma importante causa de morbidade e mortalidade na África e na América do Sul. Isto se deve principalmente a pessoas que residem em áreas endêmicas e epizooticas, viajantes não vacinados e pessoas às quem a vacina é contraindicada como áquelas que possuem alergia a proteínas do ovo de galinha, crianças menores de 9 meses, adultos maiores de 60 anos e pessoas imunossuprimidas (30,51,94).

A produção da vacina contra a febre amarela é feita pela inoculação da subamostra do vírus FA 17DD em ovos embrionados de galinha livres de patógenos específicos (SPF), de acordo com as normas estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (48). Embora os embriões de galinha sejam utilizados desde 1937 como sistema biológico para produção de vírus da febre amarela (1), apenas recentemente foram descritos, pelo nosso grupo, os tecidos e células responsáveis pela biossíntese das partículas virais nestes embriões (61). A infecção ocorre em diversos tecidos e, ao contrário do que se pensava, neste modelo o fígado não é acometido. O tecido muscular esquelético é o principal tecido onde ocorre a replicação nestes embriões e os mioblastos, aparentemente, constituem o principal sítio de infecção viral (62). Contudo, é necessário aprofundar este dado, confirmando o papel preponderante dos mioblastos, e determinando em que fase da diferenciação muscular ocorre a infecção. A definição do período de diferenciação da célula muscular na qual ocorre a infecção e a análise da hipótese de ocorrência da replicação viral em cultura de tecido muscular, assim como acontece no modelo

animal, ampliaria a possibilidade do desenvolvimento de uma vacina baseada em cultura de células, em um modelo mais próximo do que o que ocorre *in vivo* (22). Esta alternativa apresenta vantagens sobre a produção em ovos embrionados, uma vez que reduz os custos de produção, o número de animais sacrificados e a quantidade de proteína de galinha por dose (54). Tentativas já realizadas da produção da vacina em cultura de fibroblastos de embriões de galinha (CEF), não obtiveram sucesso, pois o resultado se mostrou *borderline* quanto à neurovirulência em macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) (54). Os desdobramentos de nosso trabalho se tornam ainda mais relevantes na medida em que a utilização do vírus FA 17DD se apresenta como uma potencial plataforma para produção de outras vacinas, já que o mesmo tem se mostrado um eficiente vetor viral recombinante de proteínas de outros flavivírus e de protozoários (18,95–97).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a infecção das células musculares esqueléticas de embriões de galinha pelo vírus da febre amarela 17DD, com vistas a elucidar o fenômeno *in vivo* e investigar o potencial de infecção destas células *in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

- 1 - Em embriões de *Gallus gallus domesticus* infectados com vírus da febre amarela 17DD aos nove dias de desenvolvimento:
 - Aprofundar a caracterização fenotípica das células musculares esqueléticas, determinando o estágio de diferenciação em que se encontram;
 - Acompanhar a persistência da infecção no tecido muscular esquelético em tempos mais tardios que 96 horas pós-infecção;
- 2 - Em cultivo primário de células musculares esqueléticas obtidas de peito e patas de embriões de *Gallus gallus domesticus* com 11 dias de desenvolvimento:
 - Avaliar a susceptibilidade e permissividade das células musculares à infecção pelo vírus da FA 17DD;
 - Caracterizar fenotipicamente as células musculares esqueléticas infectadas;
- 3 - Comparar o fenótipo das células infectadas *in vivo* e *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos envolvendo experimentação animal foram realizados conforme aprovado nas licenças CEUA/IOC L-025/2017 e L-028/2017.

3.1 Avaliação *in vivo* do tecido muscular esquelético de embriões de galinha

3.1.1 Coleta dos embriões

Ovos embrionados de *Gallus gallus domesticus* da raça White Leghorn no nono dia de desenvolvimento (dd), infectados ou não pelo vírus FA 17DD foram gentilmente cedidos pela Unidade de Produção da Vacina contra febre amarela (Instituto de Tecnologia em imunobiológicos Bio-manguinhos - FIOCRUZ). Estes foram mantidos em chocadeira (Premium Ecológica, IP 70A) em temperatura controlada (37,7°C) e com umidade entre 28 e 30 %. O protocolo de infecção, bem como a amostra viral, foram os mesmos empregados na produção da vacina antiamarilica. Foram coletadas patas, asas, cabeça e tronco de embriões (n=6, sendo três infectados e três controles por ponto) com 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 216 horas após a infecção (11 a 18 dd). As amostras coletadas foram fixadas e submetidas à técnica histológica.

3.1.2 Processamento histológico dos embriões

Os fragmentos coletados de cada embrião foram identificados com um número de registro, fixados em Formalina Tamponada de Carson por 48 horas e processadas de acordo com protocolo convencional de histotecnologia para amostras impregnadas em parafina. Neste, os fragmentos teciduais foram acondicionados em cassetes histológicos e organizados em um processador automático (Shandon, Citadel 2000). O material foi desidratado em banhos de concentrações crescentes de álcool (50 %, 70 %, 80 % e 95 %) com duração de 40 minutos cada e quatro banhos de álcool absoluto, tendo os dois primeiros banhos a duração de 40 minutos e os dois últimos a duração de 1 hora. Em seguida, as amostras foram clarificadas em dois banhos de Xilol, com duração de 1 hora cada. Por fim, a impregnação pela parafina foi feita com dois banhos em parafina, sendo

cada banho de 1:30 horas. Após o processamento, os cassetes foram levados para a central de inclusão (Shandon, Histocentre 2) onde os fragmentos foram incluídos em um molde de parafina. Em seguida, cortes de 5 micrômetros foram confeccionados e aderidos em lâminas histológicas revestidas com albumina ou silane.

3.1.3 Coloração pela Hematoxilina e Eosina

Cortes foram desparafinizados com 3 banhos de xilol, 3 minutos cada banho e hidratados em banhos de concentração decrescente de álcool (100 %, 95 % e 70 %) até a água destilada.

Em seguida, as lâminas foram imersas em hematoxilina de Mayer durante 25 minutos e lavadas em água corrente por 20 minutos. Após esta etapa, as amostras foram desidratadas em álcool 70 % por 1 minuto, coradas em eosina-floxina durante 2 minutos e lavadas rapidamente em álcool 95 %. Após a coloração, os tecidos foram desidratados em 3 banhos de 3 minutos em álcool absoluto e clarificados em 3 banhos de xilol, 3 minutos cada. As lâminas foram seladas em goma de Damar. Neste método, as estruturas acidófilas, como o citoplasma, coram-se em róseo e as estruturas basófilas, como o núcleo, coram-se em roxo. Os cortes foram analisados em microscopia de campo claro em microscópio Axiohome (Carl Zeiss, Alemanha), fotografados com câmera AxioCam HRc (Carl Zeiss, Alemanha) utilizando o *software* Axiovision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha).

3.1.4 Detecção de proteínas intracelulares por imunomarcação indireta em embriões de *Gallus gallus domesticus*

Para detecção de proteínas intracelulares, cortes histológicos foram previamente desparafinizados, hidratados, e submetidos à técnica de imunofluorescência indireta para análise da diferenciação muscular (Pax7, desmina e miosina) e da infecção viral (FA17DD). Para tal, as lâminas foram colocadas em câmara de pressão (Pascal DAKO) com solução de tampão citrato de sódio pH 6,0 (Sigma) para recuperação antigênica. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente durante 10 minutos. Os cortes foram circulados com caneta hidrofóbica e lavados 3 vezes, 5 minutos cada, com PBS (LGC Biotecnologia, cat. 13-30258-05) pH 7,2. Em seguida, foi realizado o bloqueio com solução de 2 % de

leite em pó, 2,5 % de albumina bovina sérica (Sigma, cat. A2153-100G) e 8% de soro fetal bovino (Hyclone, cat. SH30088.03). Após 20 minutos de incubação a temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas 3 vezes, 5 minutos cada lavagem, com PBS pH 7,2. Feito isso, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário (Tabela 3.1) *overnight* a 4 °C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas 3 vezes, 7 minutos cada, com PBS pH 7,2 e incubadas com o anticorpo secundário de acordo com o animal no qual o anticorpo primário foi produzido (Tabela 3.2) em estufa a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, as lâminas foram lavadas 3 vezes, 7 minutos cada, com PBS pH 7,2, e os cortes foram incubados com DAPI 1/5000 em temperatura ambiente por 10 minutos. Por último, os cortes foram lavados 3 vezes por 5 minutos cada com PBS pH 7,2 e montados em meio *anti-fading* Prolong Gold (Life Technologies, cat. p36934). Todas as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência Axio Observer Z1 equipado com sistema Colibri (Carl Zeiss, Alemanha). Campos específicos foram analisados também em microscópio de superresolução ELYRA PS.1 (Carl Zeiss, Alemanha) e sistema confocal LSM 710 (Carl Zeiss, Alemanha).

Tabela 3.1 - Relação dos anticorpos primários utilizados para imunomarcção

Anticorpo primário	Origem	Diluição	Fornecedor
Fluido ascítico Anti-febre amarela	Camundongo	1/100	Instituto Evandro Chagas (Belém - PA)*
Anti-pax 7	Camundongo	1/200	Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa - USA)**
Anti-desmina	Coelho	1/200	Thermo Fisher Scientific, cat. RB-9014-P1
Anti-miosina	Coelho	1/800	abcam, cat. ab124205

* Anticorpo cedido pela Dra. Rita Nogueira do Laboratório de Biologia de Flavivírus/IOC

** Anticorpo cedido pela Dra. Andrea Henriques Pons do Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos/IOC

Tabela 3.2 - Relação dos anticorpos secundários utilizados para imunomarcção

Anticorpo secundário	Diluição	Fornecedor
Alexa Fluor 546 anti-camundongo	1/400	Invitrogen, cat. A11003
Alexa Fluor 488 anti-camundongo	1/750	Invitrogen, cat. A11001
Alexa Fluor 635 anti-coelho	1/750	Invitrogen, cat. A31576

3.2 Avaliação *in vitro* de culturas primárias de células musculares esqueléticas

3.2.1 Obtenção do vírus da febre amarela 17DD

Embriões infectados pelo vírus da febre amarela 17DD foram utilizados para obtenção das partículas virais usadas na infecção das células musculares em cultura. Três animais foram inoculados com a amostra vacinal no nono dia de desenvolvimento no Instituto de Tecnologia em imunobiológicos Bio-manguinhos – FIOCRUZ, conforme protocolo de produção da vacina. Os controles não estavam infectados e não receberam nenhum tipo de tratamento prévio. Os ovos foram mantidos em chocadeira (Premium Ecológica, IP 70A) a 37,7 °C, umidade entre 28 e 30 %, No 12º (dd) dia de desenvolvimento, os embriões foram coletados e em seguida triturados inteiros a 4 °C com 3 mL de água destilada no seguinte protocolo: trituração por 1 minuto, 30 segundos de pausa e mais 30 segundos de trituração. Os controles passaram pelo mesmo protocolo. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 3000 g, 4°C durante 1 hora. O sobrenadante foi coletado e, a cada 5 mL, foram adicionados 1,4 mL da solução de sacarose 50 % e glutamato 50 % (2:1). Alíquotas de 0,5 mL foram separadas em microtubos de centrífuga e armazenados em freezer -80 °C para titulação e posterior uso em cultura.

3.2.2 Cultura de células musculares esqueléticas

Tecido muscular esquelético proveniente do peito e patas de seis embriões não infectados com 11 dd foram coletados com material cirúrgico estéril. O tecido epitelial foi completamente retirado e o tecido muscular foi mantido em MEM (*Minimum Essential Medium*) (LGC, cat. BR30008-05) puro, previamente aquecido a 37 °C, até o término da coleta do músculo de todos os embriões. Feito isso, os tecidos retirados foram vigorosamente picotados e em seguida dissociados em 5 mL

de tripsina-EDTA 0,05 % (Gibco, cat. 25300054) a 37 °C durante 10 minutos. Para inativar a tripsina, foi colocado 6 mL de MEM a 4 °C enriquecido com 10 % de soro de cavalo (Gibco, cat. 26050088) e 5 % de extrato embrionário. O tubo contendo as células foi centrifugado a 300 g durante 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pelete ressuspendido em 6 mL de MEM enriquecido com 10 % de soro de cavalo, 5 % de extrato embrionário e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL estreptomicina, Gibco, cat 15140122). As células provenientes desta dissociação foram contadas e plaqueadas na concentração de 4×10^5 células/poço em placas de 24 poços revestidas com gelatina 2 %. Estas células foram mantidas em meio MEM enriquecido com 10 % de soro de cavalo, 5 % de extrato embrionário e antibióticos.

3.2.3 Infecção das células musculares esqueléticas em cultura pelo vírus da febre amarela 17DD

Células obtidas pelo método supracitado foram infectadas com o vírus da febre amarela 17DD em quatro protocolos distintos.

3.2.3.1 Células musculares esqueléticas de galinha expostas ao vírus da febre amarela 17DD no momento do plaqueamento (T₀).

Neste método de infecção, as células foram expostas ao vírus no momento do plaqueamento, com as células ainda em suspensão nas MOIs de 0,002, 0,01, 0,1 e 1,0 em meio MEM puro. Após 1 hora de infecção, foram adicionados 100 µl de soro de cavalo em cada poço para facilitar a adesão das células. Após quatro horas, o inóculo foi retirado e adicionado 1 mL/poço de meio MEM enriquecido com 10 % de soro de cavalo, 5 % de extrato embrionário e antibióticos. Após 24, 48 e 72 horas de infecção, as células aderidas em lamínulas foram fixadas em formalina tamponada de Carson por 10 minutos à temperatura ambiente e foram utilizadas nos ensaios de imunofluorescência indireta com os mesmos anticorpos empregados nos embriões. Os sobrenadantes das culturas positivas foram armazenados em freezer - 80 °C e utilizados para quantificação viral por PFU e o extrato das células foi usado para detecção do material genômico viral pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.2.3.2 Células musculares esqueléticas de galinha expostas ao vírus da febre amarela 17DD 5 horas após o plaqueamento (T5).

Neste método de infecção, as células foram plaqueadas na concentração de 4×10^5 células/poço em 1 mL de MEM enriquecido com 10% de soro de cavalo, 5% de extrato embrionário e antibióticos. Após 5 horas de plaqueamento, com as células aderidas à placa, o meio foi totalmente retirado, a monocamada foi lavada uma vez com MEM puro para retirar qualquer resquício de soro de cavalo e extrato embrionário que tenha ficado, e em seguida foi adicionado 1 mL MEM puro contendo partículas virais no MOI de 0,1 durante 1 hora. Passado o tempo de infecção, o inóculo foi retirado e adicionado 1 mL/poço de MEM enriquecido com 10 % de soro de cavalo, 5 % de extrato embrionário e antibióticos. Após 24, 48 e 72 horas de infecção, as células aderidas em lamínulas foram fixadas em formalina tamponada de Carson por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram utilizadas nos ensaios de imunofluorescência indireta com os mesmos anticorpos empregados nos ensaios *in vivo*. Os sobrenadantes das culturas foram armazenados em freezer -80 °C e utilizados para quantificação viral por PFU e o extrato das células foi usado para detecção do material genômico viral pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.2.3.3 Células musculares esqueléticas de galinha expostas ao vírus da febre amarela 17DD 24 horas após o plaqueamento (T24).

Neste método de infecção, as células foram plaqueadas na concentração de 4×10^5 células/poço em 1 mL de MEM enriquecido com 10 % de soro de cavalo, 5 % de extrato embrionário e antibióticos. Após 24 horas de plaqueamento, o meio foi totalmente retirado, a monocamada foi lavada uma vez com MEM puro para retirar qualquer resquício de soro de cavalo e extrato embrionário, e em seguida foi adicionado 1 mL de MEM puro contendo partículas virais na MOI de 0,1 e 0,01 durante 1 hora. Passado o tempo de infecção, o inóculo foi retirado e adicionado 1 mL/poço de MEM enriquecido com 10 % de soro de cavalo, 5 % de extrato embrionário e antibióticos. Após 24, 48 e 72 horas de infecção, as células aderidas em lamínulas foram fixadas em formalina tamponada de Carson por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, essas lamínulas foram utilizadas nos ensaios de imunofluorescência indireta com os mesmos anticorpos empregados nos

embriões. Os sobrenadantes das culturas infectadas e controles foram armazenados em freezer -80 °C e utilizados para quantificação viral por PFU e o extrato das células foi usado para detecção do material genômico viral pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.2.3.4 Células musculares esqueléticas de galinha expostas ao vírus da febre amarela 17DD 120 horas após o plaqueamento (T120).

Neste método de infecção, as células foram plaqueadas na concentração de 4×10^5 células/poço em 1mL de MEM enriquecido com 10 % de soro de cavalo, 5 % de extrato embrionário e antibióticos. O meio foi trocado a cada dois dias para manutenção da cultura. Após 120 horas de plaqueamento (5 dias), o meio foi totalmente retirado, a monocamada foi lavada uma vez com MEM puro para retirar qualquer resquício de soro de cavalo e extrato embrionário, e em seguida foi adicionado 1mL MEM puro contendo partículas virais na MOI de 0,1 durante 1 hora. Passado o tempo de infecção, o inóculo foi retirado e adicionado 1 mL/poço de meio enriquecido com 10 % de soro de cavalo, 5 % de extrato embrionário e antibióticos. Após 48 horas de infecção, as células aderidas em lamínulas foram fixadas em formalina tamponada de Carson por 10 minutos a temperatura ambiente e foram utilizadas nos ensaios de imunofluorescência indireta com os mesmos anticorpos empregados nos embriões.

3.2.4 Passagem do vírus produzido *in vitro* em células musculares esqueléticas obtidas de embrião de galinha.

Partículas virais obtidas pela infecção das células no momento do plaqueamento (T0) após 48 hpi da cultura primária de células musculares esqueléticas de embrião de galinha, foram utilizadas como inóculo para passagem do vírus em cultura. O protocolo utilizado foi o mesmo do item 3.2.3.1, excetuando apenas a MOI do inóculo, que neste experimento foi de 0,01. Células musculares recém-isoladas de embrião de galinha no 11^o dd foram expostas a MOI do inóculo de 0,01 do vírus da febre amarela 17DD produzido *in vitro*. Após 1 hora de infecção, foram adicionados 100 µl de soro de cavalo em cada poço para facilitar a adesão das células. Após quatro horas, o inóculo foi retirado e adicionado 1 mL/poço de meio MEM enriquecido com 10 % de soro de cavalo, 5 % de extrato embrionário e

antibióticos. Após 24, 48 e 72 horas de infecção, as células aderidas em lamínulas foram fixadas em formalina tamponada de Carson por 10 minutos à temperatura ambiente e foram utilizadas nos ensaios de imunofluorescência indireta com os mesmos anticorpos empregados nos embriões. Os sobrenadantes das culturas positivas foram armazenados em freezer -80° C e utilizados para quantificação viral por PFU e o extrato das células foi usado para detecção do material genômico viral pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para facilitar a compreensão dos momentos de infecção (T0, T5, T24 e T120) e tempos de coleta (24, 48 e 72 hpi), a metodologia dos itens 3.2.3, 3.3.4 e 3.2.5 está esquematizado no fluxograma abaixo:

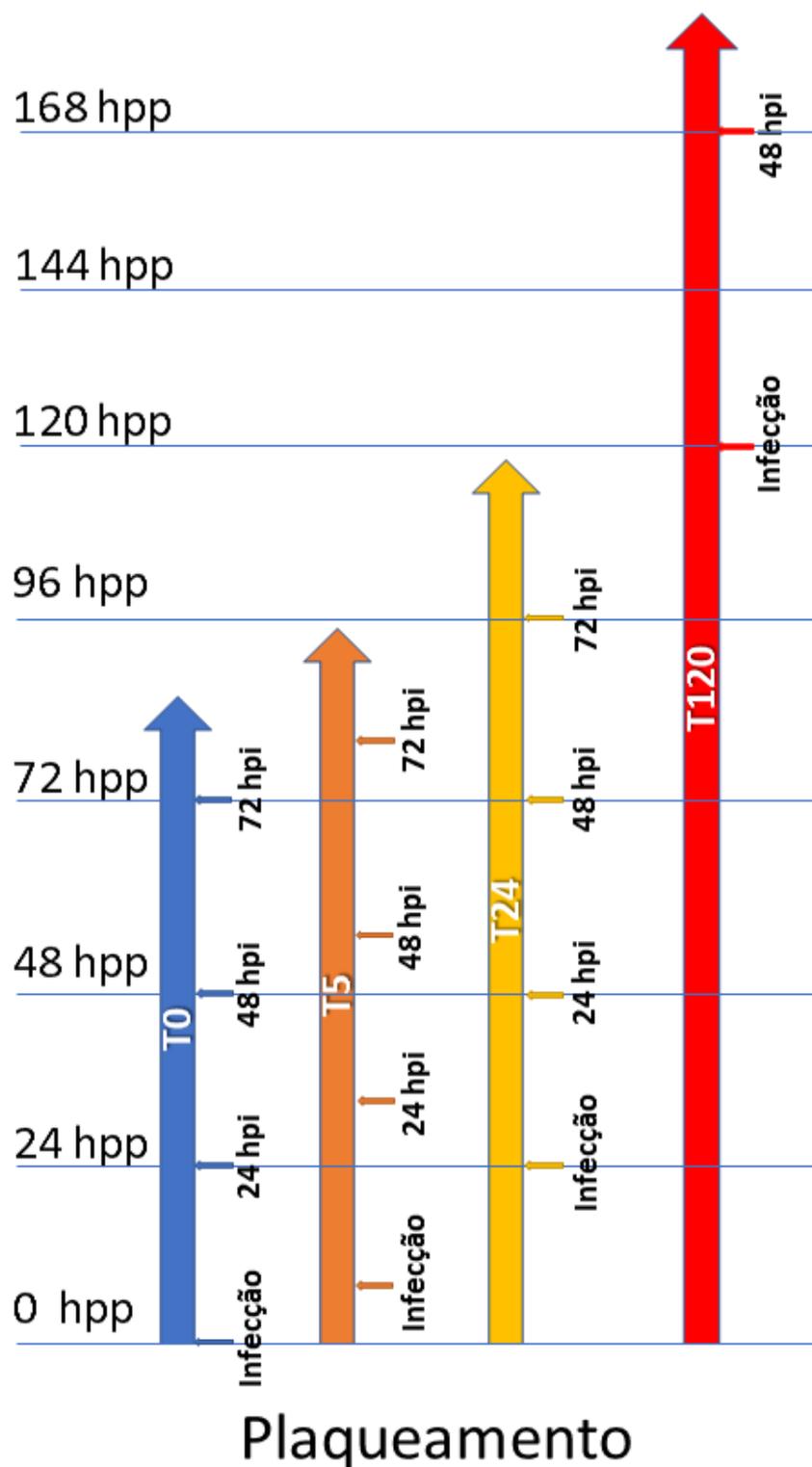


Figura 3.1 - Fluxograma representativo do delineamento experimental dos momentos de infecção e pontos de coletas das culturas de células musculares esqueléticas de embriões de galinha infectadas *in vitro* pelo vírus da febre amarela 17DD utilizando a MOI de 0,1.

3.2.5 Imunomarcação indireta para detecção de proteínas intracelulares em cultura de células musculares esqueléticas

Após coletar o sobrenadante da cultura, as células foram fixadas por 10 minutos em formalina tamponada de Carson e lavadas 3 vezes em PBS pH 7,2. Posteriormente, as células foram permeabilizadas com 3 lavagens de 10 minutos cada utilizando solução de Triton X-100 0,1 % (Sigma). Em seguida, as células foram lavadas uma vez em PBS pH 7,2 e realizado o bloqueio com solução de 2 % de leite em pó, 2,5 % de albumina bovina sérica e 8 % de soro fetal bovino. Após 20 minutos de incubação, as lâminas foram lavadas 3 vezes, 5 minutos cada, com PBS pH 7,2. Feito isso, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário (Tabela 3.1) em estufa a 37 °C por 1 hora. Ao término desta incubação, as lâminas foram lavadas 3 vezes, 7 minutos cada, com PBS pH 7,2 e incubadas com o anticorpo secundário (Tabela 3.2) em estufa a 37 °C por 1 hora. Após mais 3 lavagens de 7 minutos cada com PBS pH 7,2, as células foram incubadas com DAPI 1/5000 em temperatura ambiente por 10 minutos. Por último, as células foram lavadas 3 vezes por 5 minutos cada com PBS pH 7,2 e montadas em meio *antifading* Prolong Gold. Todas as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência Axio Observer Z1 equipado com sistema Colibri (Carl Zeiss, Alemanha). Campos específicos foram analisados também em microscópio de superresolução ELYRA PS.1 (Carl Zeiss, Alemanha) e sistema confocal LSM 710 (Carl Zeiss, Alemanha).

3.2.6 Titulação viral

A titulação das amostras virais foi feita pela técnica de unidade formadora de placa (PFU) utilizando o sobrenadante das culturas infectadas pelo vírus da Febre marela 17DD. Células Vero foram plaqueadas em placas de 24 poços a 1×10^5 cél/mL por 24 horas antes do uso. Os sobrenadantes das culturas infectadas neste trabalho contendo os vírus foram diluídos seriadamente da diluição 10^{-1} até 10^{-6} em meio Earle's 199. A monocamada de células Vero foi então inoculada com 100µL de cada diluição viral e incubada por 1h a 37°C e 5% de CO₂ com agitação suave a cada 15 minutos. Em seguida, o inóculo foi retirado e adicionado 1 mL de carboximetil celulose (CMC) (Sigma) 3.5 % em meio Earle's 199 enriquecido com 5 % de NaHCO₂ e 5 % de soro fetal bovino. Após 7 dias de incubação a 37 °C e 5 % de CO₂, as células foram fixadas com formaldeído a 10 % e coradas com solução de

cristal violeta a 0,4 %. Foi feita uma contagem do número de placas de lise em cada poço para o cálculo o número de unidades formadoras de placas (PFU) por mL. Para o cálculo do título viral de cada amostra foi utilizada a seguinte fórmula:

$$T = \log_{10}M + \log_{10}ID + \log_{10}FC, \text{ onde:}$$

T = título expresso em \log_{10} PFU/mL;

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. Como o inóculo corresponde a 100 μ L, FC = 1 ($\log_{10} = 1$).

3.2.7 Extração do RNA total das células cultivadas

As células em cultura foram submetidas à técnica de PCR para detecção do RNA genômico e do intermediário replicativo para confirmar a infecção pelo vírus FA17DD e sua replicação. O meio de cultura foi retirado e a extração do RNA total foi feita pela adição de 0,5 mL de Trizol (Thermo Fischer) em cada poço. As células foram lisadas e o material foi transferido para um microtubo de centrifuga de 1,5 mL. Em seguida, 0,1 mL de clorofórmio foi adicionado em cada microtubo. Este foi agitado vigorosamente durante 15 segundos e incubado em temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado por 15 minutos a 12000 *g* e 4 °C. Neste momento, três fases são formadas no microtubo. A primeira, que é uma fase aquosa, foi retirada cuidadosamente e transferida para outro microtubo. Em seguida, foi adicionado 1,0 mL de isopropanol 100 % ao tubo contendo a fase aquosa e o mesmo foi incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Feito isso, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 12000 *g* e 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, adicionou-se 1 mL de etanol 75 % e os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 7500 *g* e 4 °C. O sobrenadante foi novamente descartado e os tubos ficaram abertos por 5 minutos dentro da cabine de segurança biológica para secar todo o conteúdo. O material foi ressuspense em 20 μ L de água livre de RNase. O material seguiu então para a técnica de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.2.8 Transcrição reversa e PCR

Para a desnaturação do RNA, foi utilizado para cada 5 µL de RNA, 1 µL de primer (RNA genômico YF-1 - 5` GGTCTCCTCTAACCTCTAG 3` ou intermediário replicativo YF-3 - 5` GAGTGGATGACCACGGAAGACATGC 3`, estes primers reconhecem regiões da NS5) e 4 µL de água. As amostras foram aquecidas no termociclador a 94°C por 2 minutos. Após a desnaturação, as amostras foram acondicionadas no gelo. Após o resfriamento das amostras, 10 µL do Master Mix (Tabela 3.3) foram adicionados por amostra e as mesmas foram incubadas por 1 hora a 52 °C para obtenção da fita de DNA complementar (cDNA).

Tabela 3.3 - Master Mix para transcriptase reversa (RT)

Reagente	Volume (µl)/reação
Tampão da enzima	4 (5x)
H ₂ O	1
dNTP	2 (10 mM)
DTT (0.1 M)	1 (0.1 M)
Inibidor de RNase (RNaseOUT)	1 (40 U/µL)
RT (Thermoscript – Invitrogen)	1 (15 U/mL)
Volume da reação	20

Para reação em cadeia da polimerase (PCR), foi utilizado 2 µL da amostra obtida no passo anterior e adicionado 10 µL do Master Mix (Tabela 3.4). As amostras foram colocadas no termociclador onde passaram por 30 ciclos de reação de amplificação, sendo cada ciclo composto por três etapas: desnaturação 94 °C por 20 segundos, anelamento 52 °C por 50 segundos e polimerização 72°C por 50 segundos.

Tabela 3.4 - Master Mix para PCR

Reagente	Volume (µl) - 2 reações
H ₂ O	40
Tampão da enzima	5 (10x)
Mg ⁺⁺	1,5 (50mM)
dNTP	1 (10 mM)
Primers (YF1 e YF3 - (98))	0,5 (de cada primer)
Taq polimerase (Platinum Taq)	0,4
cDNA	2
Volume final da reação	25

Os produtos amplificados por PCR, provenientes dos extratos das culturas infectadas e controles, foram submetidos à eletroforese (E-Gel iBase Power System) em gel de agarose a 2 % contendo brometo de etídio (E-Gel Invitrogen, Life Technologies, cat. G501802). Para isso, foram aplicados em cada poço do gel 8 µl de amostra amplificada e 12 µl de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,003%) e submetidos à eletroforese para separação dos fragmentos de DNA. Como referência, foi utilizado o padrão de massa molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen, Life Technologies, cat. 15628-050). Ao término da corrida eletroforética, os géis foram expostos a transiluminação ultravioleta e foto-documentados (Kodak gel Logic Gel 2200, Hiland scientific, Washinton, EUA) para posterior análise. As amostras amplificadas pela PCR foram consideradas positivas pela presença de bandas correspondentes a 675 pares de bases.

4 RESULTADOS

Embora o conjunto de resultados que compõem este trabalho sejam complementar, para acompanhar a divisão da metodologia e facilitar a leitura, separamos em dois blocos. Na primeira parte do texto, serão descritos os dados observados nos embriões de galinha infectados pelo vírus da febre amarela 17DD, conforme o protocolo de produção da vacina. Na segunda parte do texto, serão descritos os dados observados em cultura de células musculares esqueléticas de embriões de galinha infectadas pelo vírus da febre amarela 17DD.

Para fins de nomenclatura, os critérios morfológicos e fenotípicos utilizados na descrição dos resultados estão descritos na tabela a seguir (Tabela 4.1):

Tabela 4.1 – Critérios utilizados para identificar os tipos celulares estudados:

Tipo celular	Quantidade de núcleos	Tamanho do núcleo	Imunofenótipo	Morfologia
<u>Precursor miogênico</u>	1 núcleo	Pequeno	Pax 7 ⁺ , Desmina ⁻ ou Miosina ⁻	Arredondada
<u>Mioblasto</u>	1 núcleo	Pequeno	Pax 7 ⁻ , Desmina ⁻ ou Miosina ⁻	Arredondada
<u>Miócito</u>	1 núcleo	Pequeno	Pax 7 ⁻ , Desmina ⁺ ou Miosina ⁺	Fusiforme
<u>Fibra</u>	2 ou mais núcleos	Pequeno	Pax 7 ⁻ , Desmina ⁺ ou Miosina ⁺	Fusiforme ou alongada
<u>Fibroblasto</u>	1 núcleo	Grande	Pax 7 ⁻ , Desmina ⁻ ou Miosina ⁻	Espraiada

4.1 Avaliação *in vivo* do tecido muscular esquelético de embriões de galinha entre 11 e 18 dias de desenvolvimento

Tecido muscular esquelético de embriões de galinha com 48 e 72 horas pós infecção (hpi) (11 e 12 dd, respectivamente) foram analisados quanto a sua morfologia e à presença de proteínas virais.

A análise de cortes histológicos corados pela Hematoxilina e Eosina observados por microscopia de campo claro mostrou que, em ambos animais

controles (Figura 4.1 A e B) e infectados (Figura 4.1 C e D), foram observadas fibras musculares multinucleadas, algumas células com núcleos picnóticos ou fragmentados, sugerindo apoptose, e não foi detectada a presença de infiltrado inflamatório. No entanto, aparentemente as áreas de apoptose são mais frequentes nos animais infectados.

Na análise por imunofluorescência destes mesmos animais foi possível observar células musculares em diferentes estágios de diferenciação, positivas para marcação de proteínas do vírus 17DD. Foram observados precursores miogênicos infectados pelo vírus (Figura 4.2 A e B, Figura 4.3, Figura 4.4 e Figura 4.5) que estavam próximos a fibras musculares multinucleadas não infectadas, entremeadas por estas fibras e, às vezes, aparentemente se fusionando a elas (Figura 4.2 C e Figura 4.3). A marcação para proteínas virais nestas fibras foi detectada em adensamentos perinucleares com padrão que, por vezes, acompanhava a estriação da fibra (Figura 4.2 C e Figura 4.4). Também foram observados precursores miogênicos não infectados, porém próximos a fibras musculares infectadas (Figura 4.2). Alguns miócitos infectados também puderam ser observados (Figura 4.2 D), assim como a presença de núcleos picnóticos e cariorex (Figura 4.4), sugerindo apoptose.

A análise mais tardia da infecção foi feita utilizando embriões entre 120 e 216 hpi (14 e 18 dias de desenvolvimento, respectivamente). Cortes histológicos do tecido muscular esquelético de embriões corados pela Hematoxilina e Eosina foram observados por microscopia de campo claro. Em 120 hpi, foi observada nos animais controles uma clara organização do tecido muscular esquelético em perimísio, feixes musculares, endomísio e fibras musculares (Figura 4.6 A). Nos animais infectados esta organização é perdida, e foi notado um intenso efeito citopático e aparente atraso no desenvolvimento deste tecido nos embriões em 120 hpi (14 dd). Também foi observado um aparente aumento de núcleos fragmentados e picnóticos, além da presença de alguns granulócitos infiltrados no tecido (Figura 4.6 B). Com 144 hpi (15 dd) a organização do tecido muscular esquelético dos embriões infectados é parcialmente reestabelecida, com pontos focais de desorganização (Figura 4.6 C e D). Nos animais de 168 e 216 hpi (16 e 18 dd, respectivamente) essa desorganização do tecido não é mais observada, não havendo mais diferença entre os animais infectados e controles (Figura 4.7).

A avaliação da presença de proteínas virais nestes animais por imunodeteção foi feita por microscopia de fluorescência, onde foi observada com 120 hpi uma fraca marcação para proteínas virais em fibras musculares esqueléticas. A infecção persiste até 144 hpi, onde foi observado, em apenas um embrião, raras células infectadas (Figura 4.8). Com 168 e 216 hpi, a detecção de proteínas virais não foi mais possível pela técnica utilizada.

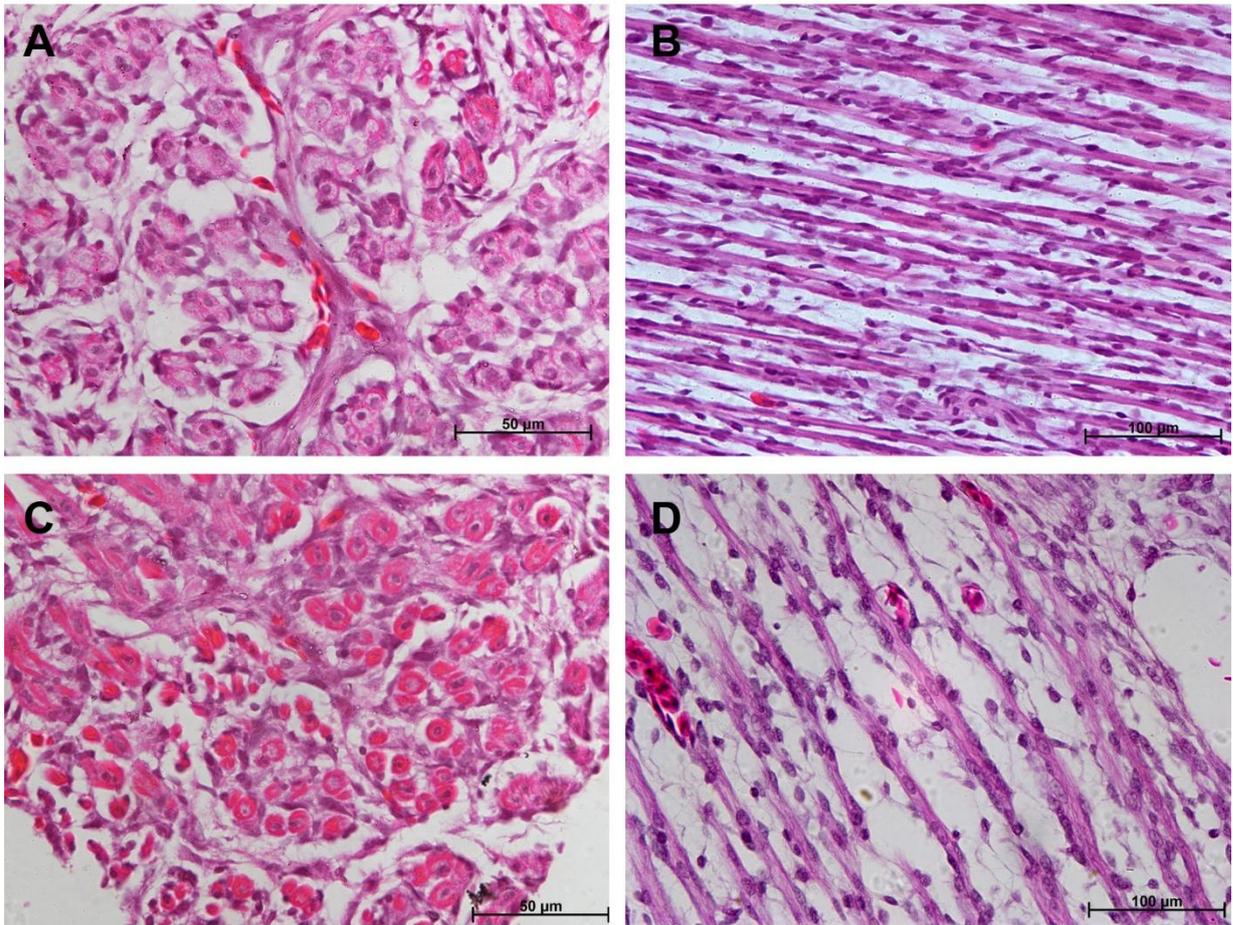


Figura 4.1 – Tecido muscular esquelético de embriões de galinha apresentou pouca diferença morfológica entre os animais infectados e controles com 48 hpi.

Tecido muscular esquelético de embriões de galinha infectados com vírus FA 17DD aos 9 dd e coletados em 48 hpi [11 dd]. A e B - animais controles em 48 hpi; C e D - animais infectados em 48 hpi. Microscopia de campo claro. Coloração de Hematoxilina e Eosina.

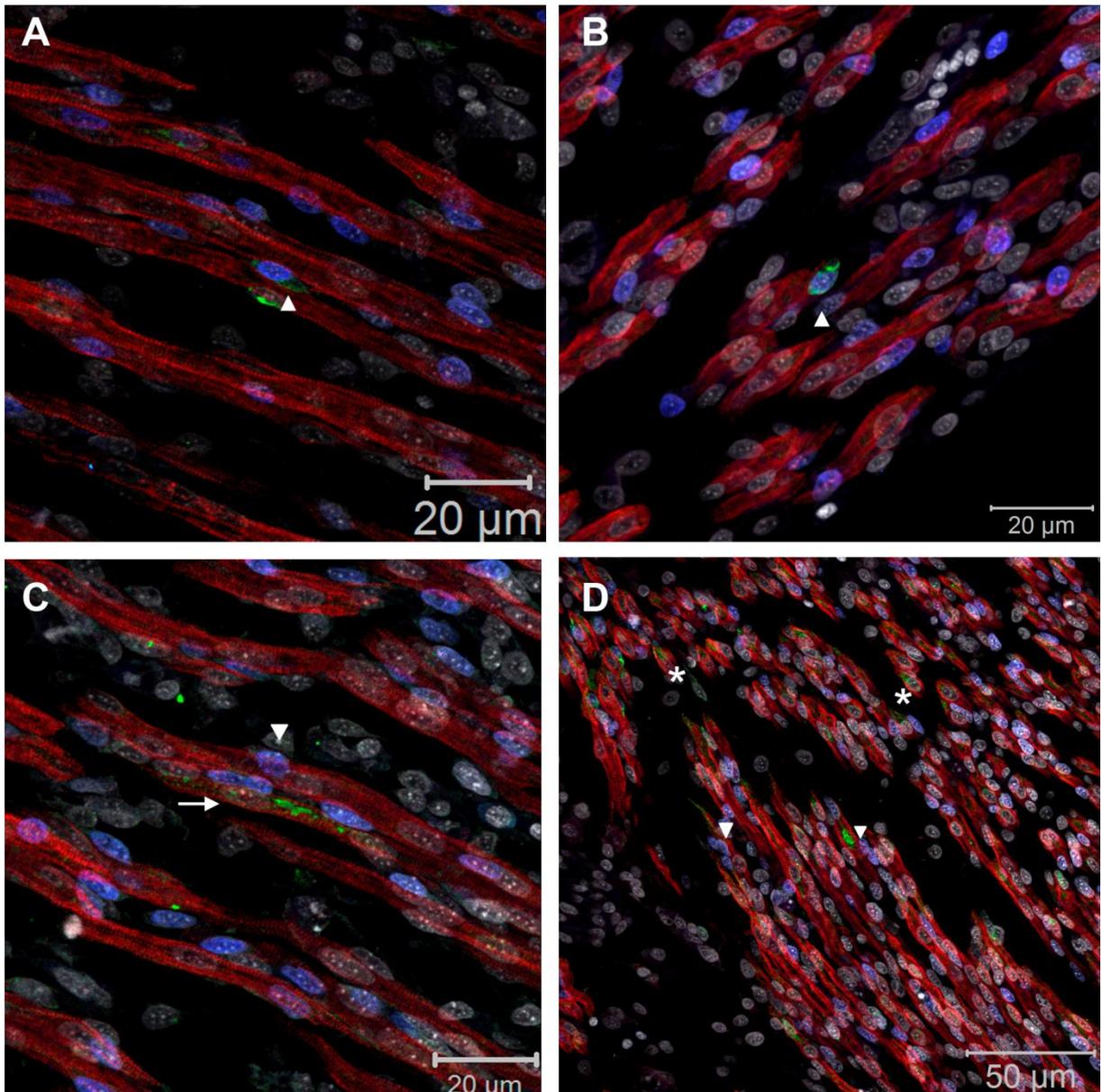


Figura 4.2 – Precursores miogênicos e fibras musculares esqueléticas foram positivas para marcação de FA.

Tecido muscular esquelético de embriões de galinha infectados com vírus 17DD aos 9 dd e coletados em 72 hpi. Áreas com → indicam fibras musculares miosina positivas, áreas com ► indicam precursores miogênicos Pax7 positivos, áreas com * indicam miócitos. Marcação da miosina (vermelho), FA (verde), Pax7 (azul) e núcleo (branco). Microscopia confocal a laser.

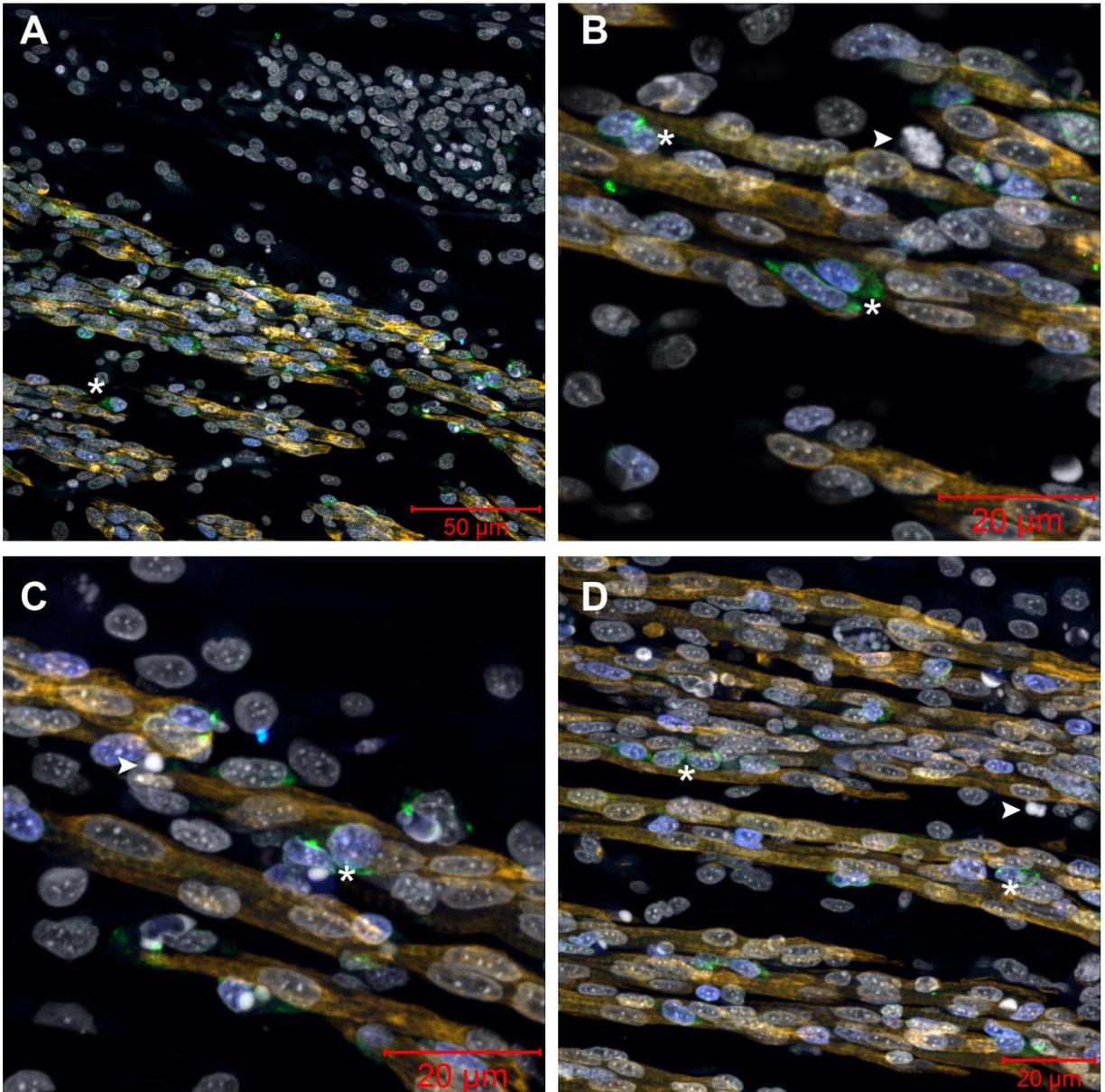


Figura 4.3 – Células com núcleos apoptóticos e kariorex foram observadas próximas a precursores miogênicos infectados.

Tecido muscular esquelético de embriões de galinha infectados com vírus 17DD aos 9 dd e coletados em 48 hpi. Áreas com ▶ indicam núcleos picnóticos e kariorex, áreas com * indicam precursores miogênicos. Marcação anti desmina (amarelo), FA (verde), Pax7 (azul) e núcleo (branco). Microscopia confocal a laser.

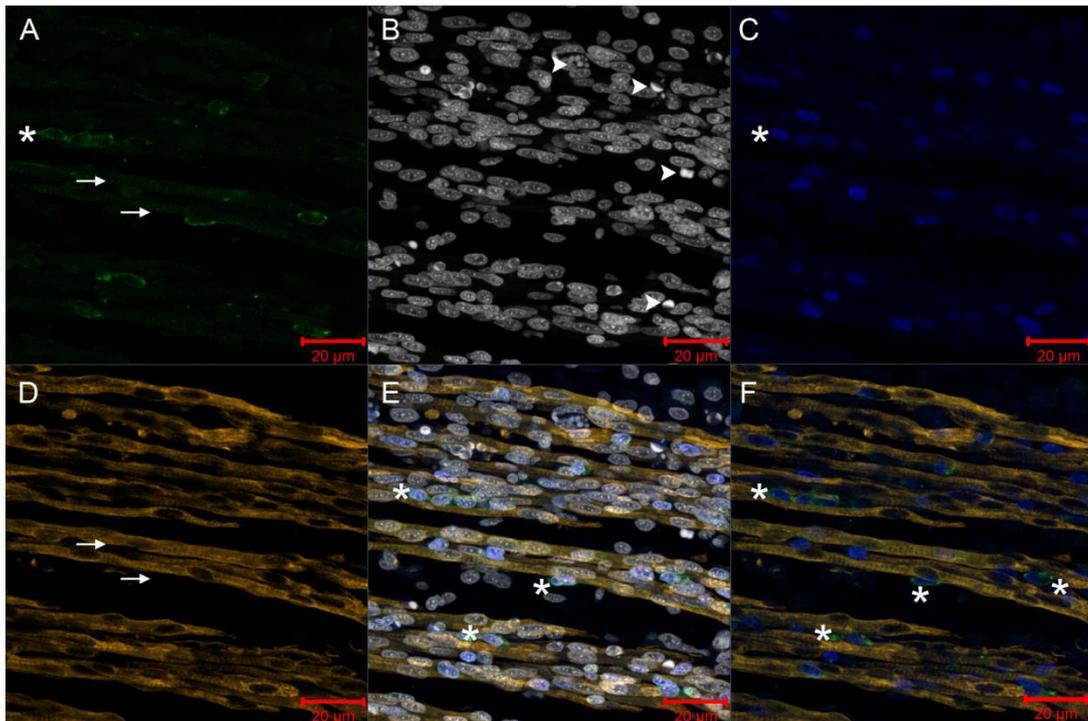


Figura 4.4 – Precusores miogênicos infectados pelo vírus FA17DD foram observados próximos a fibras musculares também infectadas.

Tecido muscular esquelético de embriões de galinha infectados com vírus 17DD aos 9 dd e coletados em 48 hpi. Áreas com → indicam fibras musculares infectadas, áreas com ► indicam núcleos picnóticos, áreas com * indicam precusores miogênicos infectados. Marcação para febre amarela em verde (A), núcleo em branco (B), pax 7 em azul (C), desmina em amarelo (D), sobreposição FA, núcleo, pax 7 e desmina (E) e sobreposição FA, pax 7 e desmina (F). Microscopia confocal a laser.

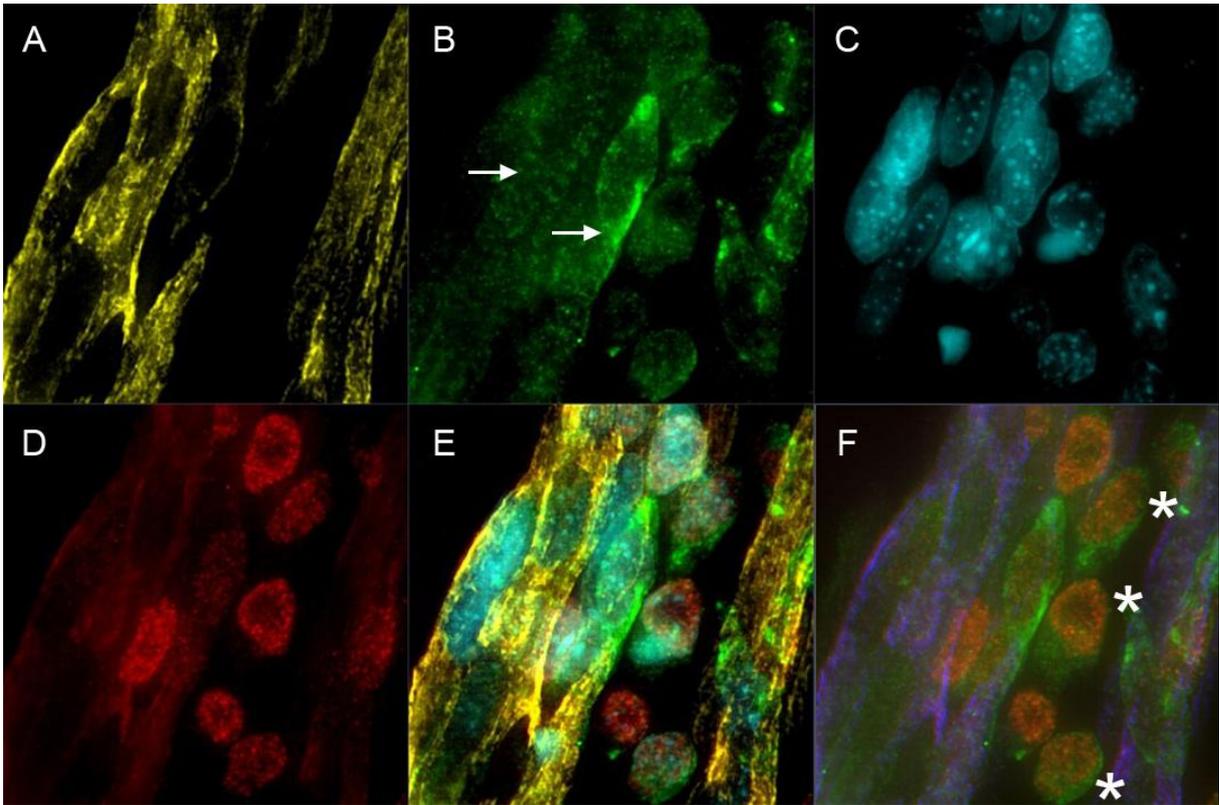


Figura 4.5 – Células uninucleadas infectadas são Pax7⁺.

Tecido muscular esquelético de embriões de galinha infectados com vírus 17DD aos 9 dd e coletados em 48 hpi. Áreas com → indicam fibras musculares infectadas e áreas com * indicam precursores miogênicos infectados. Marcação para desmina em amarelo (A), FA em verde (B), núcleo em azul (C), Pax7 em vermelho (D), sobreposição FA, núcleo, Pax7 e desmina (E) e sobreposição FA, Pax7 e desmina (F). Microscopia de superresolução.

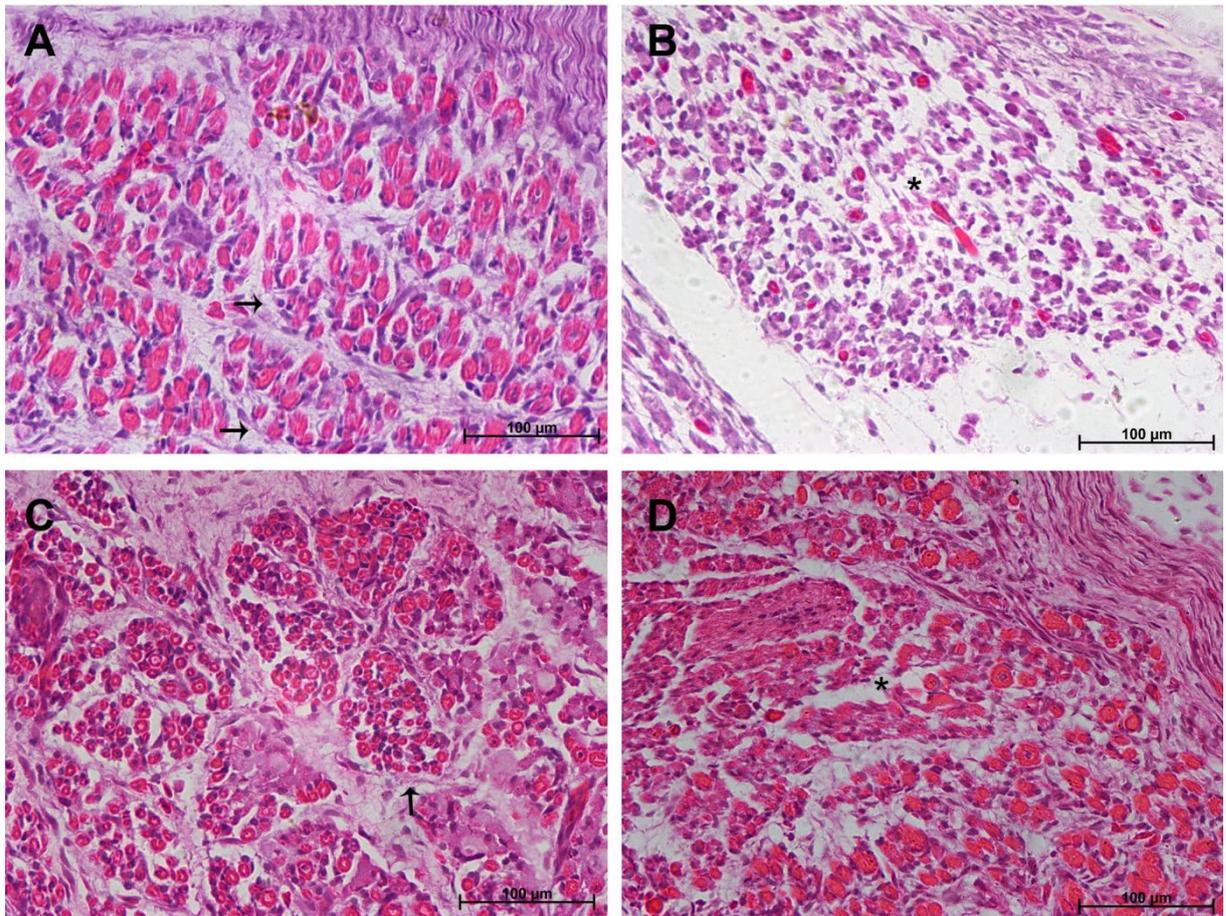


Figura 4.6 – Tecido muscular esquelético infectado (120 e 144 hpi) apresentou desorganização estrutural em relação aos animais controles.

Tecido muscular esquelético de embriões de galinha infectados com vírus 17DD aos 9 dd e coletados em 120 e 144 hpi. A – Animal controle 120 hpi. B - Animal infectado 120 hpi. C – Animal controle 144 hpi. D – Animal infectado 144 hpi. Areas com → indicam feixe muscular organizado e areas com * indicam feixe muscular desorganizado. Coloração de Hematoxilina e Eosina. Microscopia de campo claro.

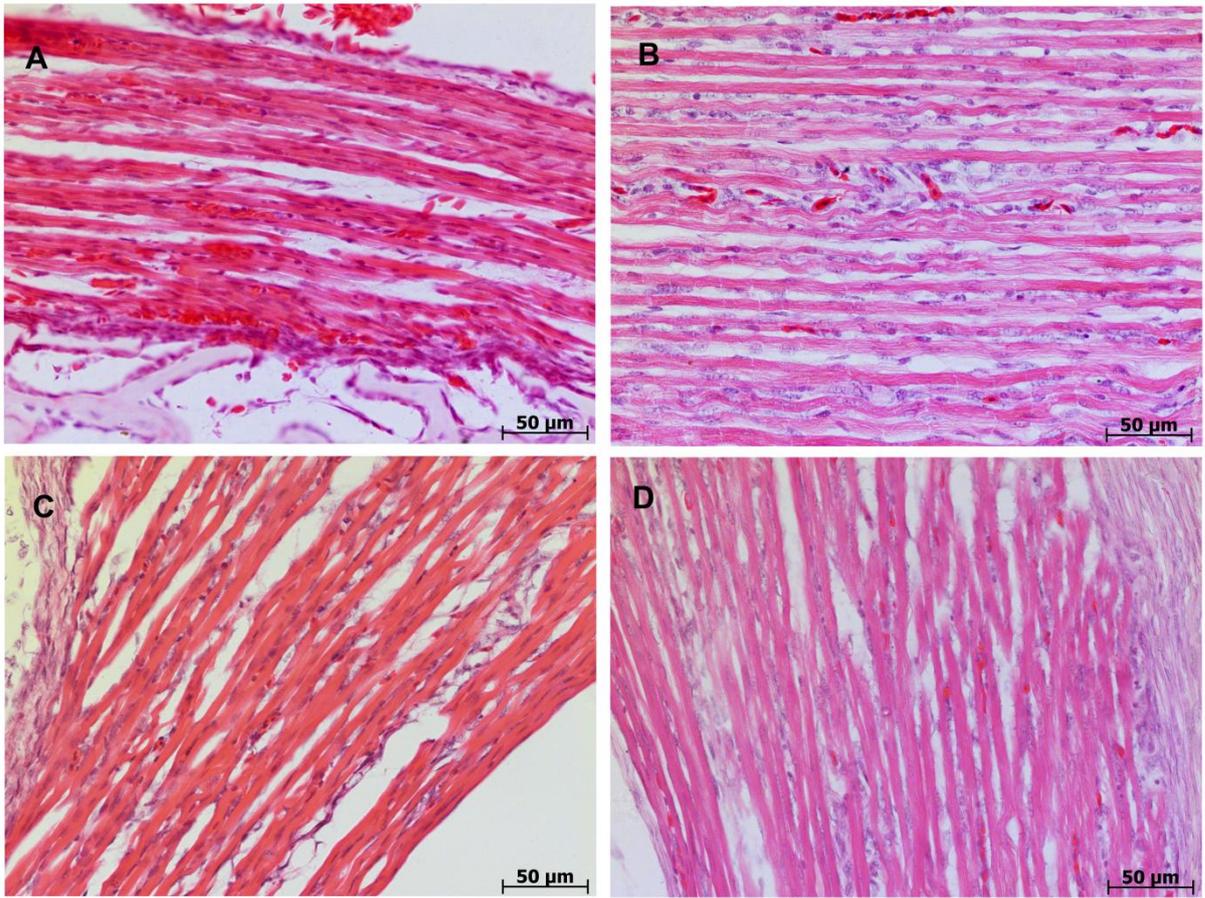


Figura 4.7 – Reorganização estrutural do tecido muscular esquelético de embriões após 144 horas de infecção.

Tecido muscular esquelético de embriões de galinha infectados com vírus 17DD aos 9 dd e coletados em 168 e 216 hpi. A – Animal controle 168 hpi. B - Animal infectado 168 hpi. C – Animal controle 216 hpi. D – Animal infectado 216 hpi. Coloração de Hematoxilina e Eosina. Microscopia de campo claro.

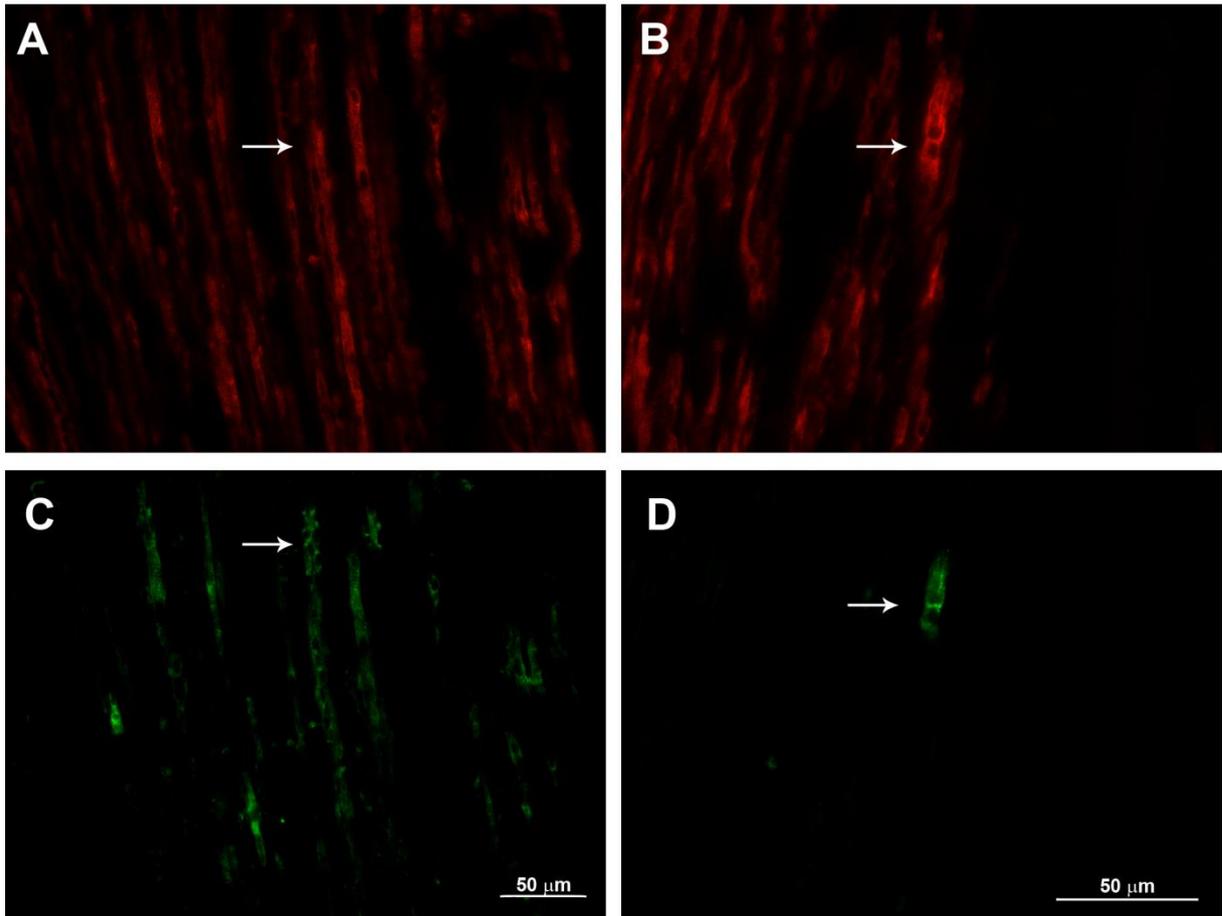


Figura 4.8 – Imunodeteção de proteínas virais fraca e escassa no tecido muscular esquelético de embriões com 120 e 144 horas pós infecção.

Tecido muscular esquelético de embriões de galinha infectados com vírus 17DD aos 9 dd e coletados em 120 e 144 hpi. A e C – Animal infectado 120 hpi, B e D – Animal infectado 144 hpi. Áreas com → indicam fibras musculares esqueléticas infectadas. Marcação para febre amarela (verde) e desmina (vermelho). Microscopia de fluorescência convencional.

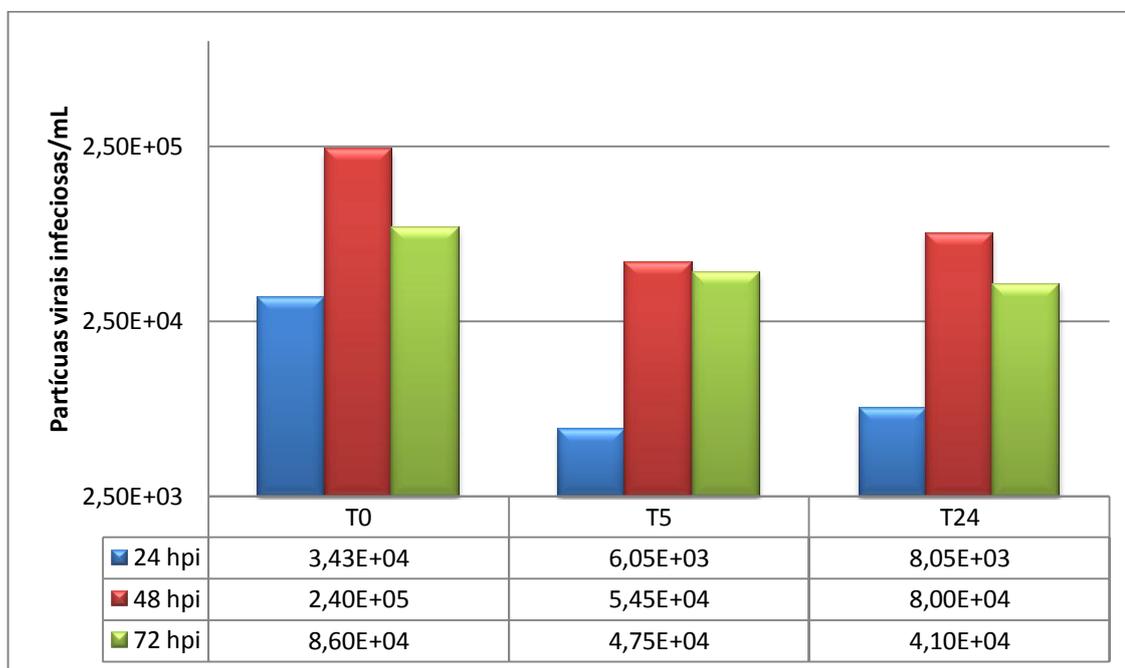
4.2 Avaliação *in vitro* da infecção pelo vírus 17DD em culturas primárias de músculo esquelético de galinha

Visando mimetizar diferentes aspectos encontrados no tecido muscular esquelético de embriões de galinha em desenvolvimento, três momentos de infecção em cultura de células foram utilizados. Em cada um destes momentos, um determinado evento da miogênese ou fase da diferenciação da célula muscular pôde ser preferencialmente observado na cultura de células. Além disso, para verificar a interferência de moléculas inibidoras da infecção, a mesma foi testada com diferentes concentrações do inóculo viral.

4.2.1 Avaliação da infecção pelo vírus da febre amarela 17DD quanto ao momento de infecção em cultura de células musculares esqueléticas

A susceptibilidade – capacidade das células de se infectarem - e a permissividade – capacidade das células de produzirem partículas virais infecciosas - das células à infecção foram testadas em células infectadas no momento do plaqueamento (T0) e após cinco (T5) e vinte e quatro (T24) horas. Todas as condições foram analisadas após 24, 48 e 72 horas de inoculação (hpi) com a MOI de 0,1. Através da análise por PFU observamos um pico de produção viral em 48 hpi em todos os métodos de infecção e uma ligeira queda da produção em 72 hpi. As células que foram infectadas em T0 apresentaram título viral 4,4 vezes maior que o observado nas células infectadas em T5 e 3 vezes maior do que em T24 (Gráfico 4.1).

Gráfico 4.1 Avaliação da cinética da produção de partículas virais infecciosas pela cultura de células musculares esqueléticas de embrião de galinha, em diferentes métodos de infecção utilizando a MOI de 0,1.



4.2.1.1 Análise morfológica das células musculares esqueléticas de galinha expostas ao vírus da febre amarela 17DD no momento do plaqueamento (T0).

No primeiro ponto de análise, 24 horas pós plaqueamento (hpp) e 24 hpi, a cultura controle se mostrou pouco confluenta, com espaços entre as células. Foi possível observar a presença de algumas fibras musculares neoformadas, além de precursores miogênicos e mioblastos próximos a estas fibras, e fibroblastos (Figura 4.9).

Nas culturas infectadas, em 24 hpi, foi possível observar aspecto e confluência semelhante aos controles, com algumas fibras delgadas infectadas. Alguns mioblastos e raros precursores miogênicos também foram observados infectados. Fibroblastos foram negativos para a imunodeteção de proteínas virais (Figura 4.10).

No segundo ponto de análise (48 hpp / 48 hpi), a cultura controle estava parcialmente confluenta, com mais fibras em relação ao ponto anterior. Estas fibras eram mais longas e aparentemente mais maduras do que em 24 hpp. Foram

observados alguns mioblastos, miócitos e diversos fibroblastos nesta cultura. Os fibroblastos estavam aparentemente em maior número que o observado no primeiro ponto de análise (Figura 4.11 A e B).

Nas culturas infectadas, em 48 hpi, foi observada uma cultura tão confluenta quanto o controle, com fibras ligeiramente espessas não infectadas e fibras delgadas infectadas. Também foram observados alguns miócitos infectados, porém a maioria destes não estava infectado. Diversas células com núcleos picnóticos foram observadas, algumas com marcação positiva para proteínas virais. Assim como em 24 horas de infecção, nesse ponto não foram encontrados fibroblastos infectados (Figura 4.11 C e D).

No terceiro ponto de análise (72 hpp/ 72 hpi), foi observada uma cultura rica em fibras musculares bem espessas e multinucleadas. Também foi observado um aparente aumento no número de fibroblastos nesse ponto (Figura 4.12 A e B).

Nas culturas infectadas, em 72 hpi, observamos uma sensível diminuição do número de células infectadas em relação ao ponto anterior. Estas fibras eram por vezes delgadas marcadas para proteínas de FA 17DD e outras mais grossas, multinucleadas, também infectadas. Alguns miócitos não infectados foram observados se fusionando a fibras infectadas e miócitos infectados se fusionando a fibras não infectadas. Assim como observado nos outros pontos de análise, nesse ponto não foram encontrados fibroblasto positivos para proteínas virais (Figura 4.12 C e D).

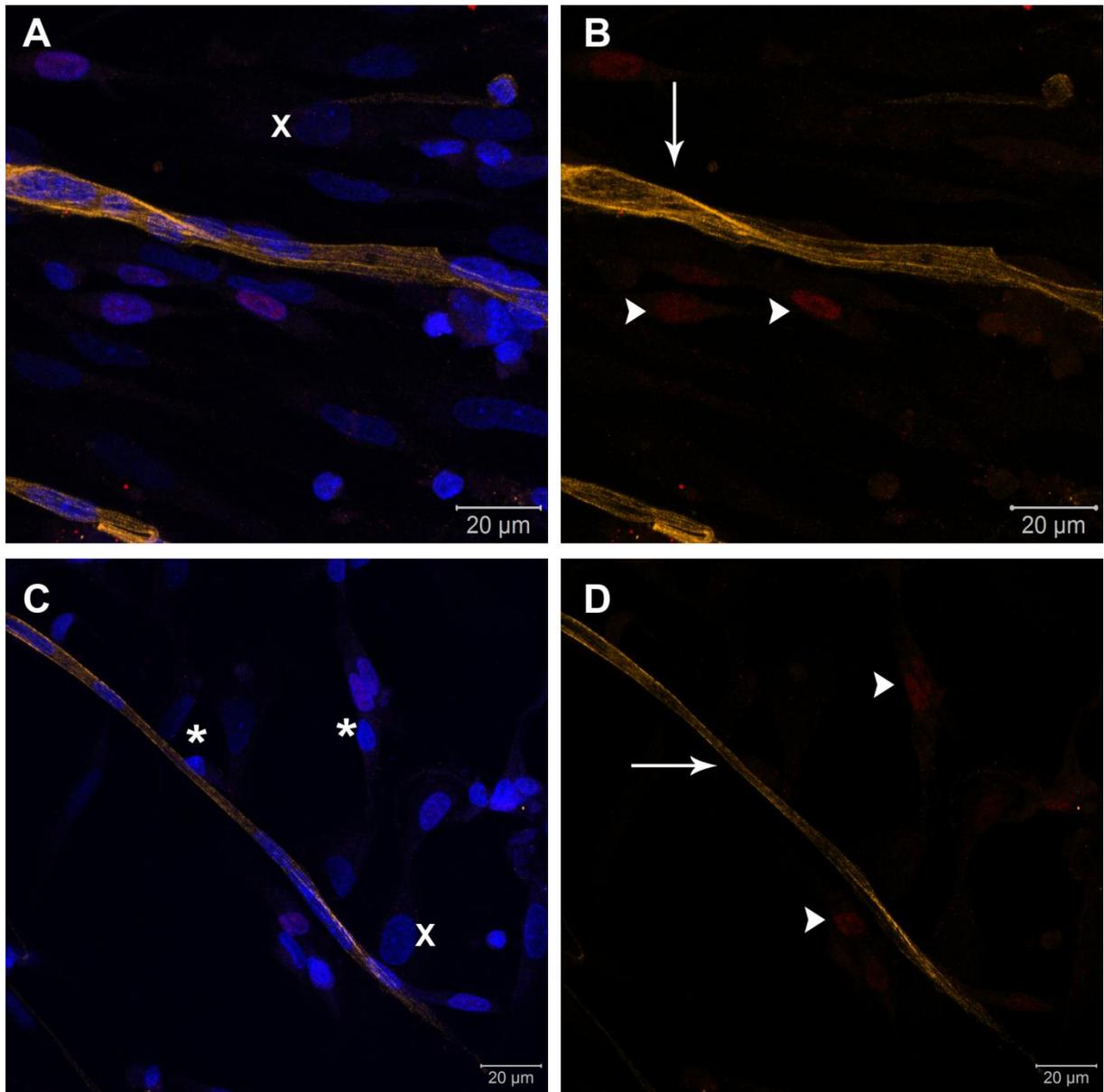


Figura 4.9 – Cultura pouco confluenta com presença de precursores miogênicos, mioblastos e fibras neoformadas.

Células musculares esqueléticas cultivadas e infectadas *in vitro* pelo vírus da febre amarela 17DD. Controle T = 0 24 hpp [T0]/ 24 hpi. Áreas com → fibras musculares esqueléticas neoformadas, áreas com * indicam mioblastos, áreas com ▶ indicam precursores miogênicos e áreas com x indicam fibroblastos. Marcação para miosina (amarelo), núcleo (azul) e Pax7 (vermelho). Microscopia confocal a laser.

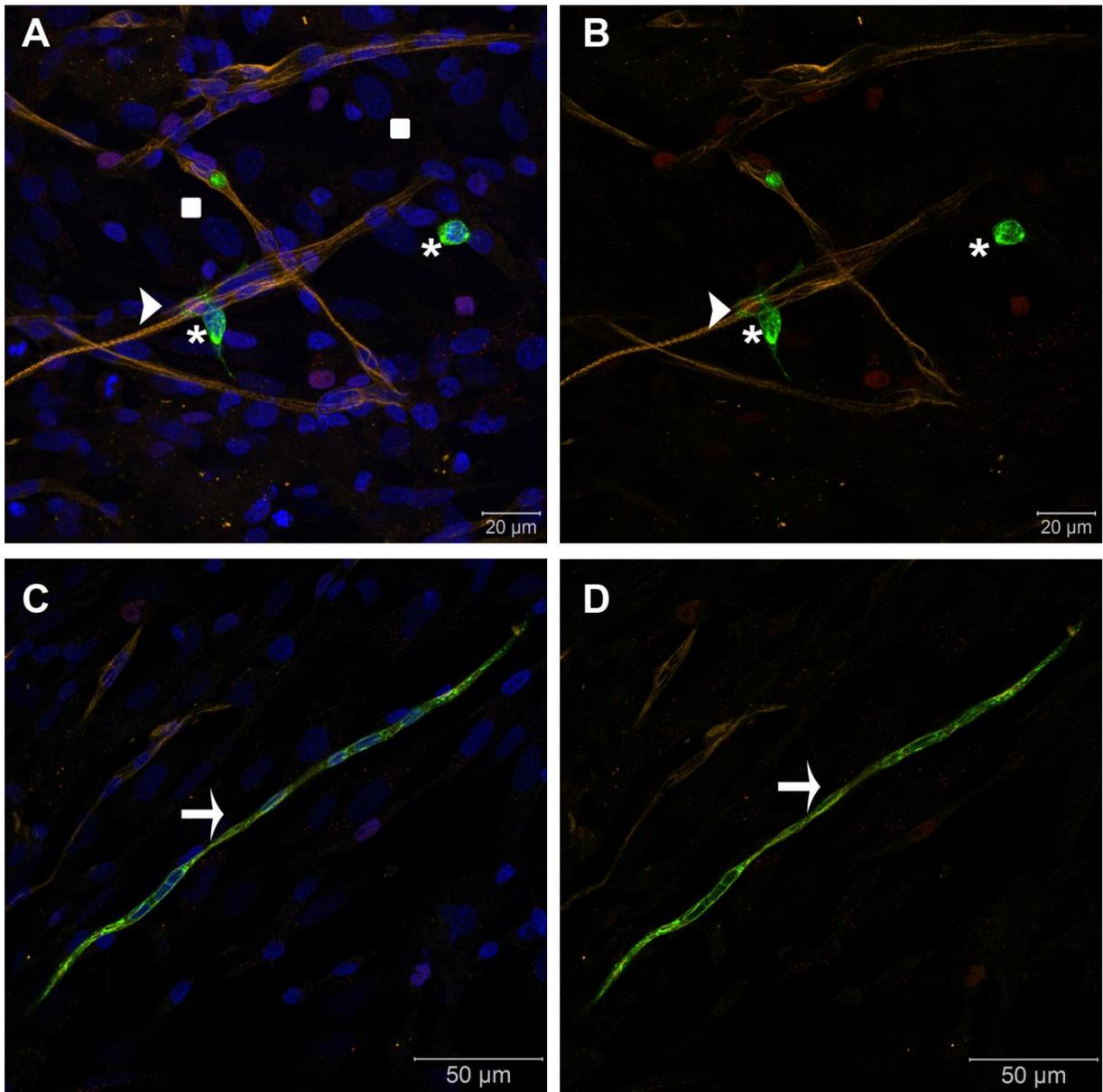


Figura 4.10 – Precursores miogênicos, mioblastos e fibras neoformadas foram observadas infectadas pelo vírus 17DD.

Células musculares esqueléticas de embriões de galinha cultivadas e infectadas *in vitro* pelo vírus da febre amarela 17DD. Infectadas na MOI 0,1 24 hpp [T0] / 24hpi. Áreas com → indicam fibras esqueléticas neoformadas infectadas, áreas com * indicam mioblastos infectados, áreas com ▶ indicam precursores miogênicos infectados, áreas com ■ indicam fibroblastos infectados. Marcação para miosina (amarelo), núcleo (azul), Pax7 (vermelho) e FA (verde). Microscopia confocal a laser.

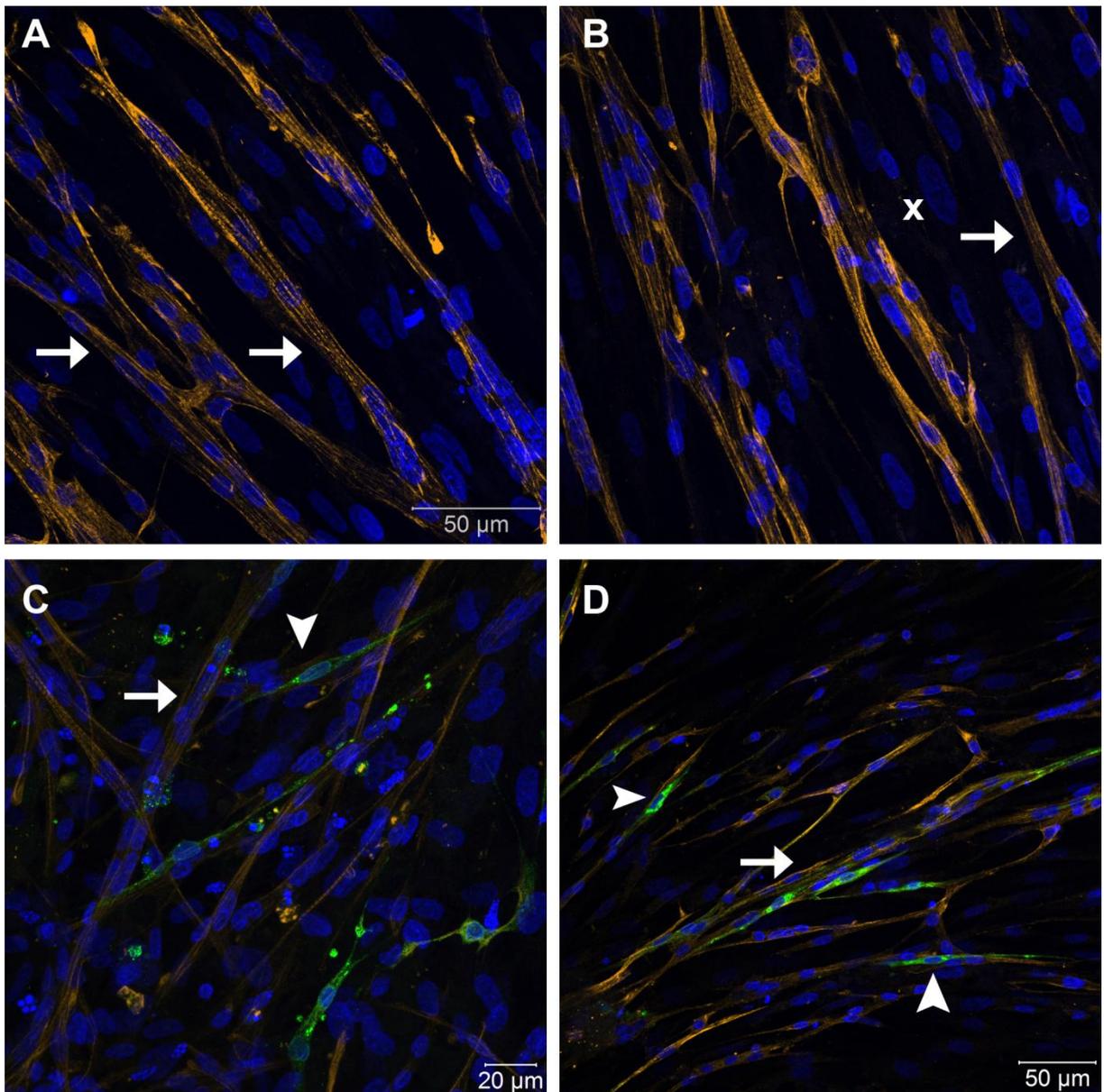


Figura 4.11 – Miócitos foram observados infectados acompanhados por fibras delgadas também infectadas e núcleos picnóticos.

Células musculares esqueléticas de embriões de galinha cultivadas e infectadas *in vitro* pelo vírus da febre amarela 17DD. Controle (A e B) e infectadas MOI 0,1 (C e D) 48hpp [T0] / 48hpi. Áreas com → indicam fibras musculares, áreas com ► indicam miócitos e áreas com x indicam fibroblastos. Marcação para miosina (amarelo), núcleo (azul) e FA (verde). Microscopia confocal a laser.

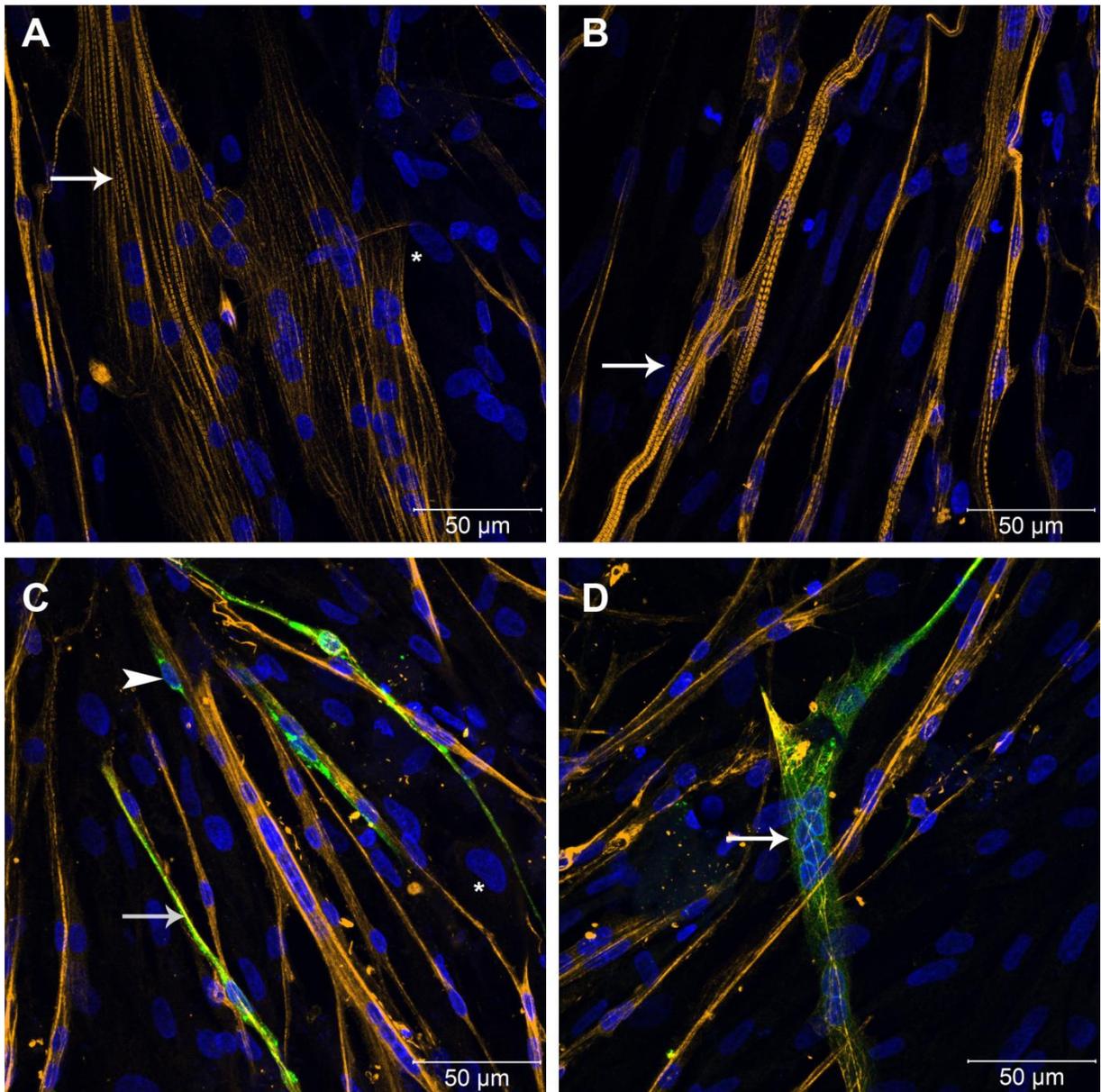


Figura 4.12 – Fibras musculares infectadas eram, em sua maioria, delgadas em relação as não infectadas e ao controle.

Células musculares esqueléticas de embriões de galinha cultivadas e infectadas *in vitro* pelo vírus da febre amarela 17DD. Controle (A e B) e infectadas MOI 0,1 (C e D) 72hpp [T0]/ 72hpi. Áreas com → indicam fibras musculares esqueléticas miosina positivas, áreas com * indicam fibroblastos e áreas com ► indicam miócitos. Marcação para miosina (amarelo), núcleo (azul) e FA (verde). Microscopia confocal a laser.

4.2.1.2 Análise morfológica das células musculares esqueléticas de embriões de galinha expostas ao vírus da febre amarela 17DD após 5 horas de plaqueamento (T5).

No primeiro ponto de análise (29 hpp / 24 hpi), a cultura controle se mostrou confluenta. Em algumas regiões foi observado um número grande de precursores miogênicos e mioblastos. Raros miócitos também foram observados, além de muitas fibras já formadas, em sua maioria com numerosos núcleos. Também foram observados diversos fibroblastos nessas culturas (Figura 4.13 A e B).

Nas culturas infectadas, em 24 hpi, foram observados mioblastos com marcação positiva para proteínas virais, os quais, em alguns momentos, pareciam aderir a fibras musculares não infectadas. Foram observadas também algumas fibras musculares delgadas infectadas. Algumas células com núcleo picnótico, sugerindo morte celular, também foram observadas. Neste ponto de análise também não foram encontrados fibroblastos positivos para proteínas virais (Figura 4.13 C e D).

No segundo ponto de análise (53 hpp / 48 hpi), a cultura controle se mostrou bastante confluenta, com número grande de fibras espessas e multinucleadas. Foram observados alguns miócitos, às vezes aderindo a fibras. Apesar da densidade das culturas controles e infectadas ser bastante semelhante nessa condição, foi sugestivo que a cultura controle era mais densa em relação ao número de células do que a cultura que foi infectada. Aqui também foram encontrados fibroblastos (Figura 4.14 A e B).

Analisando a cultura infectada, em 48 hpi, foi observado um número grande de fibras longas e multinucleadas. Destas, poucas foram positivas para a marcação de proteínas virais. Tanto as culturas controles quanto as infectadas apresentaram células com núcleo picnótico, sugerindo que estas células estariam em apoptose. Nas culturas infectadas, estas células parecem estar em maior número, inclusive com campos específicos mostrando muitas células que estão aparentemente morrendo. Porém debris celulares foram observados em maior intensidade nas culturas infectadas, inclusive com marcação para proteínas virais. Também foram observados alguns miócitos fracamente positivos para proteínas virais. Assim como observado no ponto anterior, não foram encontrados fibroblastos positivos para proteínas virais (Figura 4.14 C e D).

No terceiro ponto de análise (77 hpp / 72 hpi), a cultura controle se mostrou bastante confluyente, com um aumento perceptível no número de fibroblastos. Foram observadas também fibras musculares longas e espessas. Uma aparente diminuição no número de fibras em comparação com o ponto anterior também pôde ser observada, mas estas fibras aparentavam ser mais grossas, sugerindo um maior grau de amadurecimento (Figura 4.15 A e B).

Nas culturas infectadas, em 72 hpi, ao contrário do controle, foi observado um número menor de fibras na cultura. Quando infectadas, estas eram delgadas e com poucos núcleos. Assim como nos outros pontos de análise, neste não foram encontrados fibroblastos com marcação positiva para proteínas virais, apesar do perceptível domínio deste tipo celular na cultura (Figura 4.15 C e D).

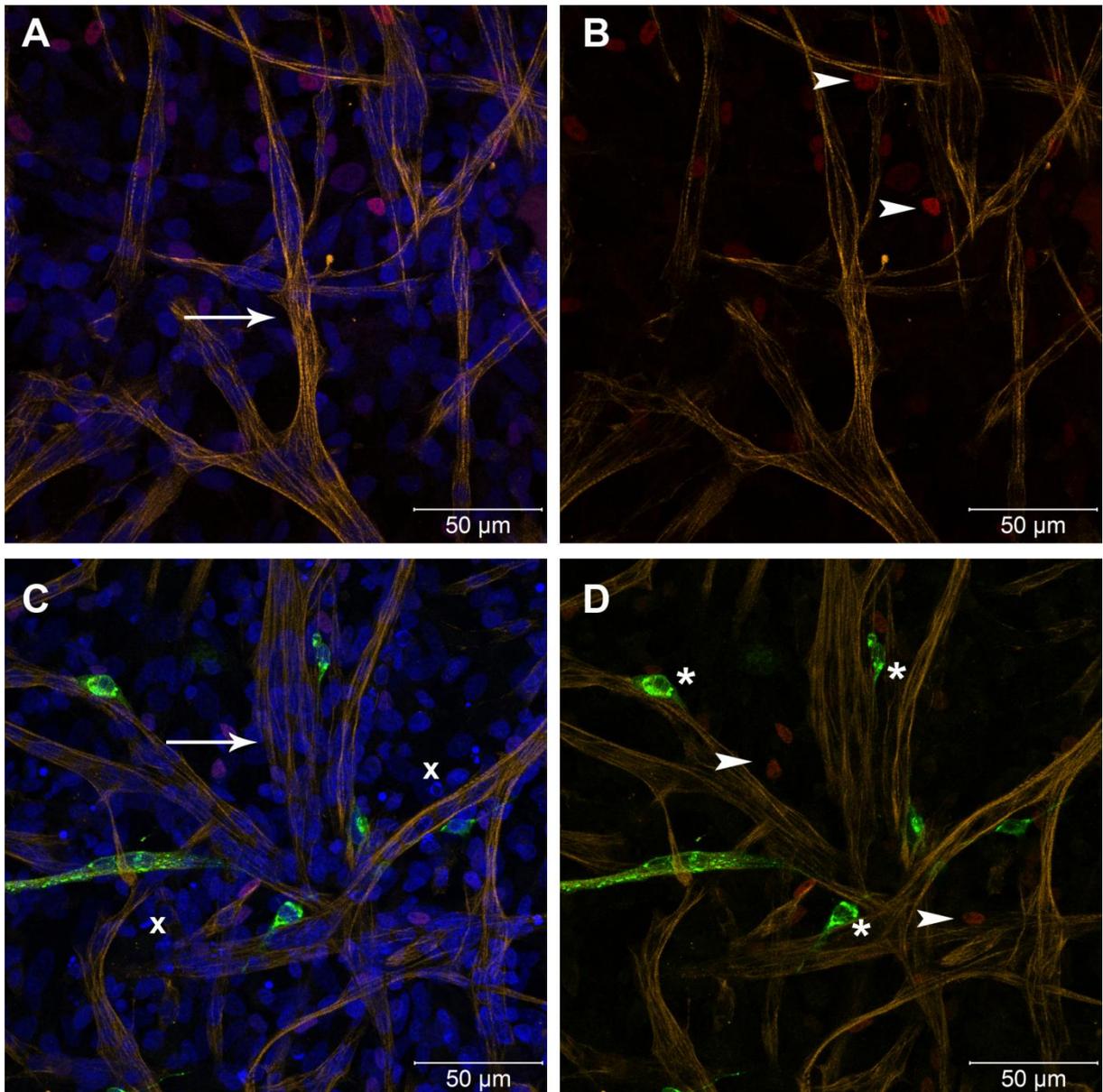


Figura 4.13 – Em momentos iniciais da infecção, preferencialmente mioblastos foram observados infectados.

Células musculares esqueléticas de embriões de galinha cultivadas e infectadas *in vitro* pelo vírus da febre amarela 17DD. Controle (A e B) e infectadas MOI 0,1 (C e D) 29 hpp [T5]/ 24 hpi. Áreas com → fibras musculares esqueléticas, áreas com * indicam mioblastos infectados, áreas com ► indicam precursores miogênicos e áreas com x indicam núcleos picnóticos. Marcação para miosina (amarelo), núcleo (azul), Pax7 (vermelho) e FA (verde). Microscopia confocal a laser.

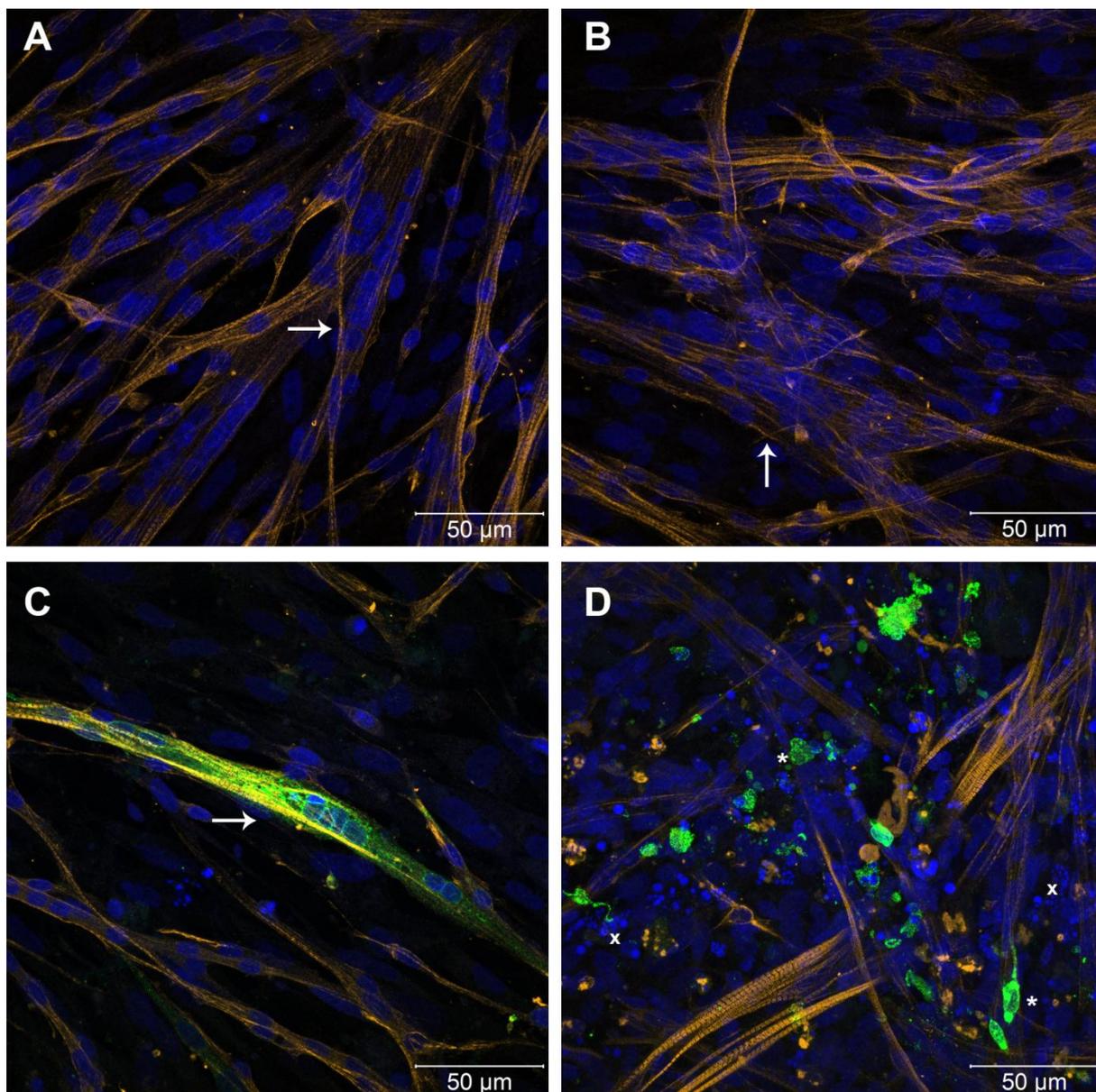


Figura 4.14 – Raras fibras musculares foram observadas infectadas e um aparente efeito citopático está associado a infecção.

Células musculares esqueléticas de embriões de galinha cultivadas e infectadas *in vitro* pelo vírus da febre amarela 17DD. Controle (A e B) e infectadas MOI 0,1 (C e D) 33 hpp [T5]/ 48 hpi. Áreas com → indicam fibras musculares esqueléticas, áreas com * indicam debris celulares com marcação positiva para proteínas virais e áreas com x indicam núcleos picnóticos ou fragmentados. Marcação para miosina (amarelo), núcleo (azul) e FA (verde). Microscopia confocal a laser.

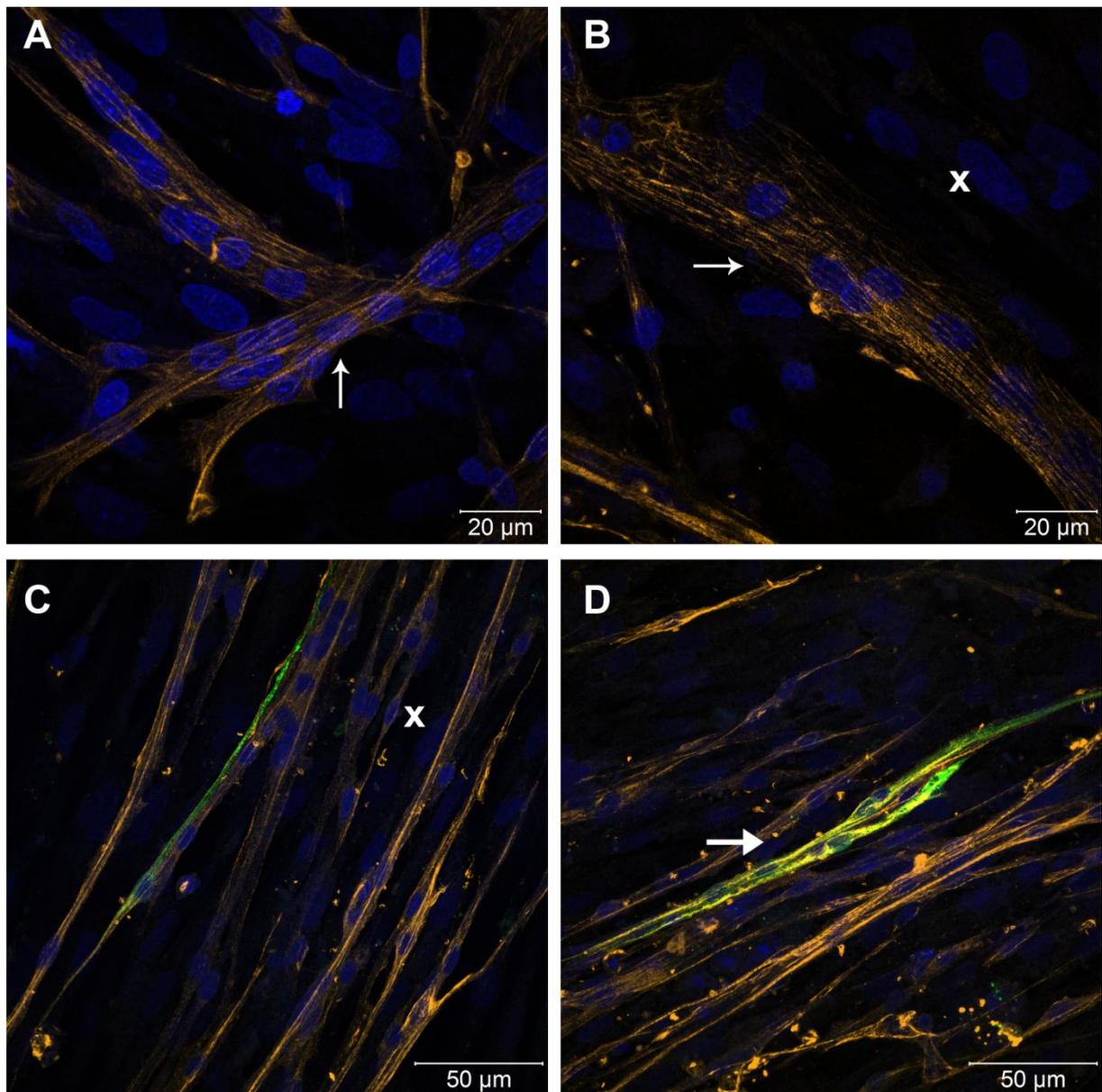


Figura 4.15 – Culturas infectadas possuíam fibras menos robustas em relação as fibras observadas no controle.

Células musculares esqueléticas de embriões de galinha cultivadas e infectadas *in vitro* pelo vírus da febre amarela 17DD. Controle (A e B) e infectadas MOI 0,1 (C e D) 77 hpp [T5]/ 72 hpi. Áreas com → indicam fibras musculares esqueléticas e áreas com x indicam fibroblastos. Marcação para miosina (amarelo), núcleo (azul) e FA (verde). Microscopia confocal a laser.

4.2.1.3 Análise morfológica das células musculares esqueléticas de galinha expostas ao vírus da febre amarela 17DD 24 horas após o plaqueamento (T24)

No primeiro ponto de análise (48 hpp / 24 hpi), a cultura se mostrou bastante confluenta, com fibras muito espessas e longas. Em contraste ao primeiro ponto de análise dos métodos de infecção anteriormente apresentados, nesta condição foram encontrados pouquíssimos precursores miogênicos. Também foram observados mioblastos em número menor nesta cultura. Além disso, assim como nos outros pontos, foram observados fibroblastos nas culturas (Figura 4.16 A e B).

Nas culturas infectadas, em 24 hpi, foram observadas fibras longas e multinucleadas, algumas delas positivas para a marcação de proteínas virais. Poucos mioblastos ou miócitos foram positivos para a marcação de proteínas virais. Neste ponto de análise, não foram encontrados fibroblastos positivos para marcação de proteínas virais (Figura 4.16 C e D).

No segundo ponto de análise (72 hpp / 48 hpi), assim como no ponto anterior, a cultura estava bastante confluenta, com diversas fibras musculares. Estas fibras eram espessas, alongadas e com numerosos núcleos. Também foram observados fibroblastos (Figura 4.17 A e B).

Nas culturas infectadas, em 48 hpi, foi observada uma menor quantidade de fibras musculares, as quais eram mais delgadas do que as observadas no controle. Algumas foram positivas para imunodeteção de proteínas virais, em proporção semelhante à observada em 24 hpi. Miócitos com marcação positiva para proteínas virais também foram observadas. Estas células estavam próximas a fibras musculares e, algumas vezes, aderindo a estas fibras. Foram observadas células com núcleo fragmentado; mas esse fenômeno foi observado na cultura em menor quantidade em comparação ao que foi observado nos outros momentos de infecção. Neste ponto, também não foram observados fibroblastos infectados (Figura 4.17 C e D).

No terceiro ponto de análise (96 hpp / 72 hpi), assim como nos pontos anteriores, a cultura apresentava alta densidade celular e muitas fibras musculares, as quais eram longas, espessas e multinucleadas, sugerindo um alto grau de diferenciação. Também foram observados fibroblastos, os quais pareciam estar em maior número em comparação com os pontos de análise anteriores (Figura 4.18 A e B).

Nas culturas infectadas, em 72hpi, foi observada muita confluência, com muitas fibras musculares negativas para proteínas virais. Entretanto, foram observadas algumas fibras infectadas, espessas e delgadas. A incidência da infecção frente à densidade da cultura parece ser baixa em todos os métodos de infecção e pontos de análise. Muitos fibroblastos também foram observados; entretanto permaneceram não infectados (Figura 4.18 C e D).

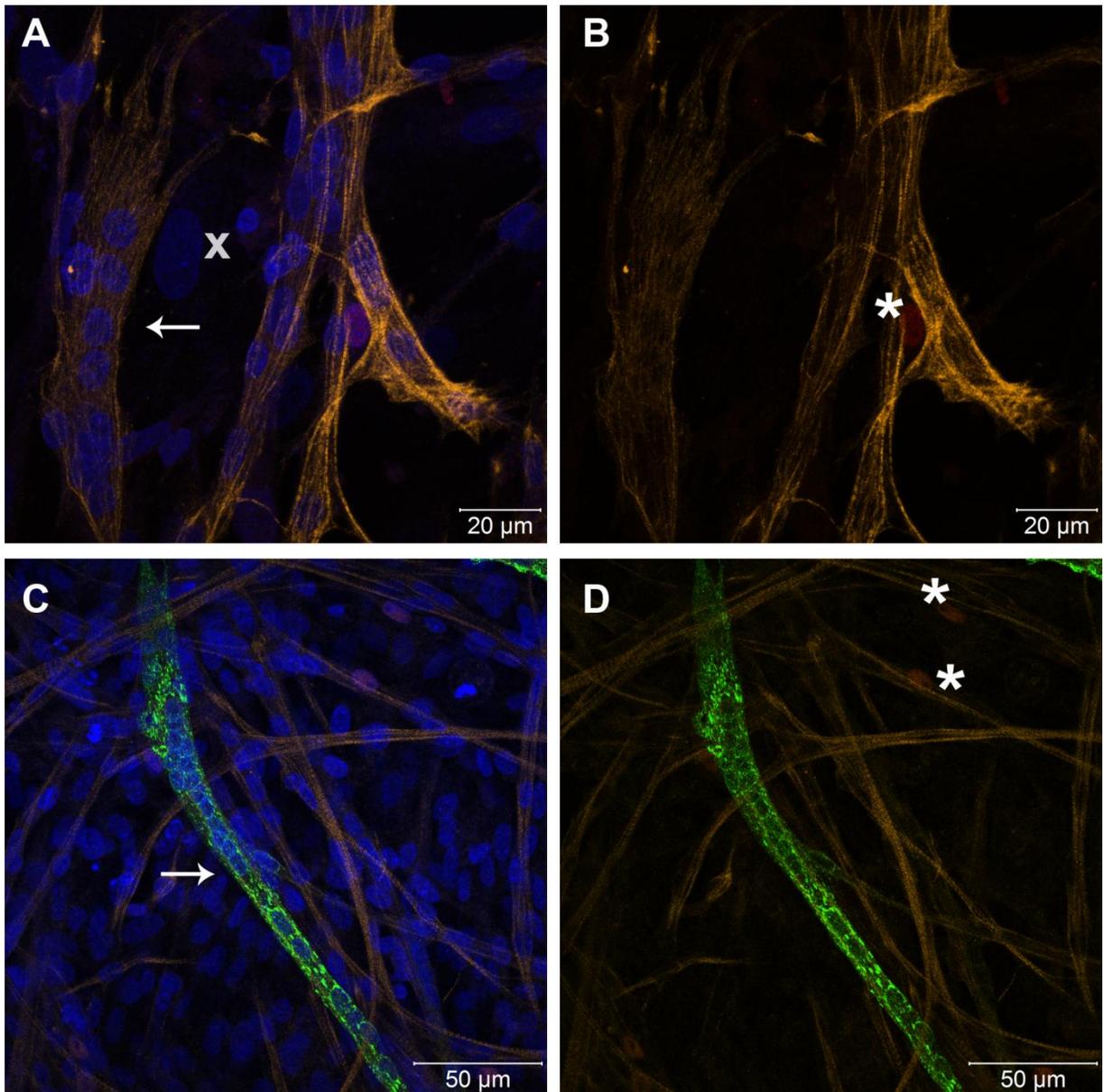


Figura 4.16 – Fibras musculares esqueléticas foram observadas infectadas em 24 hpi quando infectadas em T24.

Células musculares esqueléticas de embriões de galinha cultivadas e infectadas *in vitro* pelo vírus da febre amarela 17DD. Controle (A e B) e infectadas MOI 0,1 (C e D) 48 hpp [T24]/ 24 hpi. Áreas com → indicam fibras musculares esqueléticas, áreas com * indicam precursores miogênicos e áreas com x indicam fibroblastos. Marcação para miosina (amarelo), núcleo (azul), Pax7 (vermelho) e FA (verde). Microscopia confocal a laser.

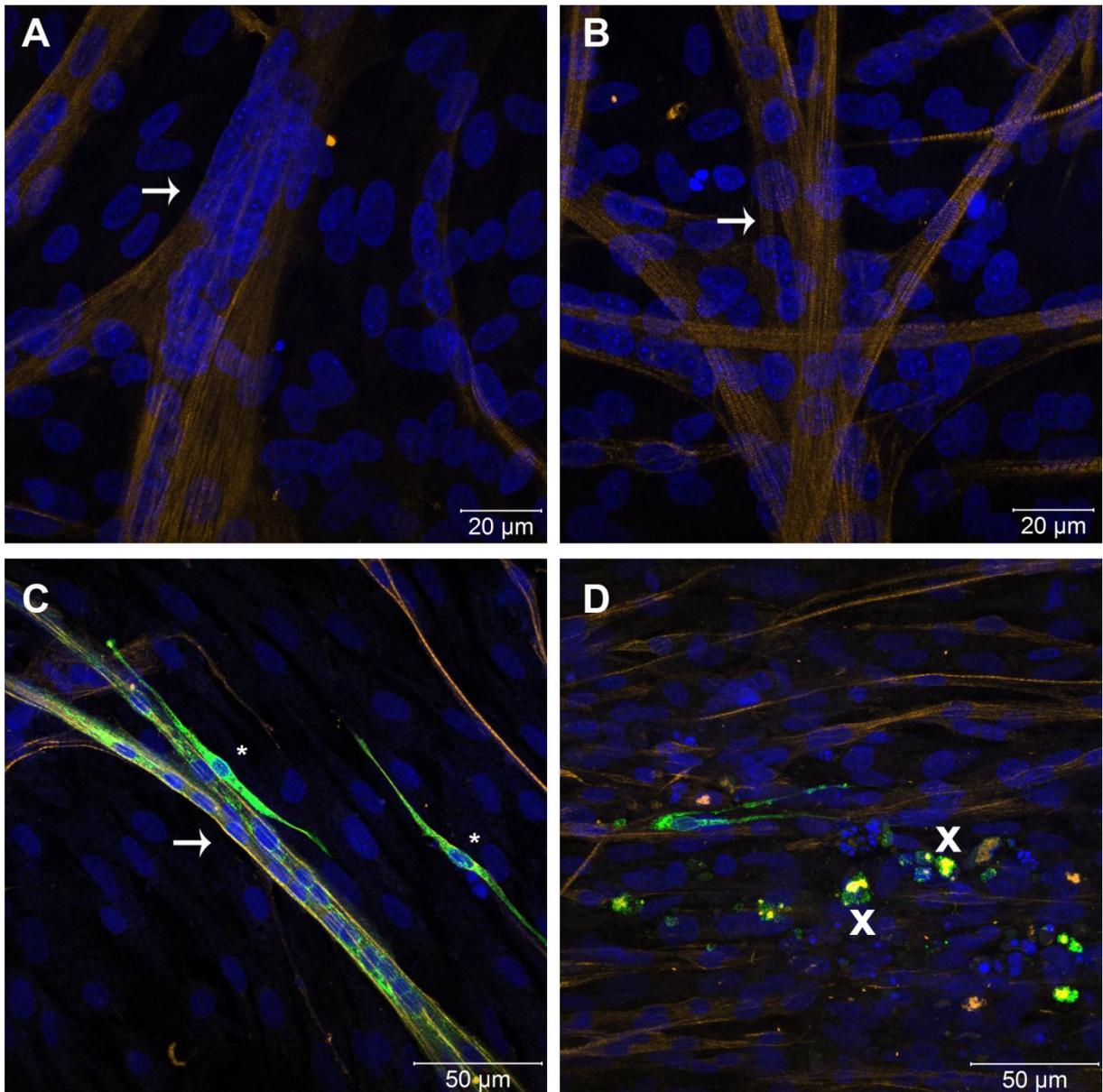


Figura 4.17 – Fibras musculares e miócitos foram susceptíveis a infecção com efeito citopático associado em 48 hpi.

Células musculares esqueléticas de embriões de galinha cultivadas e infectadas *in vitro* pelo vírus da febre amarela 17DD. Controle (A e B) e infectadas MOI 0,1 (C e D) 72 hpp [T24]/ 48 hpi. Áreas com → indicam fibras musculares esqueléticas, áreas com * indicam miócitos e áreas com x indicam células com núcleo cariorex com marcação para proteínas virais (x). Marcação para miosina (amarelo), núcleo (azul) e FA (verde). Microscopia confocal a laser.

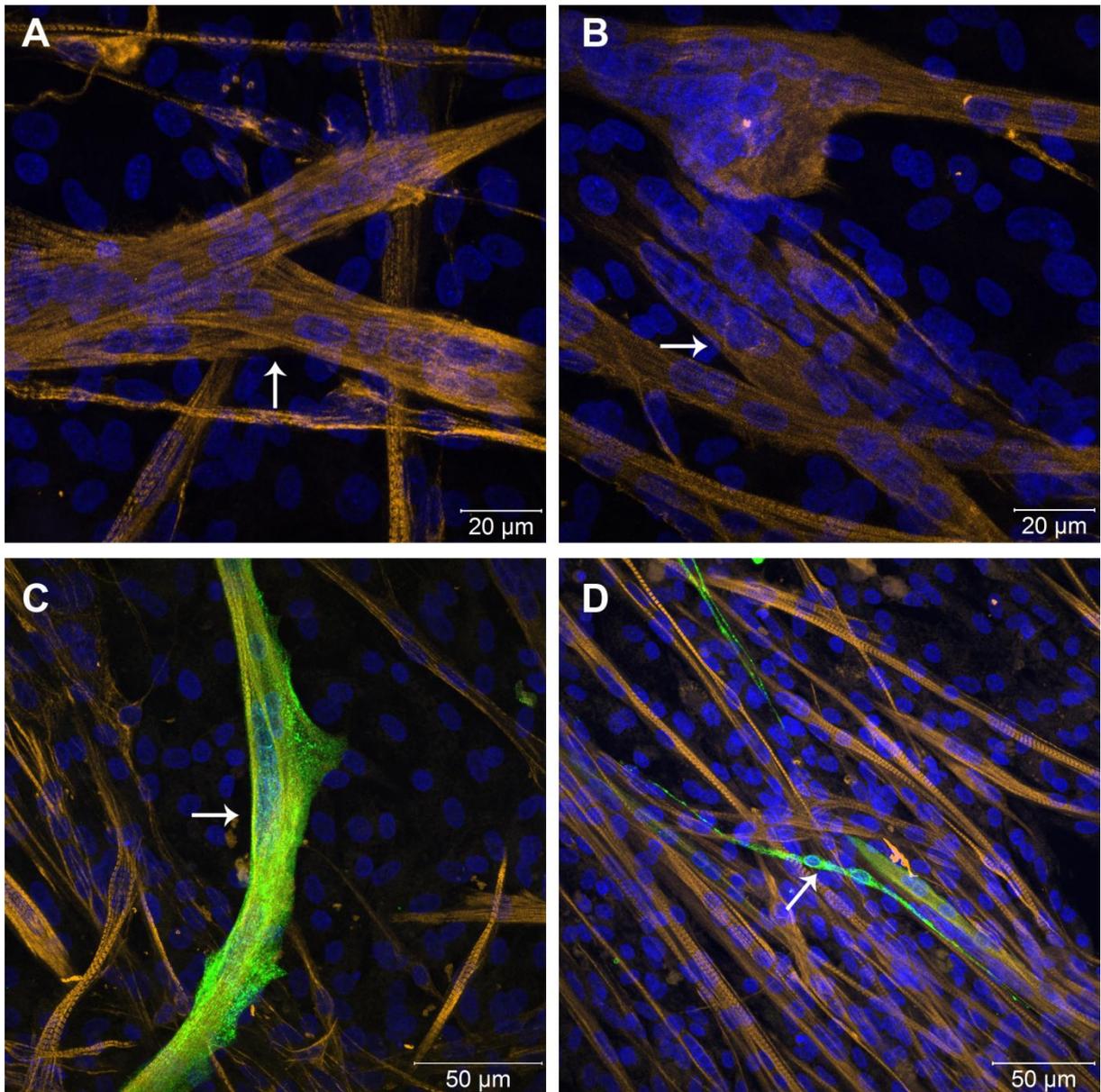


Figura 4.18 – Fibras espessas e delgadas foram observadas infectadas em pequeno número frente a confluência da cultura.

Células musculares esqueléticas de embriões de galinha cultivadas e infectadas *in vitro* pelo vírus da febre amarela 17DD. Controle (A e B) e infectadas MOI 0,1 (C e D) 96 hpp [T24]/ 72 hpi. Áreas com → indicam fibras musculares esqueléticas multinucleadas. Marcação para miosina (amarelo), núcleo (azul) e FA (verde). Microscopia confocal a laser.

Em todos os momentos de infecção foi observada a marcação de partículas virais em adensamentos perinucleares e em regiões que são compatíveis com a localização do retículo sarcoplasmático destas células. Por vezes, também foi observado um padrão de marcação vesicular que sugere a exocitose destas partículas. Os resultados *in vitro*, até aqui apresentados, obtidos com a infecção da cultura primária de células musculares esqueléticas de embrião de galinha em três momentos de infecção (T0, T5 e T24) utilizando o inóculo na MOI de 0,1, estão resumidos na tabela abaixo:

Tabela 4.2 – Resumo dos resultados da infecção da cultura primária de células musculares esqueléticas de embrião de galinha em três momentos de infecção (T0, T5 e T24) utilizando o inóculo na MOI de 0,1

Infecção feita a MOI de 0,1				
		24 hpi	48 hpi	72 hpi
Controle	Confluência	Baixa	Média	Alta
	Fibras musculares	Neoformadas*	Espessas e delgadas	Espessas
	Progenitores/mioblastos/miócitos:	Presentes/prestes/poucos	---/poucos/alguns	---/poucos/raros
	Fibroblastos	Presentes	Presentes em maior quantidade	Presentes em maior quantidade
T0	Confluência	Baixa	Média	Baixa
	Células infectadas	Fibras/precursoras e mioblastos	Fibras/miócitos	Fibras
	Efeito citopático	Pouco	Pouco	Pouco
	Índice de infecção	Baixo	Baixo	Baixo
	PFU/mL	3,4x10 ⁴	2,4x10 ⁵	8,6x10 ⁴
T5	Confluência	Baixa	Média	Baixa
	Células infectadas	Fibras/progenitores e mioblastos	Fibras/miócitos	Fibras
	Efeito citopático	Pouco	Alto	Pouco
	Índice de infecção	Baixo	Baixo	Baixo
	PFU/mL	6x10 ³	5,4x10 ⁴	4,7x10 ⁴
T24	Confluência	Alta	Média	Alta
	Células infectadas	Fibras/precursoras/mioblastos/miócitos	Fibras/miócitos	Fibras
	Efeito citopático	Pouco	Pouco	Pouco
	Índice de infecção	Baixo	Baixo	Baixo
	PFU/mL	8x10 ³	8x10 ⁴	4,1x10 ⁴

* Fibras musculares neoformadas são aquelas que se originaram na cultura de células.

4.2.2 *Análise morfológica da susceptibilidade à infecção de fibras musculares esqueléticas de galinha expostas ao vírus da febre amarela 17DD 120 horas após o plaqueamento (T120)*

Com o intuito de analisar a susceptibilidade à infecção de miofibras pelo vírus da febre amarela 17DD, uma cultura com 120 horas de plaqueamento foi inoculada com partículas virais. Esta cultura se apresentava bastante diferenciada e confluenta, com fibras espessas, longas, multinucleadas, distribuídas por toda lamínula. Por vezes estas fibras se entrelaçavam e aparentavam se fundir. Abaixo destas fibras foi observado um tapete de fibroblastos. A cultura nesse ponto estava tão confluenta que os núcleos destas células estavam menores do que o observado nos outros momentos de infecção (Figura 4.19 A e B).

As células das culturas infectadas foram analisadas após 48 horas (168 hpp/ 48 hpi) de exposição aos vírus, quando foram observadas fibras extremamente espessas, com numerosos núcleos, infectadas (Figura 4.19 C e D). Devido ao grau de diferenciação da fibra, foi possível observar que a marcação das proteínas virais intercalava com a localização da miosina (Figura 4.20), sugerindo que estas partículas virais estariam no retículo sarcoplasmático destas fibras musculares, além da marcação perinuclear, que foi bem visível.

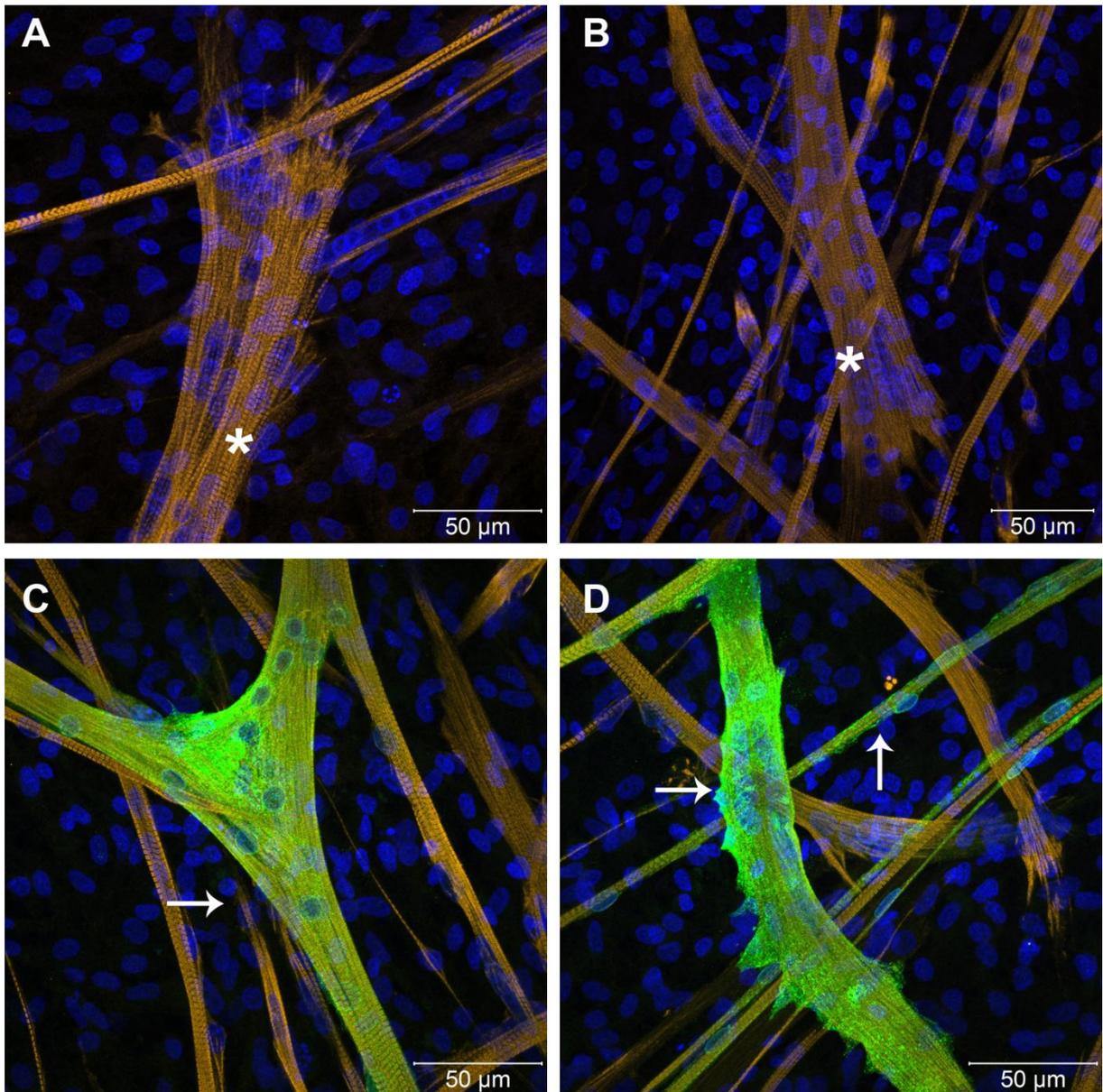


Figura 4.19 – Miofibras foram susceptíveis a infecção pelo vírus 17DD.

Células musculares esqueléticas de embriões de galinha cultivadas e infectadas *in vitro* pelo vírus da febre amarela 17DD. Controle (A e B) e infectadas MOI 0,1 (C e D) 168 hpp [T120]/ 48 hpi. Áreas com * indicam fibras musculares esqueléticas não infectadas e áreas com → indicam fibras musculares esqueléticas infectadas. Marcação para miosina (amarelo), núcleo (azul) e FA (verde). Microscopia confocal a laser.

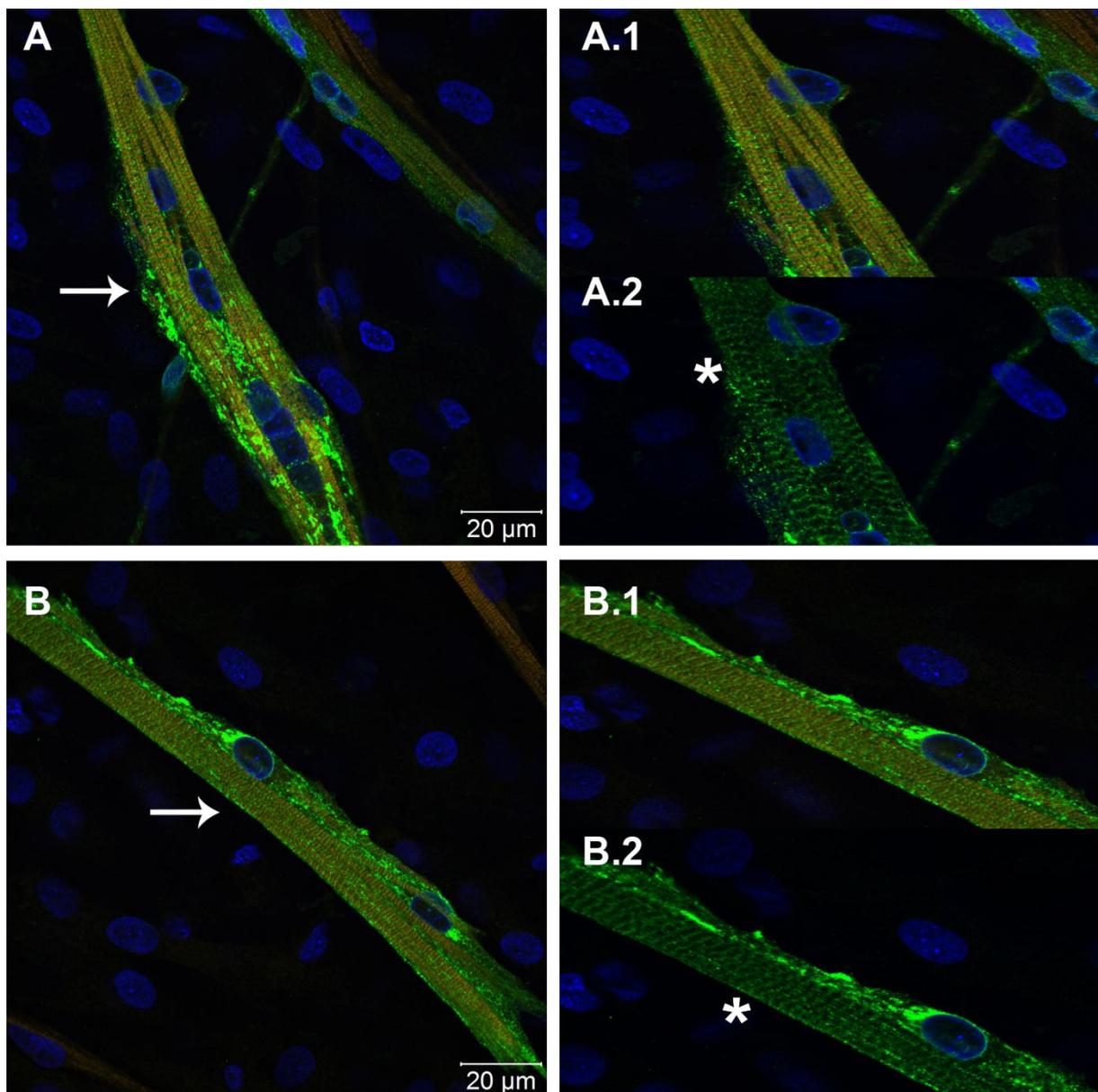


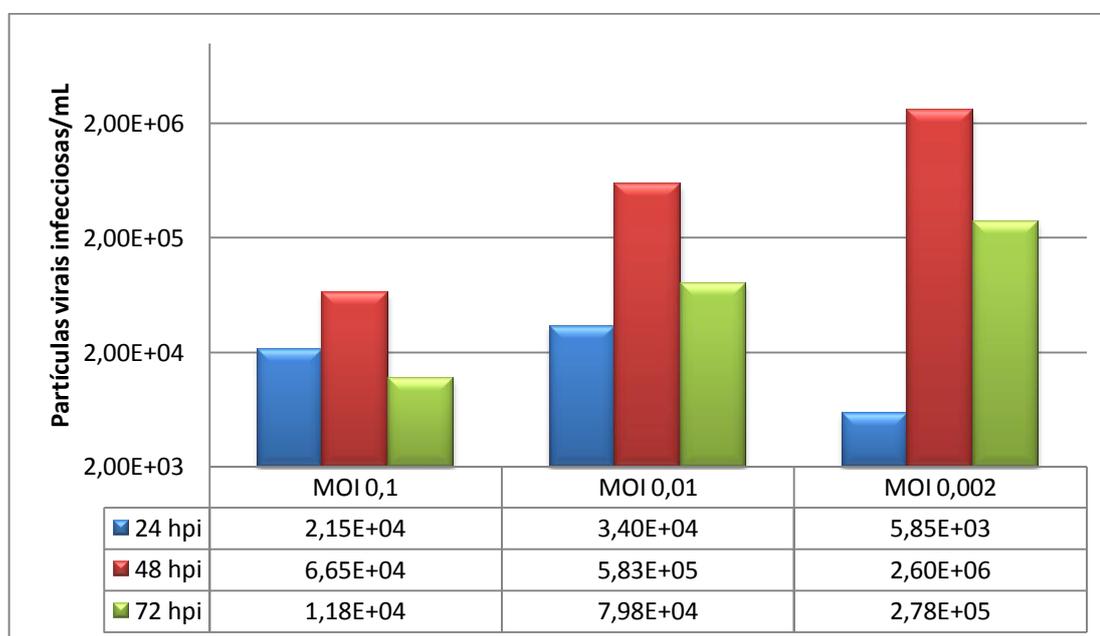
Figura 4.20 – Proteínas virais intercalam com a marcação da miosina em miofibras.

Células musculares esqueléticas de embriões de galinha cultivadas e infectadas *in vitro* pelo vírus da febre amarela 17DD; MOI 0,1, 168 hpp [T120]/ 48 hpi. Áreas com → indicam fibras musculares esqueléticas infectadas e áreas com * indicam a marcação de proteínas virais intercalando com a marcação da miosina. Marcação para miosina (amarelo), núcleo (azul) e FA (verde). Microscopia confocal a laser.

4.2.3 Avaliação da infecção de células musculares esqueléticas em cultura pelo vírus da febre amarela 17DD em diferentes MOI

A susceptibilidade e a permissividade de células musculares esqueléticas de embriões de galinha em cultura frente a diferentes MOIs foram testadas pela exposição destas células ao vírus da febre amarela 17DD no momento do plaqueamento (T0). Para tal, foram escolhidas três MOIs (0,1, 0,01 e 0,002) analisados após 24, 48 e 72 horas de infecção. Foi possível observar em 48 e 72 hpi uma relação inversa entre a MOI utilizada na infecção e o título viral detectado por PFU após a coleta do sobrenadante (Gráfico 4.2). A MOI de 0,002 apresentou o maior título viral, quando comparado às outras concentrações. Assim como nos testes anteriores, o pico de produção foi observado em 48 hpi, seguido por uma ligeira queda em 72 hpi.

Gráfico 4.2 – Análise da cinética da produção de partículas virais infecciosas pela cultura muscular esquelética de embrião de galinha, infectada no momento do plaqueamento com o vírus da febre amarela 17DD em diferentes multiplicidades de infecção (MOI).



O lisado das células destas culturas foi analisado pela biologia molecular, onde foi detectada a presença do RNA genômico e do intermediário replicativo pela reação em cadeia polimerase (PCR). Já em 24 hpi, foi observada a presença tanto o RNA genômico quanto do intermediário replicativo nas culturas inoculadas com a

MOI de 0,1 e 0,01. Neste mesmo tempo não foi detectada a presença de ambos RNAs nas culturas inoculadas com a MOI de 0,002 (Figura 4.21). Em 48 hpi, todas as amostras foram positivas para a detecção do RNA genômico e do intermediário replicativo (Figura 4.21). Em 72 hpi foi detectado o RNA genômico em todas as amostras, entretanto o intermediário replicativo foi detectado apenas na cultura inoculada com a MOI de 0,002, sendo negativo nas outras MOIs (Figura 4.21). Em todos os tempos não houve detecção de material genético viral nas amostras obtidas das culturas controles.

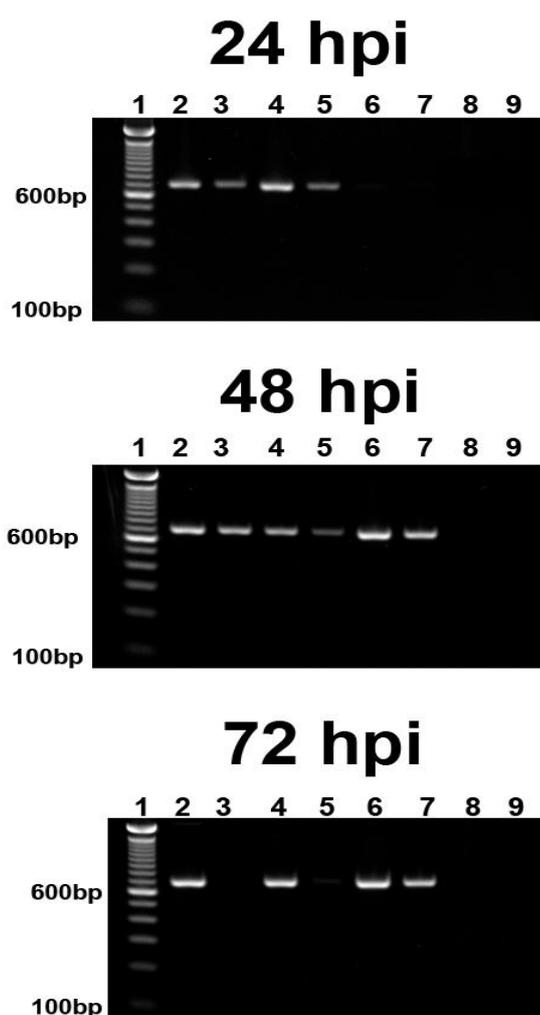


Figura 4.21 – A susceptibilidade da cultura a infecção pelo vírus 17DD foi confirmada pela detecção do RNA genômico viral e do intermediário replicativo por RT-PCR.

Detecção do RNA genômico e do intermediário replicativo do vírus da febre amarela 17DD extraído do extrato de células musculares esqueléticas de embrião de galinha infectadas *in vitro* no momento do plaqueamento (T0) nas MOIs de 0,1; 0,01 e 0,002. Reação em cadeia da polimerase. 1: Padrão de 100pb, 2: RNA genômico MOI 0,1; 3: intermediário replicativo MOI 0,1; 4: RNA genômico MOI 0,01; 5: intermediário replicativo MOI 0,01; 6: RNA genômico MOI 0,002; 7: intermediário replicativo MOI 0,002; 8: RNA genômico extraído da cultura controle; 9: intermediário replicativo extraído da cultura controle.

4.2.3.1 Análise morfológica de células musculares esqueléticas em cultura infectadas pelo vírus da febre amarela 17DD em diferentes MOI no momento do plaqueamento (T0)

Células musculares de galinha foram analisadas quanto à morfologia 24, 48 e 72 horas após serem infectadas com três MOIs diferentes (0,1, 0,01 e 0,002) de FA17DD. Todos os controles apresentaram padrão bastante similar ao já descrito nos experimentos anteriores, e não houve diferença de padrão morfológico entre as concentrações de inóculo (Figura 4.9, Figura 4.11 A e B, Figura 4.12 A e B, Figura 4.22 A e B, Figura 4.23 A e B, Figura 4.24 A e B, Figura 4.25 A e B, Figura 4.26 A e B e Figura 4.28 A e B). No primeiro ponto de análise (24 hpp), a cultura era pouco confluenta, com diversos mioblastos, alguns aderindo a fibras delgadas, miosina positivas. Também foram observados fibroblastos (Figura 4.9, Figura 4.22 A e B e Figura 4.25 A e B). No segundo ponto de análise (48 hpp) a cultura estava mais confluenta, com muitas fibras espessas próximas a outras delgadas. Observamos poucos mioblastos e alguns miócitos (Figura 4.11 A e B, Figura 4.23 A e B e Figura 4.26 A e B). Com 72 horas, foi observada uma cultura confluenta, com muitas fibras multinucleadas, algumas mais delgadas, outras mais espessas, padrão este muito semelhante ao observado em 48 horas com número maior de fibroblastos (Figura 4.12 A e B, Figura 4.24 A e B e Figura 4.28 A e B).

As células infectadas no momento do plaqueamento com MOI de 0,1 apresentaram padrão idêntico ao observado no experimento anterior, descrito no item 4.2.1.1 (Figura 4.10, Figura 4.11 C, D, Figura 4.12 C, D).

Nos pontos submetidos à infecção com MOI de 0,01, foram observados 24 hpi mioblastos e poucas fibras delgadas infectadas. A maioria das células infectadas são mioblastos e estão em grande número na cultura. Foram observados também mioblastos infectados se dividindo (Figura 4.22 C e D). Em 48 horas de infecção, foram notados diversos miócitos infectados. Alguns grupos destas células aparentavam se fundir para formar uma fibra. De um modo geral, a cultura não pareceu resistir bem à infecção, apresentando poucas fibras formadas em comparação ao controle (Figura 4.23 C e D). Em 72 horas hpi, foram vistos poucos miócitos infectados, raríssimas fibras com poucos núcleos e muitos debris celulares que se mostraram positivos para marcação de proteínas virais, indicando que aparentemente estas células morreram como consequência da infecção (Figura 4.24 C e D).

A cultura infectada com MOI de 0,002, em 24 hpi, apresentava baixa confluência, semelhante ao controle, entretanto com menos fibras formadas. Poucos miócitos infectados foram observados próximos a fibras musculares não infectadas (Figura 4.25 C e D). Em 48 hpi, foi notada uma extensa marcação de proteínas virais em toda a cultura, bem distribuída por toda a lamínula. Fibras musculares e miócitos apresentavam-se infectados (Figura 4.26 C e D). Em 72 hpi, não foram notadas mais fibras musculares na cultura, apenas fibroblastos não infectados foram vistos. Debris celulares com marcação positiva para proteínas virais espalhados por toda lamínula também foram observados (Figura 4.28 C e D). Quando comparada às demais condições experimentais testadas neste trabalho, a MOI de 0,002 apresentou o maior índice de infecção (Figura 4.29 e Figura 4.30 – imagens em *tile scan*).

Em todas as MOIs utilizadas foi observada a marcação de partículas virais em adensamentos perinucleares e em regiões que são compatíveis com a localização do retículo endoplasmático das células musculares e dos fibroblastos. Marcação semelhante com as outras condições testadas em outros experimentos.

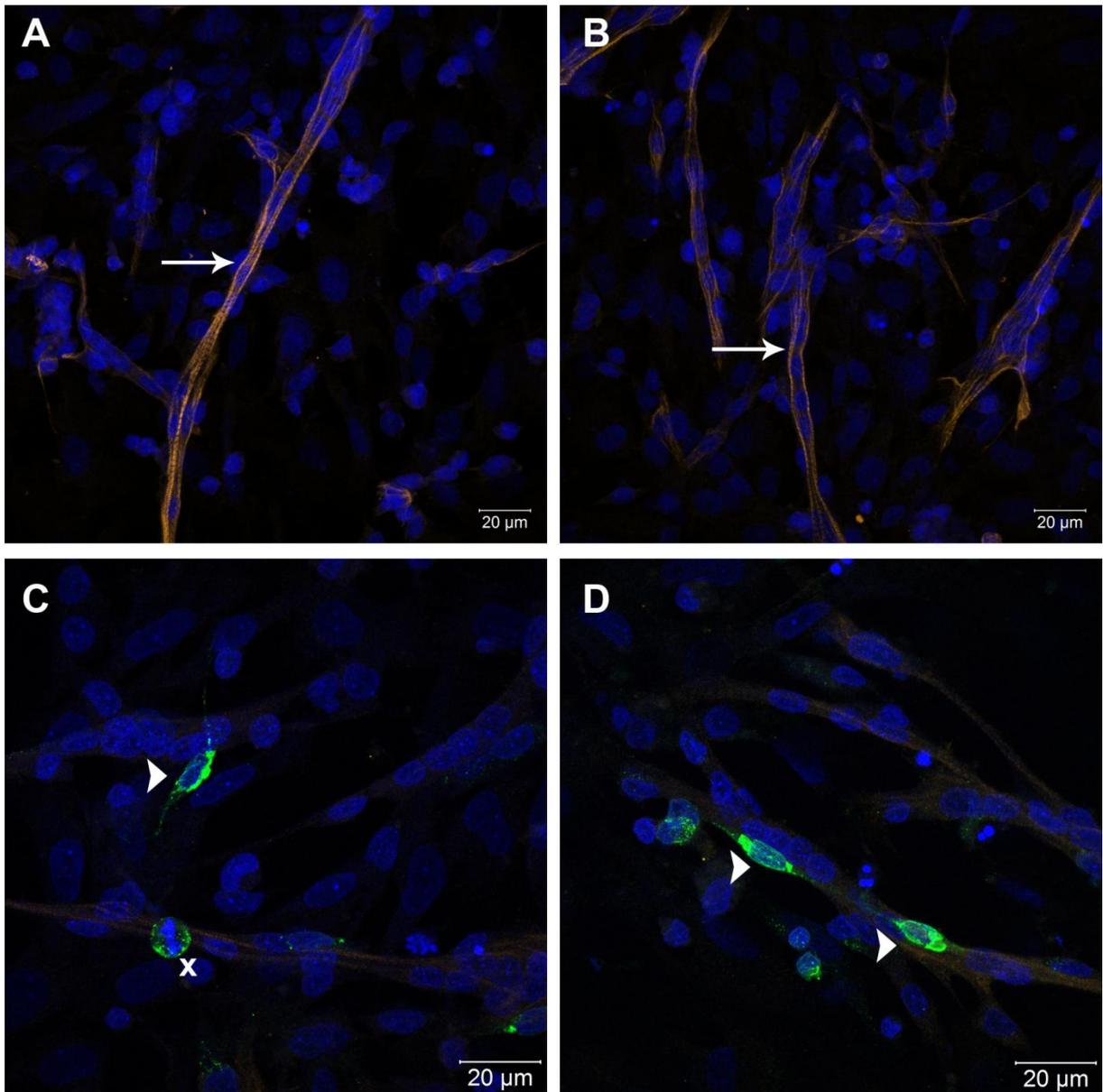


Figura 4.22 – Mioblastos foram observados infectados com a MOI de 0,01 em 24 hpi.

Células musculares esqueléticas de embriões de galinha cultivadas e infectadas *in vitro* pelo vírus da febre amarela 17DD. Controle (A e B) e infectadas MOI 0,01 (C e D) 24 hpp [T0]/ 24 hpi. Áreas com → indicam fibras musculares esqueléticas, áreas com ► indicam mioblastos infectados, áreas com x indicam células infectadas em mitose. Marcação para miosina (amarelo), núcleo (azul) e FA (verde). Microscopia confocal a laser.

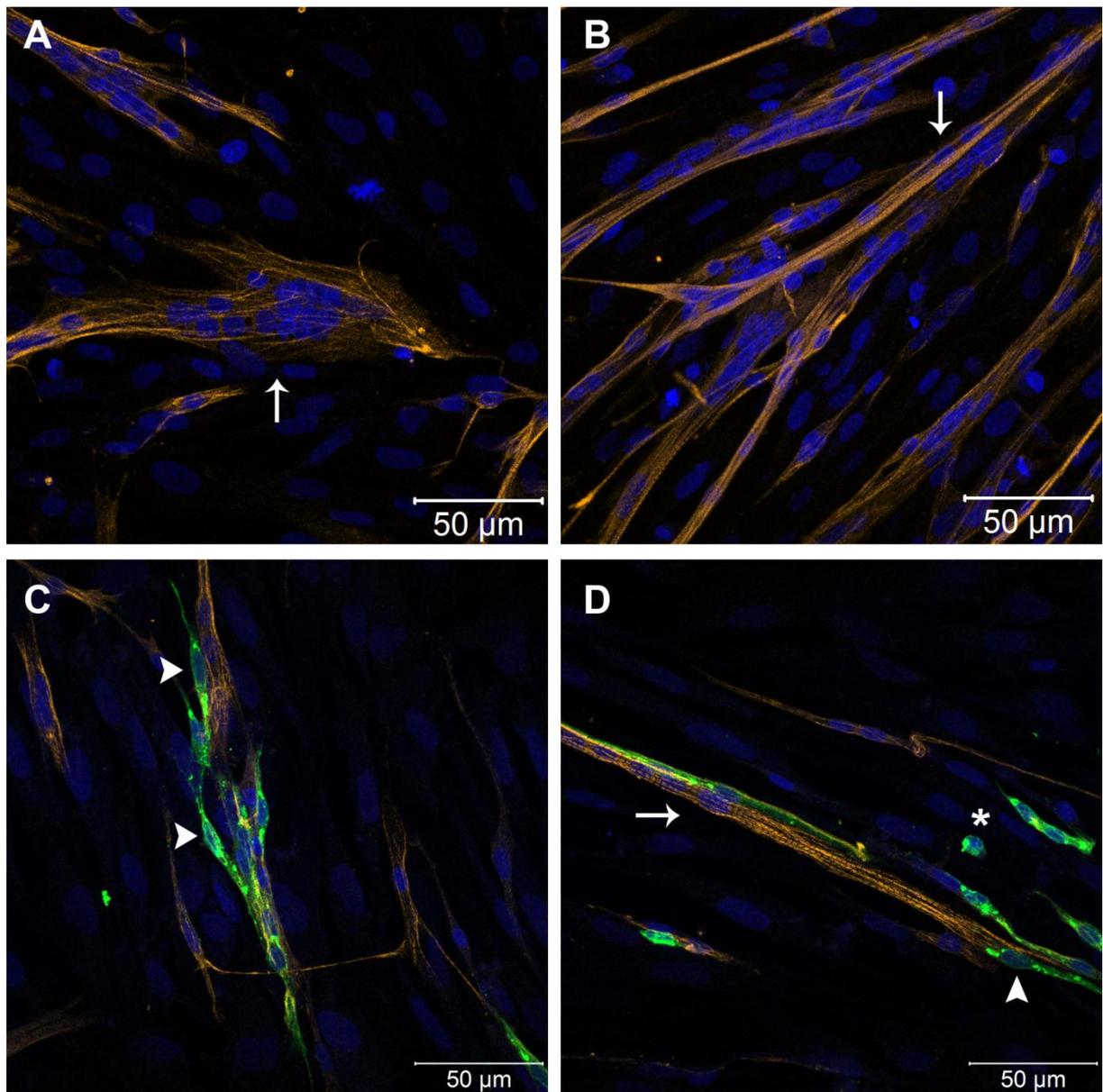


Figura 4.23 – Mioblastos aglomerados e próximos a fibras musculares foram positivos para o vírus 17DD.

Células musculares esqueléticas de embriões de galinha cultivadas e infectadas *in vitro* pelo vírus da febre amarela 17DD. Controle (A e B) e infectadas MOI 0,01 (C e D) 48 hpp [T0]/48 hpi. Áreas com → fibras musculares esqueléticas, áreas com ► indicam miócitos e áreas com * indicam células com núcleo picnótico com marcação para proteínas virais. Marcação para miosina (amarelo), núcleo (azul) e FA (verde). Microscopia confocal a laser.

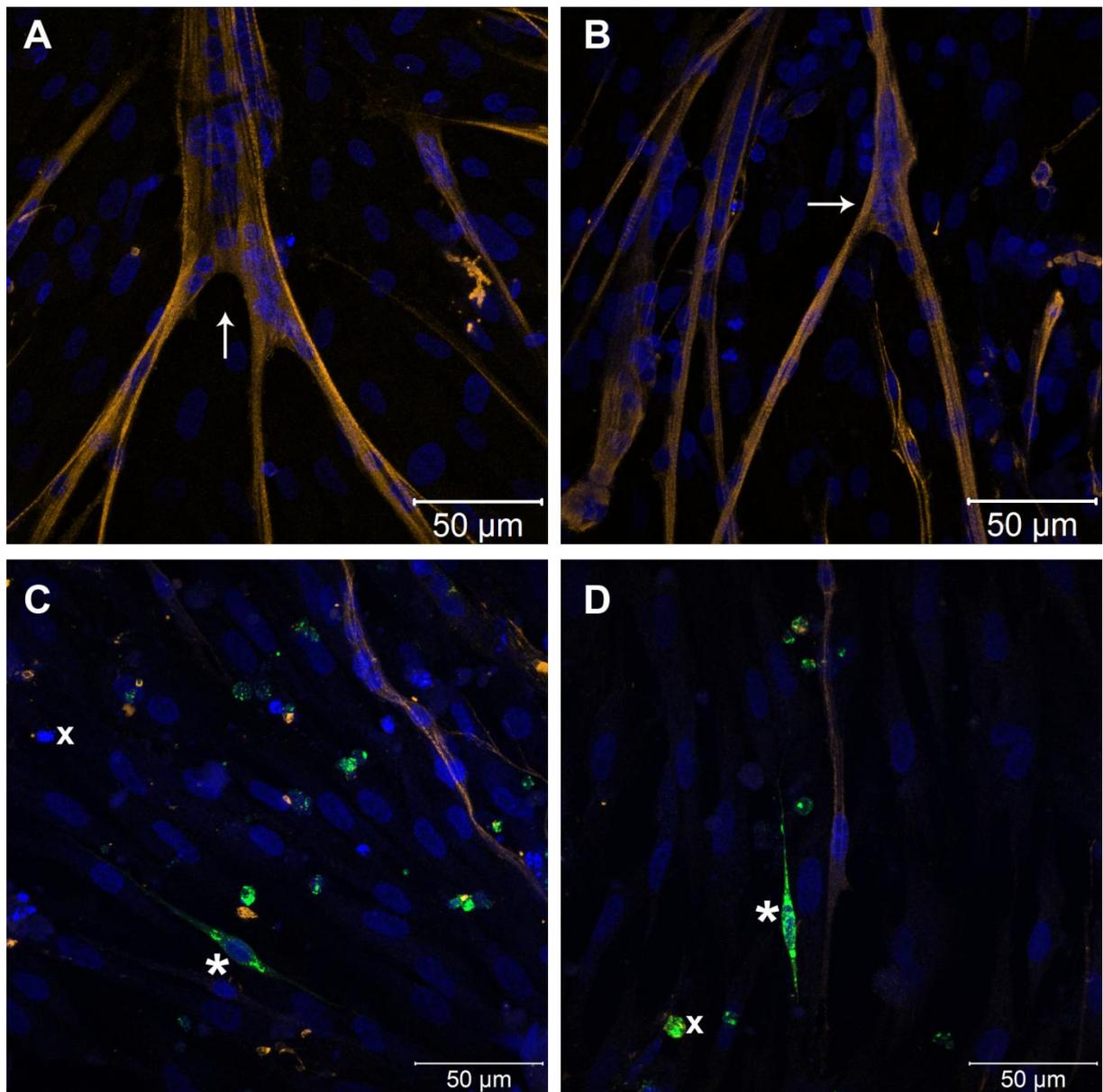


Figura 4.24 – Debris celulares acompanhados de raros miócitos foram observados positivos para febre amarela em 72 hpi.

Células musculares esqueléticas de embriões de galinha cultivadas e infectadas *in vitro* pelo vírus da febre amarela 17DD. Controle (A e B) e infectadas MOI 0,01 (C e D) 72 hpp [T0]/ 72 hpi. Áreas com → indicam fibras musculares esqueléticas, áreas com * indicam miócitos e áreas com x indicam células com núcleo picnótico ou cariorex. Marcação para miosina (amarelo), núcleo (azul) e FA (verde). Microscopia confocal a laser.

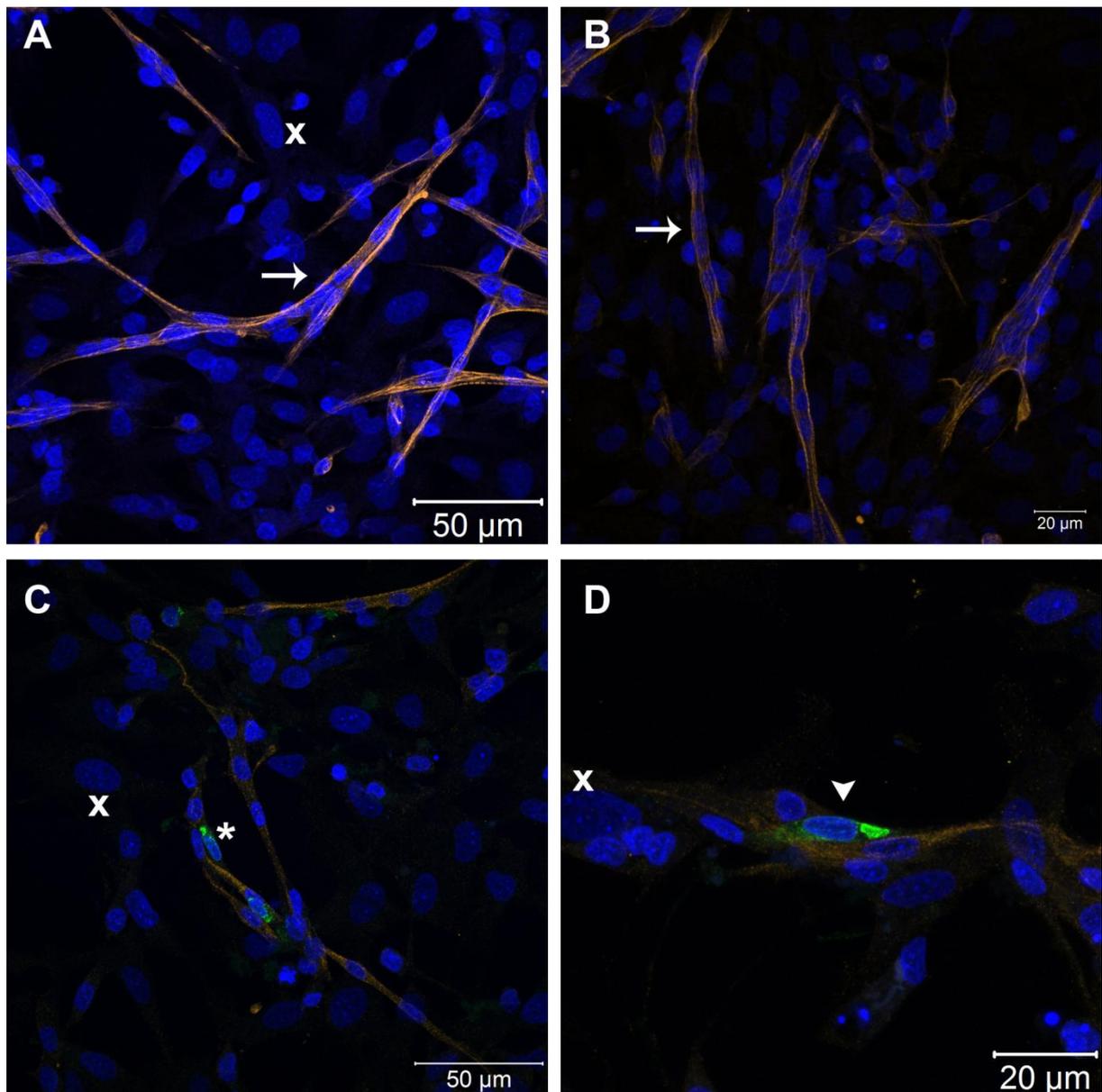


Figura 4.25 – Poucas células infectadas foram observadas em 24 hpi na MOI de 0,002.

Células musculares esqueléticas de embriões de galinha cultivadas e infectadas *in vitro* pelo vírus da febre amarela 17DD. Controle (A e B) e infectadas MOI 0,002 (C e D) 24 hpp [T0]/ 24 hpi. Áreas com → indicam fibras musculares esqueléticas, áreas com * indicam mioblastos infectados, áreas com ► indicam miócitos infectados e áreas com x indicam fibroblastos. Marcação para miosina (amarelo), núcleo (azul) e FA (verde). Microscopia confocal a laser.

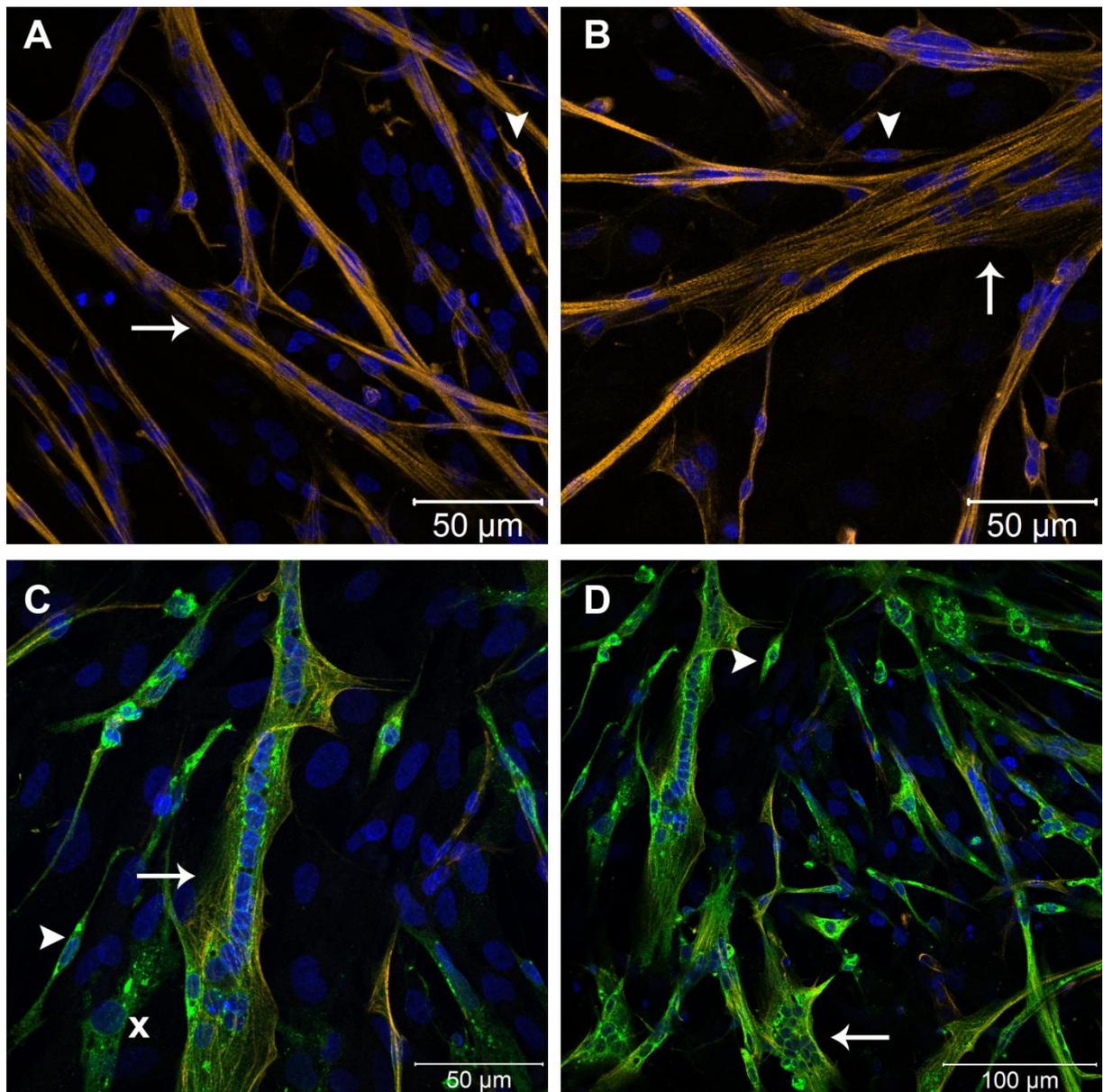


Figura 4.26 – Quase a totalidade das células musculares em diferentes estágios de diferenciação na cultura de 48 hpi foram susceptíveis à infecção na MOI 0,002.

Células musculares esqueléticas de embriões de galinha cultivadas e infectadas *in vitro* pelo vírus da febre amarela 17DD. Controle (A e B) e infectadas MOI 0,002 (C e D) 48 hpp [T0]/ 48 hpi. Áreas com → indicam fibras musculares esqueléticas, áreas com ► indicam miócitos áreas com x indicam fibroblastos infectados. Marcação para miosina (amarelo), núcleo (azul) e FA (verde). Microscopia confocal a laser.

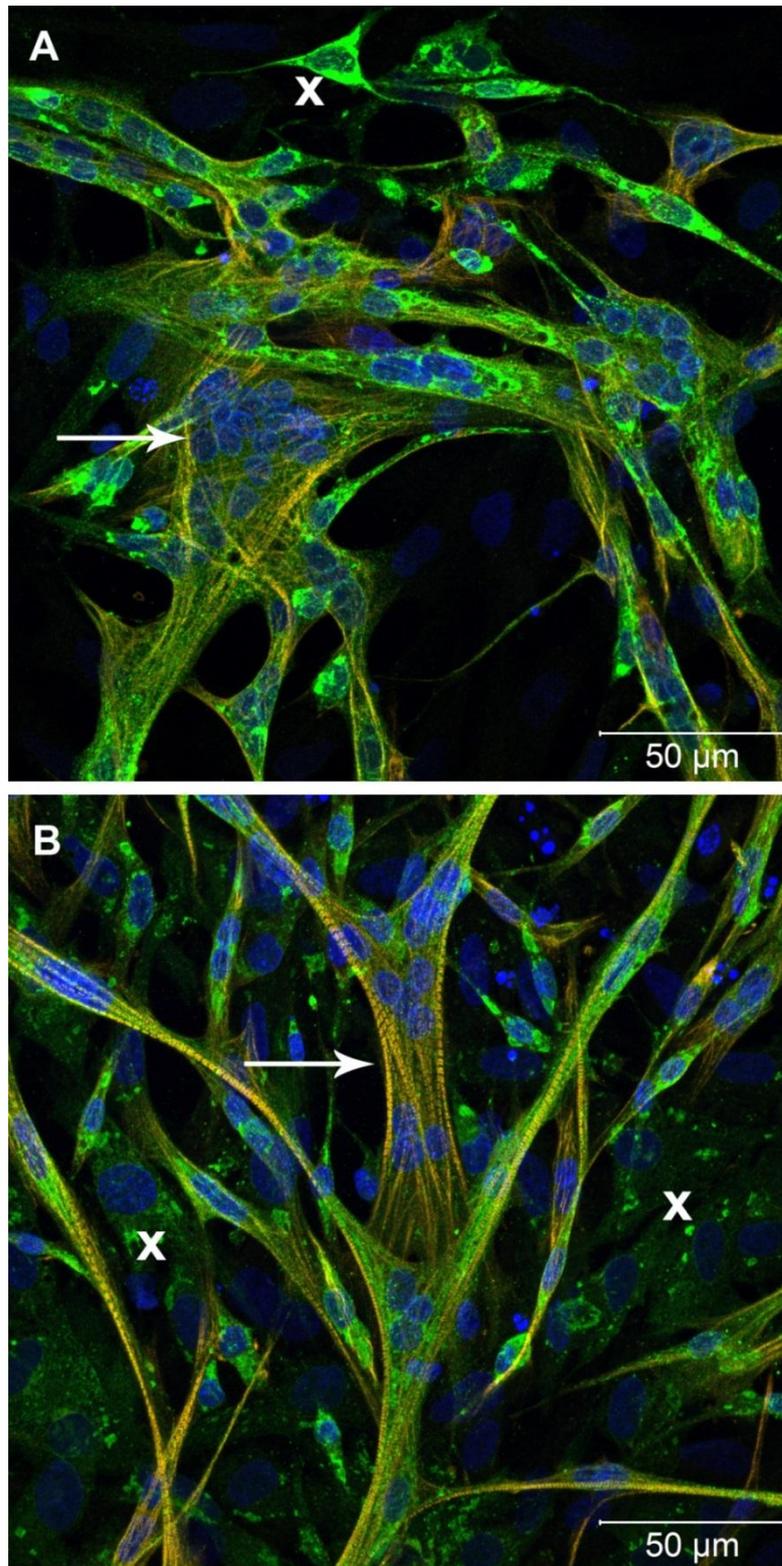


Figura 4.27 – Fibroblastos infectados foram observados na cultura de células musculares esqueléticas pela primeira vez.

Células musculares esqueléticas de embriões de galinha cultivadas e infectadas *in vitro* pelo vírus da febre amarela 17DD. Infectadas MOI 0,002 (A e B) 48 hpp [T0]/ 48 hpi. Áreas com → indicam fibras musculares esqueléticas infectadas e área com x indicam fibroblastos infectados. Marcação para miosina (amarelo), núcleo (azul) e FA (verde). Microscopia confocal a laser.

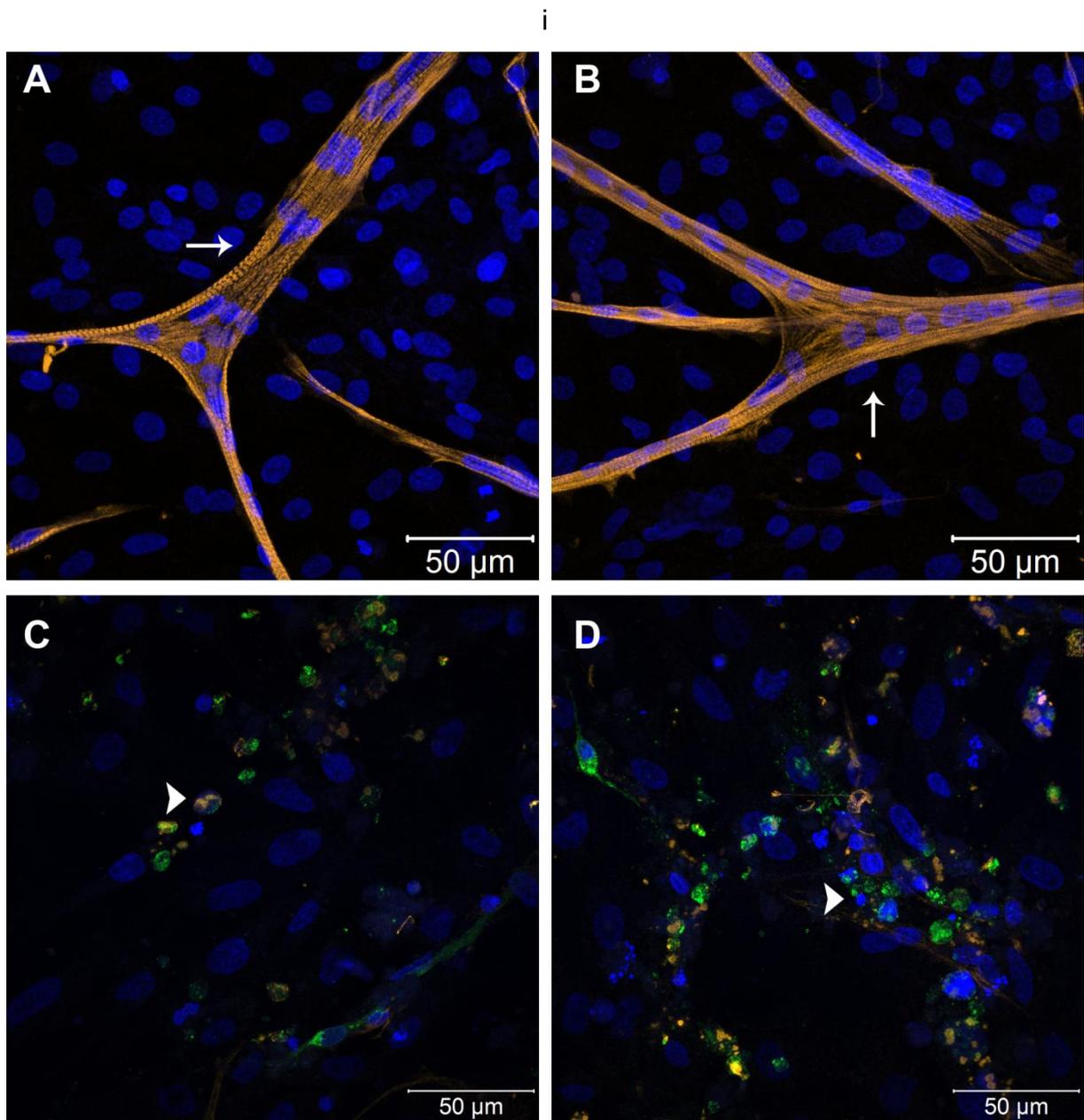


Figura 4.28 – Intenso efeito citopático na cultura em 72 hpi.

Células musculares esqueléticas de embriões de galinha cultivadas e infectadas *in vitro* pelo vírus da febre amarela 17DD. Controle (A e B) e infectadas MOI 0,002 (C e D) 72 hpp [T0]/ 72 hpi. Áreas com → indicam fibras musculares esqueléticas nas culturas controles e áreas com ► indicam debris celulares com marcação para proteínas virais. Marcação para miosina (amarelo), núcleo (azul) e FA (verde). Microscopia confocal a laser.

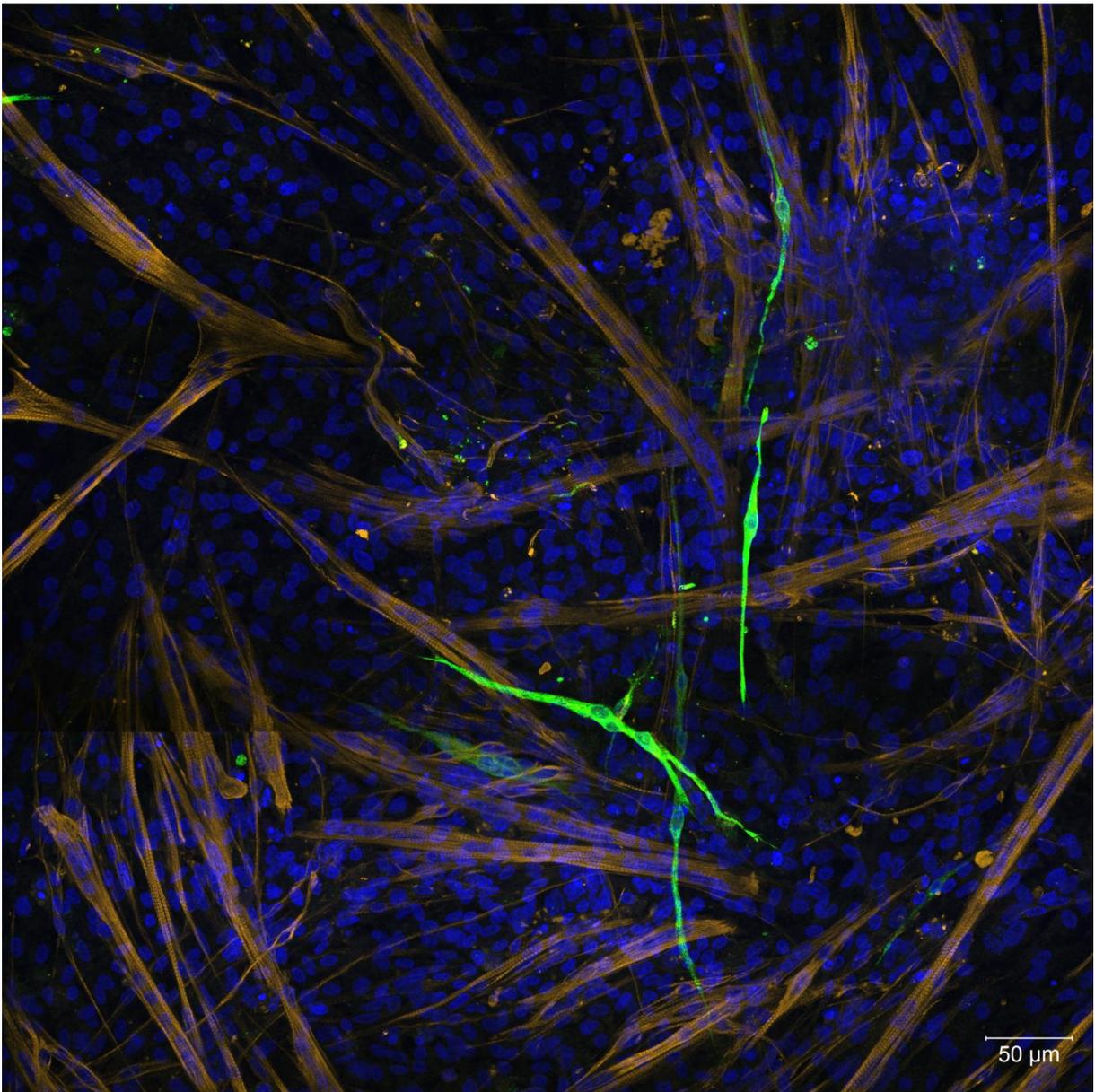


Figura 4.29 – Baixo índice de infecção da cultura primária de células musculares esqueléticas utilizando a MOI de 0,1.

Células musculares esqueléticas de embriões de galinha cultivadas e infectadas *in vitro* pelo vírus da febre amarela 17DD. MOI 0,1 96 hpp [T24]/ 72 hpi. Marcação para miosina (amarelo), núcleo (azul) e FA (verde). Microscopia confocal a laser.

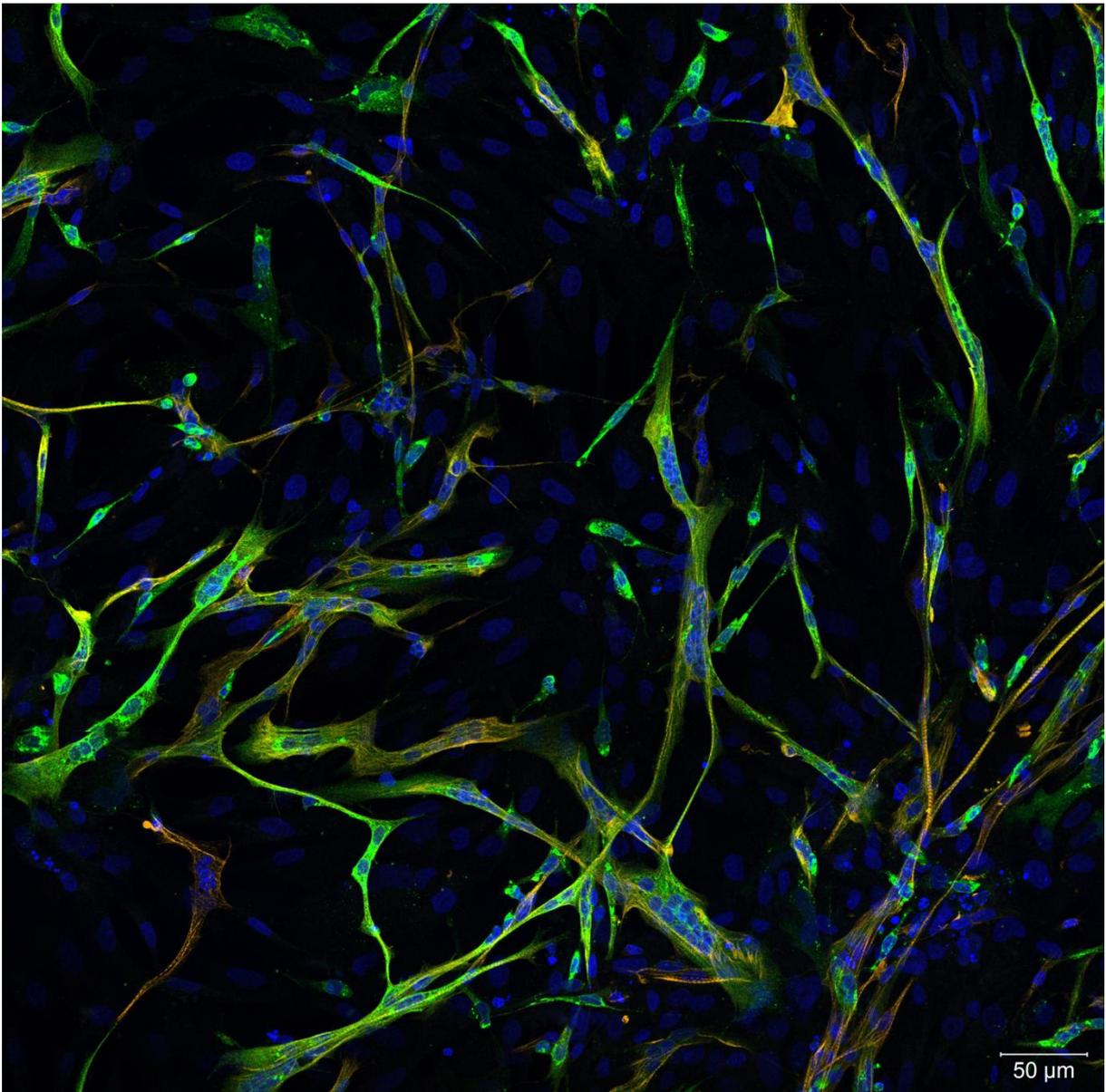


Figura 4.30 – Alto índice de infecção foi observado em 48 hpi na MOI 0,002, quando comparado às demais MOI.

Células musculares esqueléticas de embriões de galinha cultivadas e infectadas *in vitro* pelo vírus da febre amarela 17DD. MOI 0,002 48 hpp [T0]/ 48 hpi. Marcação para miosina (amarelo), núcleo (azul) e FA (verde). Microscopia confocal a laser.

Os resultados *in vitro*, apresentados até aqui, obtidos com a infecção da cultura primária de células musculares esqueléticas de embrião de galinha no momento do plaqueamento (T0) com diferentes concentrações do inóculo (MOI 0,1; 0,01 e 0,002), estão resumidos na tabela abaixo:

Tabela 4.3 - Resumo dos resultados da infecção da cultura primária de células musculares esqueléticas de embrião de galinha no momento do plaqueamento (T0) com diferentes concentrações do inóculo (MOI 0,1; 0,01 e 0,002)

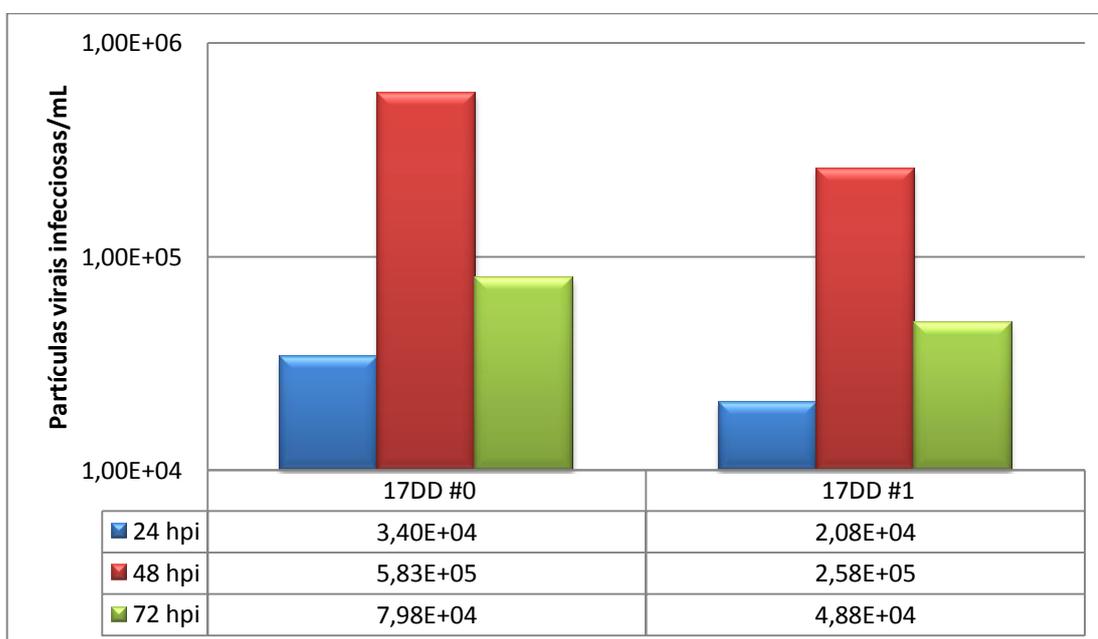
Infecção feita no momento do plaqueamento (T0)				
		24 hpi	48 hpi	72 hpi
Controle	Confluência	Baixa	Média	Alta
	Fibras musculares	Neformadas	Espessas e delgadas	Espessas
	Mioblastos/miócitos:	Presentes /poucos	Poucos/alguns	Poucos/raros
	RNA genômico	Negativo	Negativo	Negativo
	Interme. Replicativo	Negativo	Negativo	Negativo
MOI 0,1	Confluência	Baixa	Média	Baixa
	Células infectadas	Fibras/mioblastos	Fibras/miócitos	Fibras
	Efeito citopático	Pouco	Pouco	Pouco
	Índice de infecção	Baixo	Baixo	Baixo
	PFU/mL	2,1x10 ⁴	6,6x10 ⁴	1,1x10 ⁴
	RNA genômico	Positivo	Positivo	Positivo
	Interme. Replicativo	Positivo	Positivo	Negativo
MOI 0,01	Confluência	Baixa	Média	Baixa
	Células infectadas	Fibras/ e mioblastos	Fibras/miócitos	Fibras
	Efeito citopático	Pouco	Médio	Pouco
	Índice de infecção	Baixo	Baixo	Baixo
	PFU/mL	3,4x10 ⁴	5,8x10 ⁵	7,9x10 ⁴
	RNA genômico	Positivo	Positivo	Positivo
	Interme. Replicativo	Positivo	Positivo	Negativo
MOI 0,002	Confluência	Alta	Média	Alta
	Células infectadas	Fibras/mioblastos/miócitos	Fibras/miócitos	Fibras
	Efeito citopático	Pouco	Pouco	Alto
	Índice de infecção	Baixo	Baixo	Baixo
	PFU/mL	5,8x10 ³	2,6x10 ⁶	2,7x10 ⁵
	RNA genômico	Negativo	Positivo	Positivo
	Interme. Replicativo	Negativo	Positivo	Positivo

4.2.4 Avaliação de uma passagem do vírus FA17DD produzido em cultura de células musculares esqueléticas de *Gallus gallus domesticus*

Embora a produção de partículas vírais infecciosas já tenha sido observada, por PFU em cultura de células Vero, foi analisado também o comportamento da produção viral de partículas infecciosas em uma segunda passagem destes vírus em cultura. A passagem do vírus produzido em cultura foi bem-sucedida. As células musculares foram susceptíveis e permissíveis a infecção, apesar de ter sido observada pouca diferença em relação à produção de partículas virais infecciosas quando analisadas por PFU. Foi observado um pico de produção em 48 hpi seguido de uma ligeira queda em 72 hpi, sem aumento significativo de título viral (Gráfico 4.3).

Gráfico 4.3 - Análise da cinética da produção de partículas virais infecciosas após passagem do vírus *in vitro*.

Comparação da produção de partículas virais infecciosas das culturas infectadas com o inóculo obtido de ovos embrionados (17DD #0) e do sobrenadante de culturas primárias de células musculares esqueléticas (17DD #1).



A análise pela reação em cadeia da polimerase do extrato de células das culturas infectadas pela passagem #1 do vírus demonstrou a presença dos RNAs genômico e intermediário replicativo em todos os tempos analisados (Figura 4.31).

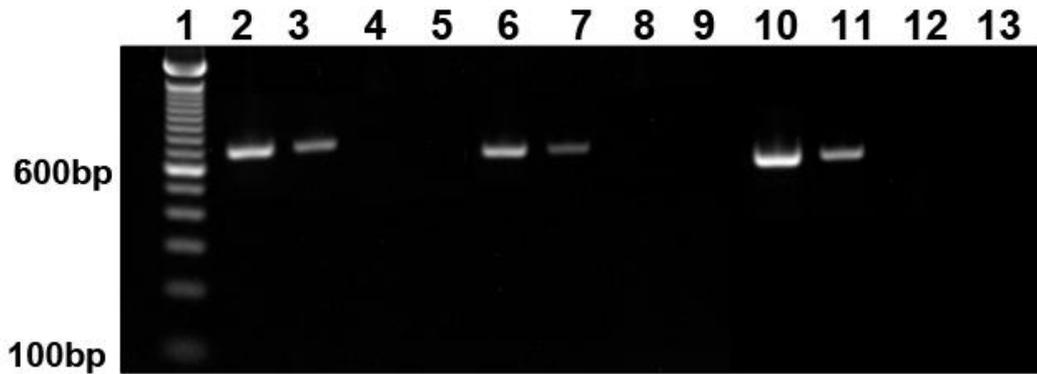


Figura 4.31 – Confirmação da susceptibilidade da cultura de células musculares à infecção pelo vírus 17DD produzido pela cultura de células a partir da detecção do RNA genômico viral e do intermediário replicativo por RT-PCR.

Detecção do RNA genômico e do intermediário replicativo do vírus da febre amarela 17DD #1 extraído do extrato de células musculares esqueléticas de embrião de galinha infectadas *in vitro* no momento do plaqueamento (T0) na MOI de 0,01. Reação em cadeia da polimerase. 1: Padrão de 100bp, 2: RNA genômico 24 hpi; 3: intermediário replicativo 24 hpi; 4: RNA genômico controle 24 hpi; 5: intermediário replicativo controle 24 hpi; 6: RNA genômico 48 hpi; 7: intermediário replicativo 48 hpi; 8: RNA genômico controle 48 hpi; 9: intermediário replicativo controle 48 hpi; 10: RNA genômico 72 hpi; 11: intermediário replicativo 72 hpi; 12: RNA genômico controle 72 hpi; 13: intermediário replicativo controle 72 hpi;

As culturas infectadas com o vírus produzido em cultura de células musculares apresentaram um padrão morfológico bastante similar às culturas infectadas com o inóculo viral obtido da polpa embrionária obtida por trituração dos embriões inoculados com o lote semente por Biomanguinhos. Ambos inóculos utilizados possuíam MOI de 0,01. A análise morfológica das culturas controles e infectadas com a MOI de 0,01 (#0), no momento do plaqueamento (T0), já foi descrita no item 4.2.3 No primeiro ponto de análise por imunofluorescência das culturas infectadas com o vírus produzido em cultura (#1) (24 hpp/ 24 hpi) foram observados mioblastos infectados, muitos aderindo a fibras musculares. Poucas fibras musculares infectadas foram notadas (Figura 4.32 A e B). No segundo ponto de análise (48 hpp/ 48 hpi) menos células infectadas foram observadas em comparação ao primeiro ponto de análise, em sua maioria miócitos (Figura 4.32 C e D). No último ponto de análise (72 hpp/ 72 hpi) foram vistos raríssimos miócitos infectados, e alguns debris celulares com marcação positiva para o vírus da febre amarela, aparentando um significativo efeito citopático em relação ao controle (Figura 4.32 E e F).

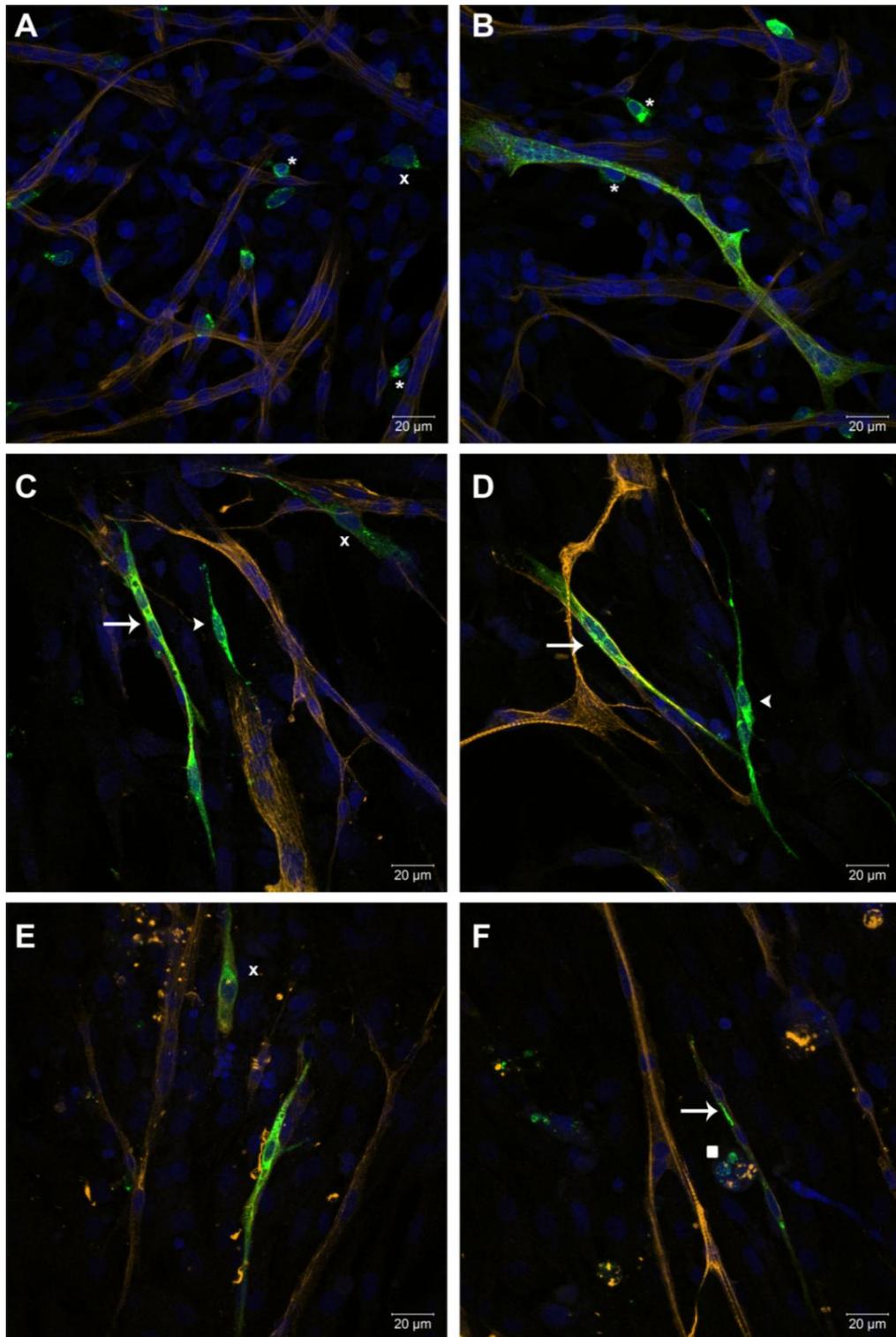


Figura 4.32 – A infecção com o vírus produzido pela cultura primária de células musculares esqueléticas foi bem sucedida, reproduzindo o padrão de infecção.

Células musculares esqueléticas de embriões de galinha cultivadas e infectadas *in vitro* em T0 pelo vírus da febre amarela 17DD produzido em cultura (#1) na MOI 0,01. A e B – 24 hpi. C e D – 48 hpi. D e E – 72 hpi. Áreas com → indicam fibras musculares esqueléticas infectadas, áreas com * indicam mioblastos áreas com ► indicam miócitos e áreas observadas com ■ indicam debris celulares com marcação para proteínas virais. Marcação para miosina (amarelo), núcleo (azul) e FA (verde). Microscopia confocal a laser.

5 DISCUSSÃO

Células musculares esqueléticas obtidas do músculo do peito e das patas de embriões de galinha com onze dias de desenvolvimento foram suscetíveis e permissivas à infecção pelo vírus da febre amarela 17DD em todas as condições às quais as culturas foram submetidas neste trabalho. Morfologicamente a infecção *in vitro* mimetiza as características observadas *in vivo*, havendo preferência inicial da infecção em células musculares pouco diferenciadas.

No atual trabalho foram observadas fibras musculares esqueléticas de embriões de galinha infectados com o vírus da febre amarela 17DD o que corrobora os dados observados anteriormente pelo nosso grupo, descritos em Manso *et al.* (61,62). Nestes trabalhos foram encontradas marcações para proteínas virais em adensamentos perinucleares e também acompanhando a estriação da fibra muscular, padrão de marcação este que se reproduziu no presente trabalho tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Manso e colaboradores também descreveram que as primeiras células a aparecerem infectadas no tecido muscular esquelético possuíam morfologia sugestiva de mioblasto, e apenas em tempos posteriores as fibras apareciam infectadas, sugerindo que o mioblasto seria o alvo da infecção e que a fusão destes mioblastos infectados a fibras musculares é que tornaria a fibra infectada (62).

A miogênese envolve estágios de diferenciação da célula muscular que diferem entre si morfológica e fenotípicamente. Entretanto, nem sempre estes estágios são facilmente identificados, principalmente porque se trata de um processo dinâmico e não raramente encontramos células que estavam em estágio transicional. Por conta disso, estabelecemos critérios morfológicos e imunofenotípicos para a designação das células presentes na cultura e nos embriões (sumarizados na tabela 4.1), os quais foram baseados em dados presentes na literatura (65,76,82,85). No entanto, se tratando da espécie *Gallus gallus*, há dificuldade de encontrar anticorpos que reconheçam proteínas do programa miogênico destes animais. Neste trabalho não obtivemos sucesso com a detecção de algumas proteínas do programa miogênico que foram testadas (MyoD, Myf5 e Miogenina), o que dificultou a identificação precisa dos diferentes estágios de diferenciação das células infectadas. Contudo, a caracterização fenotípica destas

células foi possível através da detecção da expressão do fator de transcrição Pax7 e de moléculas de citoesqueleto (Desmina e Miosina).

Neste contexto, algumas células infectadas apresentaram-se em um estágio de diferenciação que expressava o fator de transcrição Pax7, o qual é expresso no núcleo de células que estão comprometidas com a linhagem miogênica, mas que ainda não entraram no programa miogênico (67). Apesar de o Pax7 ser constantemente referido na literatura como um marcador de células satélites (99–101), estas células constituem uma população de mioblastos adultos que neste estágio de desenvolvimento ainda não estão presentes em embriões de galinha (102). Sendo assim, estas células Pax7⁺ infectadas com o vírus FA17DD que encontramos em embriões são células precursoras, comprometidas com a linhagem miogênica. Estas pertencem à população de células que vão dar origem aos mioblastos fetais, que é a população predominante no estágio de desenvolvimento embrionário utilizado para a produção da vacina (102).

A susceptibilidade destes precursores também foi por nós observada na infecção experimental *in vitro*. Porém, neste sistema, a maioria das células infectadas já havia se diferenciado em mioblastos ou miócitos (24 hpi). Entretanto, não pode ser descartada a possibilidade de que estas células tenham sido infectadas quando ainda eram precursoras que seguiram o programa de diferenciação e, no momento da observação, já teriam entrado no programa miogênico, deixando de expressar o Pax7. Tanto *in vivo* quanto *in vitro*, foi notória a preferência da infecção por células indiferenciadas ou em estágios iniciais da diferenciação, apesar de ter sido comprovada a susceptibilidade de fibras musculares à infecção pelo vírus FA17DD (T120). Nossos dados complementam aqueles encontrados por Manso *et al.* (61,62) e contribuem para o entendimento da infecção pelo vírus da FA em tecido muscular esquelético de embriões nos moldes utilizados para a produção da vacina.

Manso *et al.* também apontaram o tecido muscular esquelético de embriões de galinha como o principal sítio de replicação viral e descreveram uma intensa infecção neste local até 96 hpi (62). A análise mais tardia do músculo destes embriões por imunofluorescência, realizada nesta dissertação, mostrou uma fraca marcação para proteínas virais com 120 horas que se extingue entre 144 e 168 hpi. Esta dinâmica de infecção corrobora os dados encontrados por Fox e Laemmert em 1947 que, ao estudarem a produção viral em diversos tecidos de embriões de galinha, detectaram o maior título no tecido muscular esquelético entre 72 e 96 hpi,

que decrescia consideravelmente em seguida (103). Em paralelo, enquanto a concentração de partículas virais presentes no tecido muscular diminui a partir de 120 hpi, a quantidade de células do tecido nervoso central infectadas pelo 17DD aumenta nestes embriões (62). Embora não tenha sido objeto deste trabalho, observamos em embriões com 120 hpi uma marcação mais difusa e com maior intensidade no tecido nervoso dos nossos animais.

Considerando que a infecção de embriões de galinha é realizada no 9º dd, essa janela temporal de menor expressão de proteínas virais (120 a 168 hpi) corresponde a 14 a 16 dd. É descrito que, nessa fase do desenvolvimento, ocorre uma mudança da população de mioblastos, de fetais para adultos (102). Sendo assim, podemos sugerir que aquelas células Pax7⁺ infectadas vão dar origem a mioblastos fetais. Talvez o estabelecimento da infecção do vírus FA17DD em embriões de galinha dependa de uma população de células que ocorra predominante apenas numa determinada janela do desenvolvimento embrionário. A destruição de fibras musculares infectadas somada à indisponibilidade de mioblastos fetais poderiam, em conjunto, ser responsáveis pela cura espontânea da infecção neste tecido.

Outra explicação possível para tal esgotamento seria a produção de interferon (IFN). Interferons são moléculas da resposta imune que possuem grande importância em infecções virais (104). São descritos diversos tipos de interferons em mamíferos, diferente do que ocorre em aves, onde a descrição destas moléculas é escassa (105). Em galinha são descritos na literatura os IFNs - α , - β , - γ e - λ , sendo os dois primeiros produzidos principalmente por fibroblastos e os dois últimos por células do sistema imune e células epiteliais, respectivamente (105). Recentemente, foi caracterizado o IFN - κ sendo produzido também em cultura de fibroblastos de embrião de galinha (106). Sabe-se que fibroblastos obtidos de embrião de galinha de 10 e 11 dd são capazes de produzir interferon *in vitro* frente a infecções virais por vírus do Sarcoma de Rous (107) e vírus da Doença de Newcastle (108), além de serem responsáveis pela inibição de vírus Chikungunya (109). É descrito na literatura a produção de interferon *ex vivo* pela membrana corioalantoica de embriões de galinha entre 10-11 dias de desenvolvimento após a infecção pelo vírus da Influenza (110).

No tocante específico à produção de citocinas por células musculares esqueléticas de galinha *in vitro*, já foi demonstrado que estas, em resposta à infecção pelo vírus da Influenza, produzem citocinas pro-inflamatórias, como o Fator

de Necrose Tumoral α (TNF - α ,) e o IFN - β (111), sugerindo que esta célula também poderia exercer alguma resposta antiviral frente à infecção por vírus da febre amarela, talvez também explicando, ao menos em parte, a resolução espontânea da infecção. Entretanto não há descrição na literatura sobre a produção *in vivo* de interferon por embriões infectados pelo vírus da febre amarela. Sabe-se apenas que uma resposta imune humoral não seria responsável por inibir a infecção, uma vez que estes embriões não produzem anticorpos neutralizantes quando inoculados com o vírus vacinal da FA, apenas quando partículas virais persistem no sangue destes animais após o nascimento, o que ocorre com a metade dos embriões, segundo Fox e Laemmert (103).

A literatura mostra que, nos momentos iniciais da infecção em embriões de galinha (até 96 hpi), em contraste com grande quantidade de células infectadas, poucas figuras de lesão celular associada à presença do vírus são observadas por Hematoxilina e Eosina *in vivo*. Dentre estas, há um discreto aumento de corpos apoptóticos presentes em diversos tecidos, inclusive no tecido muscular esquelético, em 72 e 96 hpi (61,62). No nosso trabalho, observamos figuras apoptóticas em 48 hpi em aspecto e intensidade semelhantes aos relatados por estes autores, e também em 120 hpi, coexistindo com desorganização das fibras musculares e com marcação para proteínas virais fraca e escassa. Esta desorganização do tecido muscular esquelético foi relatada em pacientes humanos, infectados por herpes zoster, tendo sido relacionada a uma provável decorrência de degeneração de fibras musculares (112). Com 144 hpi o tecido já está reorganizado na maioria das regiões, com poucos focos de desorganização, presença de debris e granulócitos, evoluindo para o reestabelecimento da organização com 168 e 216 hpi, o que coincide com a ausência da detecção de proteínas virais. Cabe ressaltar que não foi observada a presença de infiltrado inflamatório em nenhum dos pontos observados, apesar de ser descrita a presença de leucócitos e linfócitos em níveis significativos a partir do décimo dia de desenvolvimento de embriões de galinha (113).

No tocante à apoptose observada, não há como precisar se esta está associada ou não à infecção, visto que o processo apoptótico é fisiologicamente presente enquanto processo natural de crescimento e remodelamento tecidual durante a embriogênese. No entanto, observamos que este evento ocorre com mais frequência nos animais infectados do que nos controles, o que sugere que, ao menos em parte, algumas células estejam entrando em apoptose por conta da infecção.

Da mesma forma, *in vitro* também foi observada uma intensa infecção das células musculares com 48 hpi, embora com pouco efeito citopático associado, tendo sido perceptível a maior presença de corpos apoptóticos nas culturas infectadas. O aspecto morfológico destas culturas mostrava padrão heterogêneo, com áreas nas quais este fenômeno era mais intenso. Em 72 hpi, ao mesmo tempo em que observamos a diminuição do título viral, ocorre o aumento das figuras apoptóticas e deste efeito citopático, com comprometimento da viabilidade das células musculares infectadas. Essa tríade efeito citopático - presença de proteínas virais – título viral, que também foi observada nos embriões, sugere que a morte de células competentes e/ou a produção de fator(es) inibitório(s) inviabilize a persistência da infecção.

A competência de células musculares esqueléticas na produção de outros vírus também já foi relatada na literatura. Culturas primárias de células musculares esqueléticas humanas, de galinha e de patos, são susceptíveis e permissíveis à infecção pelo vírus da Influenza (111,114,115). Diferentemente do que observamos na infecção por febre amarela (17DD), onde inicialmente ocorre uma preferência da infecção em células pouco diferenciadas, a infecção por influenza *in vitro* ocorre preferencialmente em fibras musculares diferenciadas, enquanto mioblastos são resistentes à infecção (111,115). Em células musculares esqueléticas humanas foi observado por PFU um pico de produção do vírus da Influenza A em 48 hpi seguido de um decréscimo do título viral, provavelmente em consequência da morte celular (115), dado este que se assemelha a cinética de produção viral do nosso modelo.

Tecido muscular esquelético humano é susceptível *in vivo* à infecção pelo vírus Chikungunya que, assim como o vírus da febre amarela, é um arbovírus. Biópsias de músculo e culturas primárias de células musculares humanas revelaram que este vírus infecta preferencialmente células satélites. Heller e colaboradores, em seu trabalho, utilizaram a localização tecidual das células infectadas e a sua morfologia em cultura para determinar o estágio de diferenciação da célula muscular. No entanto, eles não realizaram marcação de Pax7 de forma a confirmar o tipo celular infectado (116).

A infecção *in vitro* de células satélites humanas também foi observada pelo vírus da Dengue, que pertence à mesma família e gênero do vírus da febre amarela (117). Esta cultura também produziu IFNs frente à infecção por Dengue, corroborando outros dados da literatura que analisaram a expressão de citocinas

pro-inflamatórias em resposta a infecções virais (107,109,111,117). Outro flavivirus onde a infecção de cultura primária de células musculares humanas também foi descrita é o vírus do Oeste do Nilo (118). Em conjunto, esses artigos apontam para a extensa susceptibilidade deste tipo celular à infecção por diversos vírus e reforçam a validade deste modelo para o estudo destas infecções em células musculares esqueléticas, envolvendo desde aspectos relacionados à patogênese, até mecanismos imunológicos.

Embora haja todos estes dados apontando para a susceptibilidade da célula muscular *in vitro* para outros vírus, é importante ressaltar que a cultura primária de células musculares esqueléticas não é uma cultura pura (85). Sabe-se que, no tecido muscular esquelético, além de células musculares, existem fibroblastos que estão compreendidos no tecido conjuntivo (63). Por conta disso, após a dissociação enzimática e mecânica do tecido, para o estabelecimento de culturas primárias, é muito difícil eliminar estes fibroblastos da cultura, o que torna o cultivo de células musculares esqueléticas uma cultura mista (85). Diferente da célula muscular, que tem seu potencial mitótico diminuído conforme o avançar do programa de diferenciação até que estas células sejam incapazes de se dividir (65), os fibroblastos não apresentam essa diminuição do seu potencial proliferativo, e ainda proliferam mais rapidamente do que mioblastos e precursores miogênicos, incluindo células satélites (119), o que justifica o aumento deste tipo celular conforme o avanço do tempo de cultivo. Neste trabalho, não foram feitas marcações que caracterizassem estes fibroblastos, mas é descrito na literatura que estes expressam Tcf4, logo este marcador poderia ser utilizado em trabalhos futuros para melhor caracterização das células presentes na cultura. Os fibroblastos também desempenham um papel importante na regeneração muscular *in vivo*, modulando a ativação das células satélites e atuando na secreção da matriz extracelular (120–122) e, *in vitro*, estas células atuam na miogênese estimulando a proliferação de células miogênicas e influenciando a formação de fibras musculares (123).

Tendo então por base de um lado a infecção preferencial de células musculares de embriões de galinha frente à presença do vírus FA 17DD, e de outro a utilização de cultivo de células musculares para produção de outros vírus *in vitro*, nos propomos então, pela primeira vez, a realizar infecção experimental de cultivo primário de células musculares de embrião de galinha com vírus vacinal da febre amarela 17DD. No entanto, em se tratando de um ensaio inédito, foi necessário criar um delineamento experimental original. Em um primeiro momento, arbitramos uma

MOI de 0,1 e estudamos culturas infectadas e controles após 24, 48 e 72 hpi. Além disso, por não sabermos *a priori* se o ideal seria infectar as células antes do plaqueamento ou após um determinado tempo de estabelecimento da cultura, infectamos no momento do plaqueamento (T0), além de 5 (T5) e 24 (T24) hpp. Cada um destes momentos reflete um aspecto distinto do tecido muscular encontrado nos embriões, e as células estariam em contato com as partículas virais em diferentes condições e/ou fases de diferenciação da célula muscular. No primeiro momento de infecção (T0), os precursores miogênicos e mioblastos oriundos do tecido embrionário foram expostos ao vírus da febre amarela 17DD ainda em suspensão (90), ou seja, estas células acabaram de ser isoladas do embrião e ainda não aderiram ao substrato da cultura, o que significa que possuem pouca ou nenhuma influência da adaptação ao sistema durante o início da infecção. No segundo momento de infecção (T5), estes precursores e mioblastos recém-isolados já estão aderidos ao substrato no momento da exposição ao vírus (90), o que, de certa forma, se aproxima do que é encontrado *in vivo*, visto que estas células são naturalmente aderentes. No terceiro momento (T24), as células estão se alinhando e fusionando na cultura (91), o que também reflete uma característica encontrada *in vivo*, visto que estes embriões estão em desenvolvimento, portanto suas células musculares estão em constante processo de fusão; porém, neste momento a cultura, possui uma disponibilidade menor de células pouco diferenciadas, uma vez que grande parte delas já saiu do ciclo celular e entrou no programa miogênico (65).

Em todos os momentos de infecção (T0, T5 e T24), foram observados já em 24 hpi, precursores miogênicos e mioblastos infectados. Chamou, no entanto, a atenção a baixa proporção de precursores miogênicos (Pax7⁺) infectados frente à população de células Pax7⁺ total, o que contrasta com uma maior quantidade de mioblastos infectados. É possível que os mioblastos positivos para proteínas virais no momento da análise tenham sido infectados quando ainda eram precursores miogênicos. A cultura infectada no momento do plaqueamento (T0), ao menos em tese, teria mais precursores miogênicos em comparação com as demais condições de infecção (T5 e T24), o que explicaria, ao menos em parte, o maior título viral produzido nesta condição. Não obstante, cabe lembrar que, por restrição metodológica, as culturas infectadas em T0 permaneceram por mais tempo em contato com o inóculo viral. Isso se deve ao fato de não ser possível retirar o inóculo viral nas primeiras cinco horas após o plaqueamento, período durante o qual as células estão realizando adesão ao substrato. Apesar dessa diferença no método de

infecção e no título viral, morfológicamente essas culturas foram bem semelhantes entre si, com uma aparente manutenção no índice de infecção. Embora nossos dados sugiram uma infecção preferencial em precursores miogênicos, não está claro quais seriam os motivos para tal preferência; na literatura, há exemplos de cultivos *in vitro* infectados com diferentes vírus que mostram diferentes padrões, tanto mais voltados a células imaturas (chikungunya e dengue) quanto a mais diferenciadas (vírus da influenza) (109,111,117).

Nestas culturas, é possível perceber um padrão de produção viral: com 24 hpi, é observada uma produção inicial que aumenta com 48 hpi, quando chega ao ápice da produção *in vitro*, e reduz após 72 hpi. Freire e colaboradores descreveram um método eficiente de produção de vírus FA 17DD em cultura primária de fibroblasto embrionário de galinha, onde eles também observaram um pico de produção em 48 hpi (54). O momento de infecção utilizado por estes autores foi 24 horas após o plaqueamento, que seria equivalente ao T24 deste trabalho. Apesar de se tratarem de dois tipos celulares distintos, o pico de produção viral em 48 hpi se repete em ambas as culturas, nos permitindo inferir que, de certa forma, o vírus mantém suas características biológicas entre os modelos.

Cabe ressaltar que a cultura primária de células musculares esqueléticas não é sincronizada, ou seja, no momento do estabelecimento da cultura, as células semeadas são heterogêneas e em diferentes estágios de diferenciação. Nesse sentido, é possível observar, por exemplo, a formação precoce de fibras musculares já com 24 hpp, provavelmente decorrente de células musculares mais diferenciadas, coabitando com células imaturas. Entretanto, mesmo onde já havia fibras formadas, estas raramente foram encontradas infectadas, o que só foi observado a partir de tempos posteriores (48 hpi), corroborando tanto os dados observados *in vivo* (62), como a hipótese de que células pouco diferenciadas teriam um papel importante no estabelecimento da infecção. Essa diferença de estágios de diferenciação poderia estar influenciando na susceptibilidade da infecção.

Nesse sentido, para verificar se os progenitores miogênicos e mioblastos seriam essenciais para o estabelecimento da infecção *in vitro*, infectamos uma cultura composta por fibroblastos e fibras musculares diferenciadas e maduras. A infecção realizada com o inóculo na MOI de 0,1 foi bem-sucedida nestas condições, onde observamos fibras bastante espessas infectadas. O conjunto dos resultados aqui apresentados e discutidos sugere que todos os estágios de diferenciação de

células musculares são susceptíveis à infecção, embora esta inicie-se preferencialmente em células pouco diferenciadas.

Mesmo frente ao sucesso da infecção, chamou atenção o baixo índice de infecção nos diferentes momentos de inoculação testados. Uma hipótese para explicar este achado estaria relacionada ao método de obtenção de partículas virais utilizadas para infectar a cultura. Uma vez que o inóculo possuía moléculas oriundas de embriões infectados, talvez a presença destas moléculas seja responsável, ao menos em parte, pelo baixo índice de infecção *in vitro*. Uma possibilidade é a já mencionada produção de interferons, a qual, no entanto, ainda não foi descrita em embriões infectados pelo vírus FA17DD.

Sendo assim, testamos concentrações menores do inóculo no intuito de balancear a quantidade de vírus disponível e a de moléculas inibidoras da infecção. A infecção feita no momento do plaqueamento (T0) foi então escolhida para dar seguimento aos experimentos das diferentes MOIs. A MOI de 0,1 foi mantida como parâmetro de comparação, e inóculos 10x e 50x mais diluídos foram testados, sendo eles MOI de 0,01 e 0,002, respectivamente. Esta última MOI foi a concentração do inóculo utilizado por Freire e colaboradores na tentativa de desenvolvimento da vacina produzida em cultura primária de fibroblasto de embrião de galinha, no qual foi obtido um alto título viral (54). Comprovando a hipótese inicial, a produção viral *in vitro* foi inversamente proporcional à concentração do inóculo. Conforme a concentração do inóculo foi reduzida, foi observado um aumento do título viral, chegando ao ápice de produção nas culturas infectadas com a MOI de 0,002. O padrão de produção viral observado no experimento dos momentos de infecção se repetiu, começando com uma produção basal em 24 hpi, alcançando o pico de produção em 48 hpi e decaindo o título em 72 hpi.

Os dados morfológicos encontrados corroboram os títulos obtidos por PFU e reforçam a hipótese de que talvez moléculas inibidoras provenientes do embrião estivessem interferindo na infecção *in vitro*, protegendo as células. Em 72 hpi foi observado um maior efeito citopático, especialmente na MOI de 0,002. Talvez este evento tenha ocorrido pela extensa infecção das células musculares. Outra possibilidade seria a produção endógena de citocinas inibidoras da produção viral pelos fibroblastos presentes nessa cultura, visto que esse tipo celular é capaz de produzir estas moléculas *in vitro* frente a infecções virais (105) e que a produção destas citocinas em cultura de células musculares esqueléticas já foi descrita para outros vírus (109,111), inclusive Flavivirus (117). A presença de interferon, endógeno

ou exógeno, somada à morte celular poderia ser responsável pelo decaimento do título viral em 72 hpi.

Para verificar se as partículas virais produzidas em cultura primária de células musculares esqueléticas de embrião de galinha poderiam reinfectar estas células, foi realizado um experimento onde vírus existentes no sobrenadante de uma cultura infectada (#1) foram utilizados como inóculo para infectar uma nova cultura. Esse experimento foi feito com a MOI de 0,01 onde foi comprovada a capacidade destes vírus em infectarem novas células *in vitro* (#1). Portanto, como ainda há células musculares disponíveis em 72 hpi em algumas condições de cultura, apesar da diminuição do título, talvez houvesse um novo pico de produção em 96 hpi, considerando que estas células serão infectadas e passarão então a produzir novas partículas virais.

A ratificação da susceptibilidade e permissividade das células pela detecção do RNA genômico e do intermediário replicativo das culturas infectadas em T0 com diferentes MOIs e com o vírus #1, sustenta os dados obtidos pelas técnicas de imunofluorescência e PFU. A não detecção de material genético em 24 hpi da cultura infectada com a MOI de 0,002 corrobora o baixo título viral obtido por PFU. Apesar do material utilizado para realização de cada técnica ser diferente, sobrenadante para o PFU e extrato de células para a PCR, a baixa concentração de partículas virais infecciosas junto à ausência de detecção de RNAs virais e a escassez de células infectadas observadas pela microscopia, são condizentes entre si. Em 48 hpi, ao mesmo tempo em que ocorre o pico da produção viral, foi detectado o RNA genômico e o intermediário replicativo em todas as MOIs, inclusive nas culturas infectadas com o vírus #1. Em 72 hpi, quando o título viral começa a decair e as células infectadas na cultura também são pouco observadas, o intermediário replicativo não é detectado nas MOIs de 0,1 e 0,01, sugerindo que, de fato, a infecção está se esgotando. Na MOI de 0,01, apesar do título viral da cultura infectada com o vírus #1 ser ligeiramente menor do que o título da cultura infectada com o vírus #0 em 72 hpi, a primeira amostra (#1) ainda possui o intermediário replicativo em níveis detectáveis, diferente da segunda amostra (#0), o que demonstra, ainda que de forma preliminar, que o período da replicação viral persiste nas culturas que foram inoculadas com o vírus obtidos *in vitro*. Estudos futuros referentes à caracterização destas partículas virais produzidas pela cultura de células são necessários para elucidar se ocorre alguma modificação na passagem do vírus FA17DD em cultura primária de células musculares de embrião de galinha.

Em conjunto, os dados encontrados no desenvolvimento deste trabalho contribuem para o entendimento da infecção de FA17DD em ovos embrionados de galinha e nos levam à perspectiva de desenvolvimento de um método alternativo de produção da vacina, baseado em modelo de cultura de células, o que vem sendo proposto e buscado por diferentes grupos (53–56). Entretanto, é preciso aprofundar os estudos referentes à infecção *in vitro* de células musculares, no intuito de comprovar a viabilidade de utilização deste sistema para produção em maior escala, bem como caracterizar as partículas virais produzidas por este novo sistema.

A produção de vírus vacinais atenuados em cultura de células musculares esqueléticas de embriões de galinha seria um modelo de produção que se aproxima mais do que ocorre *in vivo*, se tornando então uma potencial plataforma para o desenvolvimento de um método alternativo que mantenha a eficiência da vacina produzida em ovos embrionados, porém com menos proteínas de galinha/dose. Além disso, um alto título viral neste sistema tornaria a produção mais eficaz, resultando na utilização de menos embriões, como já foi observado por Freire e colaboradores (54). Estes autores utilizaram culturas de fibroblastos de embrião de galinha como plataforma de produção, mas o teste deste candidato vacinal em macacos Rhesus mostrou um aumento do neurotropismo em comparação ao 17DD produzido em ovos embrionados, o que resultou na descontinuação do trabalho. Os autores sugeriram que o substrato de crescimento poderia ter selecionado um determinado grupo de 17DD mais neurovirulento (54).

Como em embriões de galinha o tecido muscular esquelético é o mais infectado e o principal responsável pela biossíntese de partículas virais (61,103), há uma possibilidade de que a produção em cultura de células musculares de embriões de galinha reproduza melhor o fenótipo encontrado na vacina. O estabelecimento de um processo de produção mais eficiente permitiria uma economia da utilização do lote semente e possibilitaria a produção da vacina em escala suficiente para atender a demanda de vacinação em áreas onde a doença é endêmica.

6 CONCLUSÕES

- A análise histopatológica de embriões infectados aos 9 dd, revela a produção de vírus por células musculares Pax7⁺ após 48 hpi;
- A mesma abordagem demonstra o esgotamento da infecção em 120 hpi, associado a uma desorganização do tecido muscular.
- Células musculares esqueléticas provenientes de embriões de galinha com 11 dias de desenvolvimento são susceptíveis e permissíveis à infecção *in vitro* pelo vírus da febre amarela 17DD;
- Embora células musculares em todas as fases de diferenciação tenham sido encontradas expressando proteínas virais, precursores miogênicos (Pax7⁺) e mioblastos são alvos preferenciais da infecção;
- Células musculares esqueléticas são preferencialmente infectadas, apesar da presença de muitos fibroblastos *in vitro*. Estes fibroblastos apresentam infecção apenas em condições de extensa replicação viral;
- Em todas as condições testadas, a produção viral *in vitro* alcança o seu ápice após 48 hpi e decai após 72 hpi;
- Os vírus produzidos pelas células musculares *in vitro* são capazes de infectar novas culturas;

Perspectiva: O modelo de cultura de células musculares esqueléticas parece reproduzir o padrão de infecção observado *in vivo*, sugerindo que este seja um bom modelo para o estudo da infecção pelo vírus da febre amarela e potencial modelo para desenvolvimento de um candidato vacinal.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barrett AD, Teuwen DE, abarrett AD, Poland G, Barrett A. Yellow fever vaccine — how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? *Curr Opin Immunol*. 2009;21:308–13.
2. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. Nature Publishing Group; janeiro de 2005;3(1):13–22.
3. Fernandez-Garcia M-D, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host Microbe*. 23 de abril de 2009;5(4):318–28.
4. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*. Nature Publishing Group; dezembro de 2010;8(12):S7–16.
5. Lindenbach B, Rice C, Thiel H, Chanock R, Lindenbach BD, Thiel HJ, et al. *Flaviviridae: The viruses and their replication*. 2007.
6. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and their antigenic structure. *J Clin Virol*. dezembro de 2012;55(4):289–95.
7. Perera-Lecoin M, Meertens L, Carnec X, Amara A. Flavivirus Entry Receptors: An Update. *Viruses*. 2014;6:69–88.
8. Smit JM, Moesker B, Rodenhuis-Zybert I, Wilschut J. Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. *Viruses*. 2011;3:160–71.
9. Kaufmann B, Rossmann MG. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes Infect*. 2011;1(13):1–9.
10. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus Genome Organization, Expression, and Replication. *Annu Rev Microbiol*. outubro de 1990;44(1):649–88.
11. Rastogi M, Sharma N, Singh SK. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virol J*. 2016;13:131.
12. Leung JY, Pijlman GP, Kondratieva N, Hyde J, Mackenzie JM, Khromykh AA. Role of Nonstructural Protein NS2A in Flavivirus Assembly. *J Virol*. 15 de maio de 2008;82(10):4731–41.
13. Natarajan S. NS3 protease from flavivirus as a target for designing antiviral inhibitors against dengue virus. *Genet Mol Biol*. 2010;33(2):214–9.

14. Fernando P, Vasconcelos DC. Febre amarela. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(2):275–93.
15. Quaresma JAS, Pagliari C, Medeiros DBA, Duarte MIS, Vasconcelos PFC. Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. *Rev Med Virol.* setembro de 2013;23(5):305–18.
16. Centers for Disease Control and Prevention. Vaccine Information Statement | Yellow Fever | VIS | CDC [Internet]. 2011 [citado 15 de março de 2017]. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/vaccines/hcp/vis/vis-statements/yf.html>
17. Kitchener S. Viscerotropic and neurotropic disease following vaccination with the 17D yellow fever vaccine, ARILVAX®. *Vaccine.* 2 de junho de 2004;22(17–18):2103–5.
18. Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis.* agosto de 2001;1(1):11–20.
19. Vieira WT, Gayotto LC, de Lima CP, de Brito T. Histopathology of the human liver in yellow fever with special emphasis on the diagnostic role of the Councilman body. *Histopathology.* março de 1983;7(2):195–208.
20. Ross MH WP. *Histologia – Atlas e Texto – em Correlação com Biologia Celular e Molecular* by GUANABARA KOOGAN - issuu. 7º. Guanabara Koogan; 2016.
21. Gardner CL, Ryman KD. Yellow Fever: A Reemerging Threat. *Clin Lab Med.* março de 2010;30(1):237–60.
22. Paulo P, Manso DEA. Estudo histopatológico e molecular de embriões de *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus , 1758) infectados com o vírus da Febre Amarela 17DD . Estudo histopatológico e molecular de embriões de *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus , 1758) infectados com o v. Instituto Oswaldo Cruz; 2014.
23. Staples JE, Monath TP. Yellow Fever: 100 Years of Discovery. *JAMA.* 27 de agosto de 2008;300(8):960.
24. Barrett ADT, Higgs S. Yellow Fever: A Disease that Has Yet to be Conquered. *Annu Rev Entomol.* 2007;52:209–29.
25. Post PR, Carvalho R de, Freire M da S, Galler R. The early use of yellow fever virus strain 17D for vaccine production in Brazil - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Fundação Oswaldo Cruz; agosto de 2001;96(6):849–57.
26. Organização Mundial da Saúde. Yellow fever [Internet]. WHO. World Health Organization; 2016 [citado 16 de janeiro de 2017]. Recuperado de:

- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>
27. Robertson SE, Hull BP, Tomori O, Bele O, LeDuc JW, Esteves K. Yellow fever: a decade of reemergence. *JAMA*. 9 de outubro de 1996;276(14):1157–62.
 28. Barnett ED. Yellow fever: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis*. Oxford University Press; 15 de março de 2007;44(6):850–6.
 29. Yellow Fever Maps | Yellow Fever | CDC [Internet]. [citado 31 de março de 2017]. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/yellowfever/maps/>
 30. Monath TP, Cetron MS. Prevention of yellow fever in persons traveling to the tropics. *Clin Infect Dis*. Oxford University Press; 15 de maio de 2002;34(10):1369–78.
 31. Reiter P. Climate Change and Mosquito-Borne Disease. *Environ Health Perspect*. 2001;142(1).
 32. WHO. Weekly epidemiological record. Vol. 88. 2013.
 33. Transmission | Yellow Fever | CDC [Internet]. August 13, 2015. 2015 [citado 17 de janeiro de 2017]. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/yellowfever/transmission/>
 34. Frieden TR, Director Harold Jaffe MW, Stephens JW, Thacker SB, Casey CG, LaPete Stephen R Spriggs Terraye M Starr MA, et al. Yellow Fever Vaccine Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR*. 2010;59.
 35. Rodhain F. The role of monkeys in the biology of dengue and yellow fever. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. janeiro de 1991;14(1):9–19.
 36. WHO | Yellow fever [Internet]. WHO. World Health Organization; [citado 17 de janeiro de 2017]. Recuperado de: http://www.who.int/csr/don/archive/disease/yellow_fever/en/
 37. WHO | Yellow fever – Brazil. WHO. World Health Organization; 2017;
 38. WHO | Situation Report Yellow Fever [Internet]. WHO. [citado 17 de janeiro de 2017]. Recuperado de: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250661/1/yellowfeversitrep28Oct16-eng.pdf>
 39. WHO | Yellow fever – Brazil [Internet]. WHO. World Health Organization; 2017 [citado 17 de janeiro de 2017]. Recuperado de: <http://www.who.int/csr/don/13-january-2017-yellow-fever-brazil/en/>
 40. Brasil M da S. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde COES – Febre Amarela. 2017.

41. Brasil. Situação Epidemiológica / Dados [Internet]. 2017 [citado 13 de abril de 2017]. Recuperado de: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-febre-amarela>
42. Bonaldo MC, Gómez MM, Ac A, Santos D, Vieira F, De Abreu S, et al. Genome analysis of yellow fever virus of the ongoing outbreak in Brazil reveals polymorphisms. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio Janeiro*. 2017;112(6):447–51.
43. Frierson JG. The Yellow Fever Vaccine: A History. *YALE J Biol Med*. 2010;83:77–85.
44. STOKES A, BAUER JH, HUDSON NP. THE TRANSMISSION OF YELLOW FEVER TO MACACUS RHESUS. *J Am Med Assoc*. 28 de janeiro de 1928;90(4):253.
45. Lloyd W, Theiler M, Ricci N. Modification of the virulence of yellow fever virus by cultivation in tissues in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. fevereiro de 1936;29(5):481–529.
46. Theiler M. Studies on the Action of Yellow Fever Virus in Mice. *Ann Trop Med Parasitol*. 8 de julho de 1930;24(2):249–72.
47. Haagen E, Theiler M. Studies of Yellow Fever Virus in Tissue Culture. *Exp Biol Med*. 1 de janeiro de 1932;29(4):435–6.
48. Monath TP. Yellow fever vaccine. *Expert Rev Vaccines*. 9 de agosto de 2005;4(4):553–74.
49. Benchimol JL, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. Febre amarela : a doença e a vacina, uma história inacabada. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos; 2001. 237-273 p.
50. Hahn CS, Dalrymple JM, Strauss JH, Rice CM. Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. *Med Sci*. 1987;84:2019–23.
51. Who. Vaccines and vaccination against yellow fever: WHO Position Paper, June 2013—Recommendations. *Vaccine*. 2015;33:76–7.
52. Brasil. Nota Informativa N° 94 do Ministério da Saúde [Internet]. 2017 [citado 24 de junho de 2017]. Recuperado de: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/13/Nota-Informativa-94-com-acordo.pdf>
53. Gaspar LP, Mendes YS, Yamamura AMY, Almeida LFC, Caride E, Gonçalves RB, et al. Pressure-inactivated yellow fever 17DD virus: Implications for vaccine development. *J Virol Methods*. 2008;150(1):57–62.

54. Freire MS, Mann GF, Marchevsky RS, Yamamura AM, Almeida LF, Jabor A V, et al. Production of yellow fever 17DD vaccine virus in primary culture of chicken embryo fibroblasts: yields, thermo and genetic stability, attenuation and immunogenicity. *Vaccine*. 2005;23:2501–12.
55. Monath TP, Fowler E, Johnson CT, Balser J, Morin MJ, Sisti M, et al. An Inactivated Cell-Culture Vaccine against Yellow Fever. *N Engl J Med*. 7 de abril de 2011;364(14):1326–33.
56. Pereira RC, Silva ANMR, Souza MCO, Silva M V., Neves PPCC, Silva AAMV, et al. An inactivated yellow fever 17DD vaccine cultivated in Vero cell cultures. *Vaccine*. agosto de 2015;33(35):4261–8.
57. Rutkowski K, Ewan PW, Nasser SM. Administration of Yellow Fever Vaccine in Patients with Egg Allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;161(3):274–8.
58. Capeding MR, Tran NH, Hadinegoro SRS, Ismail HIHM, Chotpitayasunondh T, Chua MN, et al. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet*. 11 de outubro de 2014;384(9951):1358–65.
59. Guirakhoo F, Weltzin R, Chambers TJ, Zhang ZX, Soike K, Ratterree M, et al. Recombinant chimeric yellow fever-dengue type 2 virus is immunogenic and protective in nonhuman primates. *J Virol*. junho de 2000;74(12):5477–85.
60. Guirakhoo F, Arroyo J, Pugachev K V, Miller C, Zhang ZX, Weltzin R, et al. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. *J Virol*. American Society for Microbiology; agosto de 2001;75(16):7290–304.
61. Manso PP de A, Dias de Oliveira BCEP, Sequeira PC de, Maia de Souza YR, Ferro JM dos S, da Silva IJ, et al. Yellow Fever 17DD Vaccine Virus Infection Causes Detectable Changes in Chicken Embryos. Rico-Hesse R, organizador. *PLoS Negl Trop Dis*. Public Library of Science; 15 de setembro de 2015;9(9):e0004064.
62. Manso PP de A, E. P. Dias de Oliveira BC, Carvalho de Sequeira P, Rodrigues Maia de Souza Y, dos Santos Ferro JM, da Silva IJ, et al. Kinetic Study of Yellow Fever 17DD Viral Infection in *Gallus gallus domesticus* Embryos. Freiberg AN, organizador. *PLoS One*. Public Library of Science; 9 de maio de 2016;11(5):e0155041.
63. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 10^o edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro; 2004. 472 p.

64. LaPress J. *The Muscular System—Skeletal Muscle Tissue and Organization*. Houston: Pearson Benjamin Cummings; 2009.
65. Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building Muscle: Molecular Regulation of Myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1 de fevereiro de 2012;4(2):a008342–a008342.
66. Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature*. 16 de junho de 2005;435(7044):948–53.
67. Kassam-Duchossoy L, Giaccone E, Gayraud-Morel B, Jory A, Gomès D, Tajbakhsh S. Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev*. 15 de junho de 2005;19(12):1426–31.
68. Mok GF, Mohammed RH, Sweetman D. Expression of myogenic regulatory factors in chicken embryos during somite and limb development. *J Anat*. setembro de 2015;227(3):352–60.
69. Sweetman D. The Myogenic Regulatory Factors: Critical Determinants of Muscle Identity in Development, Growth and Regeneration. In: *Skeletal Muscle - From Myogenesis to Clinical Relations*. InTech; 2012.
70. Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, Krause M, Benezra R, et al. The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science*. 15 de fevereiro de 1991;251(4995):761–6.
71. Ott MO, Bober E, Lyons G, Arnold H, Buckingham M. Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development*. abril de 1991;111(4):1097–107.
72. Buckingham M. Making muscle in mammals. *Trends Genet*. abril de 1992;8(4):144–9.
73. Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP. Myogenic Regulatory Factors and the Specification of Muscle Progenitors in Vertebrate Embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol*. novembro de 2002;18(1):747–83.
74. Hutcheson DA, Zhao J, Merrell A, Haldar M, Kardon G. Embryonic and fetal limb myogenic cells are derived from developmentally distinct progenitors and have different requirements for beta-catenin. *Genes Dev*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 15 de abril de 2009;23(8):997–1013.
75. Li Z, Mericskay M, Agbulut O, Butler-Browne G, Carlsson L, Thornell L-E, et al. Desmin Is Essential for the Tensile Strength and Integrity of Myofibrils but Not for Myogenic Commitment, Differentiation, and Fusion of Skeletal Muscle. *J*

- Cell Biol. 1997;139(1).
76. Lin Z, Lu M-H, Schultheiss T, Choi J, Holtzer S, Dilullo C, et al. Sequential appearance of muscle-specific proteins in myoblasts as a function of time after cell division: Evidence for a conserved myoblast differentiation program in skeletal muscle. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1994;29(1):1–19.
 77. Li H, Capetanaki Y. Regulation of the mouse desmin gene: transactivated by MyoD, myogenin, MRF4 and Myf5. *Nucleic Acids Res. Oxford University Press*; 25 de janeiro de 1993;21(2):335–43.
 78. PAULIN D, LI Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp Cell Res*. 15 de novembro de 2004;301(1):1–7.
 79. Bloemink MJ, Melkani GC, Bernstein SI, Geeves MA. The Relay/Converter Interface Influences Hydrolysis of ATP by Skeletal Muscle Myosin II. *J Biol Chem*. 22 de janeiro de 2016;291(4):1763–73.
 80. Hooper SL. Invertebrate Muscles: Muscle Specific Genes and Proteins. *Physiol Rev*. 1 de julho de 2005;85(3):1001–60.
 81. Braun T, Gautel M. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol. Nature Publishing Group*; junho de 2011;12(6):349–61.
 82. Inestrosa NC. Differentiation of Skeletal Muscle Cells in Culture. *CELL Struct Funct*. 1982;7:91–109.
 83. *Skeletal Muscle Repair and Regeneration*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2008. (Advances in Muscle Research; vol. 3).
 84. Lewis WH, Lewis MR. Behavior of cross striated muscle in tissue cultures. *Am J Anat*. setembro de 1917;22(2):169–94.
 85. Konigsberg IR. Clonal Analysis of Myogenesis: Its relevance to the general problem of the stability of cell-type in cultured animal cells is discussed. *Science (80-)*. 21 de junho de 1963;140(3573):1273–84.
 86. Konigsberg IR. The Culture Environment and Its Control of Myogenesis. In: *Regulation of Cell Proliferation and Differentiation*. Boston, MA: Springer US; 1977. p. 105–37.
 87. Konigsberg IR, Sollmann PA, Mixer LO. The duration of the terminal G1 of fusing myoblasts. *Dev Biol*. março de 1978;63(1):11–26.
 88. De G, Haba L, Amundsen R. The Contribution of Embryo Extract to Myogenesis of Avian Striated Muscle In Vitro. 1972;69(5):1131–5.

89. Costa ML, Escaleira R, Cataldo A, Oliveira F, Mermelstein CS. Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein. *Brazilian J Med Biol Res. Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; dezembro de 2004;37(12):1819–30.
90. Shimada Y. ELECTRON MICROSCOPE OBSERVATIONS ON THE FUSION OF CHICK MYOBLASTS IN VITRO. *J Cell Biol.* 1 de janeiro de 1971;48(1):128–42.
91. Wakelam MJ. The fusion of myoblasts. *Biochem J. Portland Press Ltd*; 15 de maio de 1985;228(1):1–12.
92. O'Neill MC. A KINETIC ANALYSIS OF MYOGENESIS IN VITRO. *J Cell Biol.* 1 de janeiro de 1972;52(1):52–65.
93. Pastorino B, Nougairède A, Wurtz N, Gould E, de Lamballerie X. Role of host cell factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. *Antiviral Res.* 2010;87(3):281–94.
94. Khromava AY, Eidex RB, Weld LH, Kohl KS, Bradshaw RD, Chen RT, et al. Yellow fever vaccine: An updated assessment of advanced age as a risk factor for serious adverse events The Yellow Fever Vaccine Safety Working Group 1. *Vaccine.* 2005;23(23):3256–63.
95. 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;28:632–49.
96. 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. *Virol J.* 2011;8:127.
97. Bonaldo MC, Sequeira PC, Galler R. The yellow fever 17D virus as a platform for new live attenuated vaccines. *Hum Vaccin Immunother. Taylor & Francis*; 8 de maio de 2014;10(5):1256–65.
98. Tanaka M. Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* março de 1993;41(3):311–22.
99. Le Grand F, Rudnicki MA. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* dezembro de 2007;19(6):628–33.
100. Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells. *Cell.*

- setembro de 2000;102(6):777–86.
101. Zammit PS, Relaix F, Nagata Y, Ruiz AP, Collins CA, Partridge TA, et al. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci.* 1 de maio de 2006;119(9):1824–32.
 102. Stockdale FE. Myogenic cell lineages. *Dev Biol.* dezembro de 1992;154(2):284–98.
 103. FOX JP, LAEMMERT HW. The cultivation of yellow fever virus; observations on the infection of developing chick embryos. *Am J Hyg.* julho de 1947;46(1):21–40.
 104. Vasconcelos PFC. Yellow Fever. In: *Arthropod Borne Diseases.* Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 101–13.
 105. Santhakumar D, Rubbenstroth D, Martinez-Sobrido L, Munir M. Avian Interferons and Their Antiviral Effectors. *Front Immunol. Frontiers;* 31 de janeiro de 2017;8:49.
 106. Santhakumar D, Iqbal M, Nair V, Munir M. Chicken IFN Kappa: A Novel Cytokine with Antiviral Activities. *Sci Rep. Nature Publishing Group;* 2 de junho de 2017;7(1):2719.
 107. Bader JP. Production of interferon by chick embryo cells exposed to Rous sarcoma virus. *Virology.* abril de 1962;16(4):436–43.
 108. Heller ED, Levy AM, Vaiman R, Schwartzburd B. Chicken-embryo fibroblasts produce two types of interferon upon stimulation with Newcastle disease virus. *Vet Immunol Immunopathol.* julho de 1997;57(3–4):289–303.
 109. Heller E. Enhancement of Chikungunya virus replication and inhibition of interferon production by actinomycin D. *Virology.* dezembro de 1963;21(4):652–6.
 110. Isaacs A, Lindenmann J. Virus Interference. I. The Interferon. *Proc R Soc London B Biol Sci.* 1957;147(927).
 111. Baquero-Perez B, Kuchipudi S V, Ho J, Sebastian S, Puranik A, Howard W, et al. Chicken and duck myotubes are highly susceptible and permissive to influenza virus infection. *J Virol. American Society for Microbiology;* 1 de março de 2015;89(5):2494–506.
 112. Åström E, Friman G, Pilström L. EFFECTS OF VIRAL AND MYCOPLASMA INFECTIONS ON ULTRASTRUCTURE AND ENZYME ACTIVITIES IN HUMAN SKELETAL MUSCLE. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect A Pathol.* Blackwell Publishing Ltd; 15 de agosto de 2009;84A(2):113–22.

113. Seto F. Early development of the avian immune system. *Poult Sci.* setembro de 1981;60(9):1981–95.
114. Armstrong CL, Miranda AF, Hsu KC, Gamboa ET. Susceptibility of human skeletal muscle culture to influenza virus infection. I. Cytopathology and immunofluorescence. *J Neurol Sci.* janeiro de 1978;35(1):43–57.
115. Desdouits M, Munier S, Prevost M-C, Jeannin P, Butler-Browne G, Ozden S, et al. Productive Infection of Human Skeletal Muscle Cells by Pandemic and Seasonal Influenza A(H1N1) Viruses. Digard P, organizador. *PLoS One. Public Library of Science*; 5 de novembro de 2013;8(11):e79628.
116. Ozden S, Huerre M, Riviere J-P, Coffey LL, Afonso P V., Mouly V, et al. Human Muscle Satellite Cells as Targets of Chikungunya Virus Infection. Zhang L, organizador. *PLoS One. Appleton & Lange*; 13 de junho de 2007;2(6):e527.
117. Warke R V., Becerra A, Zawadzka A, Schmidt DJ, Martin KJ, Giaya K, et al. Efficient dengue virus (DENV) infection of human muscle satellite cells upregulates type I interferon response genes and differentially modulates MHC I expression on bystander and DENV-infected cells. *J Gen Virol. Microbiology Society*; 1 de julho de 2008;89(7):1605–15.
118. Bao S, King NJC, Dos Remedios CG. Flavivirus induces MHC antigen on human myoblasts: A model of autoimmune myositis? *Muscle Nerve. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company*; 1 de novembro de 1992;15(11):1271–7.
119. Syverud BC, Lee JD, VanDusen KW, Larkin LM. Isolation and Purification of Satellite Cells for Skeletal Muscle Tissue Engineering. *J Regen Med. NIH Public Access*; 2014;3(2).
120. Thomas K, Engler AJ, Meyer GA. Extracellular matrix regulation in the muscle satellite cell niche. *Connect Tissue Res. NIH Public Access*; fevereiro de 2015;56(1):1–8.
121. Mathew SJ, Hansen JM, Merrell AJ, Murphy MM, Lawson JA, Hutcheson DA, et al. Connective tissue fibroblasts and Tcf4 regulate myogenesis. *Development.* 15 de janeiro de 2011;138(2):371–84.
122. Murphy MM, Lawson JA, Mathew SJ, Hutcheson DA, Kardon G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development. Company of Biologists*; setembro de 2011;138(17):3625–37.
123. Mackey AL, Magnan M, Chazaud B, Kjaer M. Human skeletal muscle

fibroblasts stimulate in vitro myogenesis and in vivo muscle regeneration. J
Physiol. 23 de maio de 2017;