

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*Raquel Tayar Nogueira*

Desenvolvimento e caracterização biológica e imunológica de vírus amarílicos recombinantes expressando antígenos da proteína ASP-2 de amastigotas de *Trypanosoma cruzi*

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

**Orientadora:** Prof. Dr<sup>a</sup>. Myrna Cristina Bonaldo

**RIO DE JANEIRO**

2011

N778

Nogueira, Raquel Tayar

Desenvolvimento e caracterização biológica e imunológica de vírus amarílicos recombinantes expressando antígenos da proteína ASP-2 de amastigotas de *Trypanosoma cruzi* / Raquel Tayar Nogueira. – Rio de Janeiro, 2011.

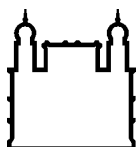
xxiii, 205 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular , 2011.

Bibliografia: f. 159-188

1. Flavivírus. 2. Recombinante FA 17D. 3. Febre amarela. 4. Doença de Chagas. 5. Vacina. 6. Vacinas virais recombinantes. I. Título.

CDD 616.6185



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*Raquel Tayar Nogueira*

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DE  
VÍRUS AMARÍLICOS RECOMBINANTES EXPRESSANDO ANTÍGENOS DA  
PROTEÍNA ASP-2 DE AMASTIGOTAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

**ORIENTADORA: Prof. Dr<sup>a</sup>. Myrna Cristina Bonaldo**

**Aprovada em: 28 / 02 / 2011**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Ada Maria de Barcelos Alves - Presidente**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Luzia Maria de Oliveira Pinto**

**Prof. Dr. Maurício Martins Rodrigues**

Dedico este trabalho a minha mãe Silvia e ao meu marido Sergio, que tanto me apoiaram no desenvolvimento desta tese e em especial, ao meu futuro bebê que já me acompanha serenamente durante o desfecho desta tese.

## AGRADECIMENTOS

---

À Dr<sup>a</sup>. Myrna Bonaldo, por ter me dado a oportunidade de fazer parte de sua equipe, pela dedicação, apoio e orientação imprescindíveis que possibilitaram o desenvolvimento e o aperfeiçoamento desta tese.

Ao Dr. Ricardo Galler, pelas sugestões e críticas a esse trabalho e também pelas valiosas discussões científicas nas reuniões do laboratório, as quais me permitiram um raciocínio lógico e amplo.

À Dr<sup>a</sup>. Mirian Pereira, pelo suporte nos ensaios com *T. cruzi*, sem o qual não haveria esta tese. Agradeço também pelo incentivo, a atitude sempre prestativa e pelas sugestões sempre providenciais nos momentos mais críticos. Agradecimentos especiais ao Alanderson Nogueira (Laboratório de Ultra-estrutura Celular, IOC) pelas passagens e inóculos de tripomastigotas para a realização dos ensaios de desafio e parasitemia.

À equipe do Laboratório de Experimentação Animal (LAEAN) e do Laboratório de Experimentação Animal do IOC pelo apoio em todos os experimentos com animais. Em especial, agradeço à Fernanda Rimolli, Luiz Cesar e Isabel Freire pela paciência, auxílio técnico e organizacional de todos os ensaios com animais realizados.

Ao Dr. Maurício Rodrigues pelo auxílio na idealização do projeto desta tese e sugestões para a publicação do artigo, além do fornecimento de plasmídeos e anticorpos para *T. cruzi*.

À equipe do Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV, Bio-Manguinhos), por ter cedido instalações e a estrutura utilizada durante a execução de parte dos experimentos descritos nesta tese.

À Plataforma Tecnológica de ELISPOT, pelo auxílio técnico na leitura das placas, e em especial a Josué da Costa Lima pelas sugestões técnicas e dicas para as análises de ELISPOT.

Agradecimentos especiais a Patrícia Neves, pela experiência e sugestões nos ensaios imunológicos desta tese, no auxílio técnico e nas discussões dos resultados. Agradeço também a Gisela Freitas pelo auxílio e persistência em sempre me ajudar, principalmente nos ensaios de imunofluorescência, com as lindas fotos obtidas! Também agradeço pelo companheirismo e pelas longas conversas motivadoras trocadas ao longo deste tempo.

À equipe do Laboratório de Imunologia Viral (IOC/FIOCRUZ), pelo auxílio na utilização do citômetro Accuri, Dr<sup>a</sup>. Claire Kubelka, Dr<sup>a</sup>. Luzia de Oliveira e em especial Mariana Gandini e Amanda Torrentes pelo apoio e resolução de dúvidas quanto aos ensaios de marcação celular.

Às colegas que conheci no LABMOF: Aymara Rangel, Prisciliana de Jesus, Ana Paula Montenegro, Michelli Faria, Ana Luíza Valadão e em especial Ingrid Horbach e Adriana Duarte que tanto me auxiliaram na minha chegada ao laboratório e na execução dos primeiros experimentos em Biologia Molecular no LABMOF.

Agradeço imensamente ao Marlon Gilsepp e a Juliana pelo grande auxílio em tudo no laboratório, pelo jeito sempre prestativo e pela competência técnica que sempre demonstraram ter ao fazer qualquer experimento no laboratório. Agradeço também ao Alexandre pelo apoio no seqüenciamento, a Noêmia pelos divertidos papos e aos técnicos Armindo Caldeira e Mônica Alcon pelo auxílio sempre prestado.

À Heloísa do Setor de Imagens pela edição das imagens e tabelas desta tese e artigo.

Às plataformas PDTIS de microscopia confocal e seqüenciamento.

Aos meus pais, Luiz Nogueira e Silvia Tayar pela minha formação, educação, princípios e, principalmente, por terem me ensinado a nunca desistir diante das dificuldades. Obrigada por terem me ouvido em todos os momentos difíceis e por terem torcido comigo em todas as minhas realizações.

Ao meu querido marido Sergio pelo seu amor e dedicação por todo o tempo em que estamos juntos, tornando-o sempre mais leve e divertido. Obrigada pelo seu apoio em minha vida acadêmica e por estar ao meu lado para me ajudar sempre que necessário. Agradeço também a minha sogra Maria Auxiliadora pelo suporte durante a realização desta tese.

Agradeço ao meu casal de gatinhos, Hulk e Samira que me ofereceram companhia e estiveram sempre ao meu lado durante todo o tempo em que escrevi esta tese.

A todos os meus professores, em especial a Dr<sup>a</sup>. Maria das Graças de Luna Gomes que me orientou na Iniciação Científica e Mestrado, a quem devo meus primeiros passos na vida científica.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite, especialmente ao Dr. Ricardo Galler pela excelente revisão desta tese.

Ao IOC e à FIOCRUZ, pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Coordenação e Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do IOC pelo auxílio durante o doutorado. Agradecimentos especiais à secretária do Departamento, Aline.

À FAPERJ pela bolsa e incentivo financeiro recebido durante a realização desta tese.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

**“Está instaurada a dúvida. A metódica dúvida epistemológica. Neste mundo a Terra não está no centro, nenhum saber é saber completo. Seja bem-vinda era da razão. Não há que se temer a revisão. Nada que se diga ou que foi dito merece estatuto de dogma irrestrito. Cuidado com a verdade que se pretende maior que a realidade, pois os fatos são os fatos e fluem diante de nós que estupefatos assistimos ao espetáculo.”**

**Galileu Galilei**

**“Toda a natureza é uma harmonia divina, sinfonia maravilhosa que convida todas as criaturas a que acompanhem sua evolução e progresso.”**

**Tsai Chih Chung**

**“Se o conhecimento pode criar problemas, não é através da ignorância que podemos solucioná-los.”**

**Isaac Asimov**

## ABREVIATURAS E SIGLAS

---

2P	Segunda passagem seriada
aa	Aminoácido
Ac	anticorpo
ASP-2	Proteína de superfície de amastigotas 2. Do Inglês: <i>Amastigote Surface Antigen 2</i>
AST	Tempo médio de sobrevivência. Do Inglês, <i>Average Survival Time</i>
ATCC	Coleção Americana de Culturas e Depósitos. Do Inglês, <i>American Type Culture Collection</i>
BSA	Albumina sérica bovina. Do Inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i>
BrEt	Brometo de etídeo
C	Capsídeo ou proteína do capsídeo
cap	Resíduo G metilado (7-metil G) na extremidade 5' do RNAm
CD4	Grupamento de diferenciação. Do Inglês: <i>Cluster of differentiation 4</i>
cDNA	DNA complementar
CFSE	Do Inglês: <i>carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester</i>
CMC	Carboximetilcelulose
ConA	Concanavalina A
CPE	Efeito citopático. Do Inglês, <i>cythopathic effect</i>
CpG	Citosina-fosfato-guanosina
CQB	Certificado de Qualidade em Biossegurança
CS	Segmento Conector entre as duas hastes da proteína E de <i>Flavivírus</i> . Do Inglês, <i>Connecting Segment</i>
CTL	Linfócito T citotóxico
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DABCO	1,4-diazabicyclo-(2,2,2)-octano
DAPI	4,3-Diamidino-2-Fenilindol
DCs	Células dendríticas
DENV	Vírus da dengue
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMEM	Do Inglês: <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
ddNTP	dideoxiribonucleotídeo
dNTP	deoxirribonucleotídeos



d.p.i.	dias pós infecção
DTT	1,4-ditiotreitol
E	Envelope ou proteína do envelope de <i>Flavivírus</i>
EDTA	Etileno-diamino tetra acetato de sódio
ELISPOT	Do Inglês, <i>Enzyme-linked immunosorbent spot</i>
FA	Vírus da febre amarela ou doença febre amarela
FACS	Do Inglês: <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FITC	Isotiacianato de fluoresceína
FNV	Vacina Neurotrópica Francesa
GFP	Proteína fluorescente verde. Do Inglês, <i>Green Florescent Protein</i>
GMT	Média geométrica
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GRAVY	Índice de hidropaticidade. Do Inglês: <i>Grand average of hidropathicity index</i>
H1 e H2	Hastes 1 e 2 da proteína E de <i>Flavivírus</i>
HA	Haste-âncora da proteína E de <i>Flavivírus</i>
HIYF	soro policlonal hiperimmune para Febre Amarela. Do Inglês, <i>Hyperimmune Yellow Fever</i>
HLA	Antígeno leucocitário humano. Do Inglês, <i>Human Leukocyte Antigen</i>
i.c.	intra-cerebral
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	interleucina
i.p.	intraperitoneal
IRES	Sítio interno de ligação ao ribossomo. Do Inglês, <i>Internal Ribosome Binding</i>
JEV	Vírus da encefalite japonesa. Do Inglês, <i>Japanese Encephalitis virus</i>
LA	Lipofectamina
LB	Meio Luria-Bertani
M	Proteína de Membrana
M $\phi$	Macrófago ativado
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade. Do Inglês, <i>Major histocompatibility complex</i>
M-MLV	Transcriptase reversa do Vírus da Leucemia Murina. Do Inglês: <i>Murine Leukemia Virus</i>

MOI	Multiplicidade de infecção. Do Inglês, <i>multiplicity of infection</i>
MVEV	Vírus da encefalite do vale Murray. Do Inglês, <i>Murray Valley Encephalitis Virus</i>
NK	Do Inglês, <i>Natural Killer</i>
nm	nanômetros
NO	Óxido nítrico
NS	Proteína não estrutural de <i>Flavivírus</i> . Do Inglês, <i>non-structural protein</i>
nt	Nucleotídeo
ODN	Oligodeoxinucleotídeo
ORF	Fase aberta de leitura. Do inglês, <i>Open Reading Frame</i>
PE	Ficoeritrina
pb	Pares de base
PBS	Solução salina fosfato tamponada. Do Inglês, <i>Phosphate Buffered Saline solution</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase. Do Inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFU	Unidade formadora de placa. Do Inglês, <i>Plaque Forming Unit</i>
PM	Peso molecular
POP	Protocolo Operacional Padrão
PrM	Precursor da proteína de membrana de <i>Flavivírus</i>
PRNT	Teste de redução de placas por neutralização. Do Inglês, <i>Plaque Reduction Neutralization Test</i>
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RE	Retículo Endoplasmático
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
RNA <sub>sin</sub>	Do Inglês: <i>Ribonuclease inhibitor</i>
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Do Inglês: <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT-PCR	Transcrição Reversa seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase. Do Inglês, <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
s.c.	subcutâneo
SD	Desvio-padrão
SFB	Soro Fetal Bovino
SLEV	Vírus da encefalite de Saint-Louis. Do Inglês, <i>Saint-Louis encephalitis virus</i>
SURE	Células <i>Escherichia coli</i> competentes. Do Inglês, <i>Stop Unwanted</i>

*Rearrangement Events*

TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TBEV	Vírus da encefalite transmitido por carrapato. Do Inglês, <i>Tick-Borne Encephalitis Virus</i>
Tc 1	Linfócito T citotóxico 1
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TE	Tampão Tris-EDTA
TGF- $\beta$	Fator beta transformante do crescimento
TGN	Rede Trans-Golgi. Do Inglês, <i>Trans Golgi Network</i>
Th1	Linfócitos T auxiliares 1. Do Inglês, <i>T helper 1</i>
TLRs	Receptores Toll. Do Inglês, <i>Toll-like receptors</i>
TM1/TM2	Transmembranas 1 e 2 da proteína E de <i>Flavivírus</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral tipo alfa
TS	Trans-sialidase
TSSA	Antígeno de trans-sialidase. Do Inglês, <i>Trans-sialidase Antigen</i>
UTR	Região não traduzida. Do Inglês, <i>Untranslated Region</i>
Vero	Células de rim de macaco verde africano
WHO	Organização Mundial da Saúde. Do Inglês, <i>World Health Organization</i>
WNV	Vírus do Oeste do Nilo. Do Inglês, <i>West Nile Virus</i>
YF	Do Inglês, <i>Yellow Fever</i>
YF 17D	Cepa 17D da vacina contra Febre Amarela
YF 17D-204	Cepa 17D-204 da vacina contra Febre Amarela
YF 17DD	Cepa 17DD da vacina contra Febre Amarela
YFV	Febre Amarela. Do Inglês: <i>Yellow fever virus</i>

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.1</b> – Organização genômica dos flavivírus	2
<b>Figura 1.2</b> – Estrutura do vírion do vírus da dengue e conformações da proteína E	4
<b>Figura 1.3</b> – Modelo estrutural em 3D da proteína E do vírus da febre amarela YF 17D, na sua forma dimérica	6
<b>Figura 1.4</b> – Ciclo de replicação dos flavivírus	10
<b>Figura 1.5</b> – Histórico de passagens da linhagem Asibi e derivação das cepas vacinais do vírus YF 17D e seus subcultivos	13
<b>Figura 1.6</b> – Rota de migração da América Latina e o número total de indivíduos infectados em países não-endêmicos	25
<b>Figura 1.7</b> – Mecanismo de participação de citocinas e tipos celulares na indução da imunidade contra infecção por <i>T. cruzi</i>	28
<b>Figura 3.1</b> – Esquematização das etapas adotadas neste trabalho para construção e obtenção dos vírus recombinantes de FA 17D	38
<b>Figura 3.2</b> - Mapa do plasmídeo pYFE200	47
<b>Figura 3.3</b> – Mapa do plasmídeo pT3/ <i>Sma</i> I	47
<b>Figura 3.4</b> – Obtenção dos moldes de cDNA e produção dos vírus recombinantes através do sistema de dois plasmídeos (tecnologia do clone infeccioso de FA)	50
<b>Figura 3.5</b> – Esquema de amplificação do cassete de expressão heterólogo	53
<b>Figura 3.6</b> – Mapa do plasmídeo bacteriano pT3 <i>Eag</i> I/ <i>Nar</i> I de 9.951 pb contendo a região central do genoma do vírus FA	56
<b>Figura 3.7</b> - Obtenção do molde de cDNA e produção do vírus recombinante YF17D/ENS1/Tc através do sistema de dois plasmídeos (tecnologia do clone infeccioso)	58
<b>Figura 3.8</b> - Esquema da cinética adotada para os ensaios experimentais realizados em camundongos A/J	69
<b>Figura 4.1</b> – Desenho esquemático do genoma do vírus YF17D e os sítios correspondentes às regiões de inserção dos antígenos da proteína ASP-2 de <i>T. cruzi</i>	74
<b>Figura 4.2</b> – Construção do plasmídeo pYFE200/Tc.	76
<b>Figura 4.3</b> – Perfis de plasmídeos pYFE200 recombinantes submetidos à digestão por <i>Eco</i> RV e <i>Not</i> I em análise por eletroforese em gel de agarose.	77
<b>Figura 4.4</b> – Esquema representando as diferentes regiões intergênicas NS2B/NS3 codificadas pelos plasmídeos pT3, pT3/ <i>Sma</i> I e pT3NS2B3/Tc	78

<b>Figura 4.5</b> – Mapa físico do plasmídeo pT3NS2B3/Tc contendo inserto TEWETGQI (posição 3.213 nt) de <i>T. cruzi</i>	79
<b>Figura 4.6</b> – Perfil de pT3NS2B3/Tc submetido à dupla-digestão por <i>Sma</i> I e <i>Aat</i> II, em análise por eletroforese em gel de agarose	80
<b>Figura 4.7</b> - Construção do molde de cDNA viral	81
<b>Figura 4.8</b> – Caracterização dos vírus YF 17D recombinantes	83
<b>Figura 4.9</b> - Expressão do epítipo TEWETGQI da proteína ASP-2 de <i>T. cruzi</i> em células infectadas com os vírus YF17D/E200/Tc e YF17D/NS2B3/Tc	86
<b>Figura 4.10</b> – Curva de sobrevivência de camundongos Suíços inoculados pela via intracerebral com 1.000 PFU de cada vírus	87
<b>Figura 4.11</b> – Curva de sobrevivência (%) em camundongos C3H/HeJ e A/J infectados com inóculos de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> (cepa Y)	89
<b>Figura 4.12</b> – Avaliação da infecção por <i>T. cruzi</i> (cepa Y) de camundongos A/J frente a um inóculo intraperitoneal de 250 tripomastigotas	90
<b>Figura 4.13</b> - Curva de percentagem de sobrevivência de camundongos vacinados A/J frente a um desafio intracerebral com o vírus YF 17DD	91
<b>Figura 4.14</b> - Análise da produção de IFN- $\gamma$ por esplenócitos de camundongos imunizados com vírus recombinantes 17D e desafiados com <i>T. cruzi</i>	95
<b>Figura 4.15</b> - Curva de sobrevivência (%) de camundongos A/J vacinados e desafiados por <i>T. cruzi</i>	97
<b>Figura 4.16</b> - Diagrama esquemático do cassete de expressão de fragmento de ASP <sub>261-380</sub> ( <i>T. cruzi</i> ) no genoma de YF17D	101
<b>Figura 4.17</b> – Obtenção de produto de PCR contendo seqüência correspondente ao cassete heterólogo	103
<b>Figura 4.18</b> – Clonagem em pGEM-T e TOPO-pCR-BluntII	104
<b>Figura 4.19</b> – Mapa do plasmídeo TOPO-ASP2 contendo a região do cassete heterólogo	105
<b>Figura 4.20</b> – Análise por eletroforese em gel de agarose dos preparados plasmidiais oriundos de pT3 <sub>EagI/NarI</sub> digeridos por <i>Nar</i> I.	106
<b>Figura 4.21</b> - Mapa do plasmídeo pT3-ASP2 contendo a região do cassete heterólogo	106
<b>Figura 4.22</b> – Caracterização do vírus recombinante YF17D/ENS1/Tc.	108
<b>Figura 4.23</b> – RT-PCR realizado a partir de RNA extraído de sobrenadantes celulares de YF 17DD ou vírus recombinante YF17D/ENS1/Tc (2P e 6P).	110
<b>Figura 4.24</b> – Expressão do epítipo TEWETGQI pelo vírus recombinante	111

YF17D/ENS1/Tc em ensaio de imunofluorescência indireta	
<b>Figura 4.25</b> - Detecção de anticorpos específicos contra amastigotas em células infectadas pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> , cepa Y	114
<b>Figura 4.26</b> - Curva de sobrevivência (%) de camundongos A/J imunizados vacinados e desafiados por <i>T. cruzi</i>	118
<b>Figura 4.27</b> – Média dos níveis parasitêmicos obtidos de camundongos imunizados	119
<b>Figura 4.28</b> - Análise da produção de IFN- $\gamma$ por esplenócitos de camundongos imunizados com YF17D/ENS1/Tc e desafiados com <i>T. cruzi</i>	122
<b>Figura 4.29</b> – Quantificação da expansão do número de células produtoras de IFN- $\gamma$ antes e após desafio com <i>T. cruzi</i> .	124
<b>Figura 4.30</b> – Esquema representativo do tipo de análise realizada para determinação de ativação de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> presentes em esplenócitos de camundongos A/J imunizados com diferentes composições vacinais.	126
<b>Figura 4.31</b> – Linfoproliferação <i>in vitro</i> por CFSE após uma única dose da Formulação Viral 1	127
<b>Figura 4.32</b> - Células CFSE <sub>low</sub> CD8 <sup>+</sup> responsivas a TEWETGQI após uma dose de YF17DD vacinal, vírus recombinantes ou Formulação viral 1.	128
<b>Figura 4.33</b> – Porcentagens de células CFSE <sub>low</sub> responsivas ao Vírus da Febre Amarela vacinal	129

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1.1</b> – Vacinas virais recombinantes para uso humano e veterinário	19
<b>Tabela 1.2</b> - Resumo dos sistemas de apresentação dos antígenos utilizados em ensaios de vacinação experimentais contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
<b>Tabela 3.1</b> – Oligonucleotídeos utilizados nas reações de seqüenciamento	46
<b>Tabela 3.2</b> – Iniciadores utilizados para clonagem de epítipo TEWETGQI	48
<b>Tabela 3.3</b> – Oligonucleotídeos utilizados na montagem do cassete heterólogo entre os genes E / NS1	51
<b>Tabela 3.4</b> – Iniciadores usados nas reações de RT-PCR	63
<b>Tabela 3.5</b> – Formulações de vírus recombinantes YF17D utilizadas nos ensaios de proteção	69
<b>Tabela 4.1</b> – Vírus YF 17D recombinantes para o epítipo TEWETGQI de <i>T.cruzi</i>	82
<b>Tabela 4.2</b> - Valores médios com desvio-padrão ( $\log_{10}$ PFU/mL) de títulos virais nos tempos coletados.	83
<b>Tabela 4.3</b> – Título em $\log_{10}$ PFU/mL e MOI do vírus YF17D/NS2B3/Tc da terceira até a oitava passagem em células Vero	84
<b>Tabela 4.4</b> – Título em $\log_{10}$ PFU/mL e MOI do vírus YF17D/E200/Tc da terceira até a oitava passagem em células Vero	84
<b>Tabela 4.5</b> - Neurovirulência dos vírus YF17D em camundongos Suíços	87
<b>Tabela 4.6</b> – Predição de epítopos (octâmeros) no fragmento de 120 aminoácidos de ASP-2 (ASP-2 <sub>261-380</sub> ) em ligação ao MHC murino H2-K <sup>k</sup>	88
<b>Tabela 4.7</b> - Indução de anticorpos neutralizantes dirigido ao vírus FA em camundongos A/J	92
<b>Tabela 4.8</b> – Percentuais de sobrevida e tempo médio de sobrevida de camundongos A/J vacinados com os vírus recombinantes e desafiados com <i>T.cruzi</i>	98
<b>Tabela 4.9</b> – Parâmetros físico-químicos deduzidos a partir da seqüência de aminoácidos do fragmento de ASP-2 <sub>261-380</sub> e do cassete recombinante de ASP-2 <sub>261-380</sub>	102
<b>Tabela 4.10</b> - Valores médios com desvio-padrão ( $\log_{10}$ PFU/mL) de títulos virais nos tempos coletados	108
<b>Tabela 4.11</b> – Título em $\log_{10}$ PFU/mL e MOI do vírus YF17D/ENS1/Tc da terceira até a sexta passagem em células Vero	109
<b>Tabela 4.12</b> – Imunogenicidade dos vírus recombinantes em A/J	112
<b>Tabela 4.13</b> - Percentuais de sobrevida e tempo médio de sobrevida de camundongos	117

A/J vacinados com formulações virais e desafiados com *T.cruzi*

**Tabela 4.14** – Comparação do grau de proteção aferido pelos diferentes vírus YF17D recombinantes adotados neste trabalho 130

**Tabela 4.15** - Resumo dos parâmetros de imunogenicidade dos vírus recombinantes para o Vírus da Febre Amarela avaliados neste trabalho 131

**Tabela 4.16** - Resumo dos parâmetros de imunogenicidade dos vírus recombinantes para *T. cruzi* avaliados neste trabalho 131



## ÍNDICE

---

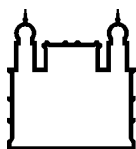
1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	<i>Flavivírus</i> : classificação, estrutura e replicação	1
1.1.1.	O Genoma dos Flavivírus	1
1.1.2.	Ciclo de replicação viral	9
1.2.	O vírus da Febre Amarela	11
1.2.1.	Breve Histórico	11
1.2.2.	A vacina para febre amarela	12
1.2.3.	Reações adversas após vacinação com YF 17D	14
1.2.4.	Análise molecular da atenuação do Vírus da Febre Amarela	15
1.2.5.	A resposta imunológica para o vírus da Febre Amarela	16
1.3.	Desenvolvimento de vacinas virais recombinantes: o uso do vírus YF 17D como vetor para expressão de antígenos heterólogos	19
1.4.	A Doença de Chagas	24
1.4.1.	Epidemiologia, modos de transmissão e ciclo biológico	24
1.4.2.	Mecanismos efetores da resposta imune contra a Doença de Chagas	26
1.4.3.	Evasão da resposta imune por <i>T. cruzi</i>	28
1.4.4.	Estratégias de vacinação experimental contra doença de Chagas	30
2.	OBJETIVOS	35
2.1.	Gerais – Uso do vírus YF 17D como vetor para antígeno de <i>T. cruzi</i>	35
2.2.	Específicos	35
2.2.1.	Obtenção dos vírus recombinantes	35
2.2.2.	Caracterização biológica e genética dos vírus YF17D recombinantes	35
2.2.3.	Estudo da resposta imune induzida pelos vírus YF 17D recombinantes	35
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1.	Bactérias	39
3.2.	Cultura de células	39
3.3.	Animais	40
3.4.	Obtenção de formas tripomastigotas sanguíneas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
3.5.	Vírus	41
3.5.1.	YF 17DD	41
3.5.2.	YF 17D/E200T3	41
3.6.	Purificação e extração de ácidos nucleicos	42

3.6.1. Extração de DNA plasmidial	42
3.6.2. Extração de DNA de gel de agarose	43
3.6.3. Purificação de fragmentos de PCR	43
3.6.4. Precipitação de DNA	43
3.6.5. Eletroforese de ácidos nucleicos	44
3.6.6. Extração de RNA total de sobrenadante celular com TRIzol LS	44
3.7. Sequenciamento nucleotídico	45
3.8. Construção dos vírus recombinantes YF 17D/E200/Tc e YF 17D/NS2B3/Tc	46
3.8.1. Estratégia de clonagem	46
3.8.2. Obtenção dos moldes de cDNA	48
3.9. Construção do vírus recombinante YF 17D/ENS1/Tc	51
3.9.1. Estratégia de clonagem	51
3.9.2. Reações de PCR	51
3.9.3. Clonagem do cassete de expressão no plasmídeo pGEM-T	54
3.9.4. Clonagem do cassete de expressão no plasmídeo TOPO-pCR-BluntII	54
3.9.5. Clonagem no plasmídeo pT3 <sub>EagI/NarI</sub>	55
3.9.6. Obtenção dos moldes de cDNA	57
3.10. Obtenção dos vírus recombinantes	58
3.10.1. Transcrição <i>in vitro</i> dos moldes de cDNA dos vírus YF 17D	58
3.10.2. Transfecção dos RNAs virais em células Vero e regeneração dos vírus	59
3.10.3. Produção dos estoques virais de segunda passagem celular	60
3.11. Caracterização viral	60
3.11.1. Titulação viral por contagem de placas de lise	60
3.11.2. Cinética de replicação viral em células Vero	61
3.11.3. Reações de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)	62
3.11.4. Estabilidade genética do vírus recombinante	63
3.11.5. Expressão de epítipo heterólogo através de imunofluorescência	64
3.11.6. Grau de atenuação dos vírus recombinantes (neurovirulência) em camundongos Suíços	65
3.12. Avaliação inicial das linhagens C3H/HeJ e A/J à infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	65
3.12.1. Desafio e parasitemia	65
3.13. Estudos de imunogenicidade em camundongos A/J para o Vírus da	66

Febre Amarela YF 17DD	
3.13.1. Susceptibilidade dos camundongos A/J ao vírus YF 17DD (desafio)	66
3.13.2. Ensaios de neutralização viral	67
3.14. Avaliação de resposta imune específica para <i>Trypanosoma cruzi</i> após vacinação de camundongos A/J	68
3.14.1. Ensaios de avaliação da resposta imune protetora em animais experimentais	68
3.14.2. Reatividade de anticorpos a formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	70
3.14.3. Resposta celular produtora de interferon-gama através de ensaio de ELISPOT	70
3.14.4. Proliferação de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup>	71
4. RESULTADOS	73
PARTE I – Obtenção e caracterização dos vírus YF 17D/E200/Tc e YF 17D/NS2B3/Tc	75
4.1. Obtenção dos vírus YF 17D recombinantes para o epítipo TEWETGQI da proteína ASP-2 de <i>Trypanosoma cruzi</i> : vírus YF 17D/E200/Tc e YF 17D/NS2B3/Tc	75
4.1.1. Construção do plasmídeo recombinante pE200/Tc	75
4.1.2. Construção do plasmídeo recombinante pT3NS2B3/Tc	77
4.1.3. Obtenção dos vírus recombinantes YF 17D	80
4.2. Caracterização biológica dos vírus recombinantes YF 17D/E200/Tc e YF 17D/NS2B3/Tc	81
4.2.1. Produção de estoques virais e titulação	81
4.2.2. Determinação da proliferação viral em células Vero e do fenótipo de placas de lise celular	82
4.2.3. Estabilidade genética da inserção heteróloga	84
4.2.4. Expressão do epítipo TEWETGQI pelos recombinantes	85
4.2.5. Grau de atenuação dos vírus em camundongos Suíços (neurovirulência)	86
4.3. Estabelecimento do modelo experimental murino de haplotipo H2-K <sup>k</sup> de MHC classe I para avaliação da imunogenicidade dos vírus YF 17D recombinantes para <i>T. cruzi</i>	88
4.3.1. Susceptibilidade das linhagens C3H/HeJ e A/J à infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Y	89

4.3.2.	Susceptibilidade dos camundongos A/J ao Vírus YF 17DD	90
4.3.3.	Determinação da indução de anticorpos neutralizantes para o Vírus da Febre Amarela em camundongos A/J	91
4.4.	Avaliação da imunogenicidade viral em camundongos vacinados e/ou desafiados com <i>T. cruzi</i>	92
4.4.1.	Determinação do número de células de baço produtoras de IFN- $\gamma$ específicas ao epítipo TEWETGQI e ao Vírus FA	92
4.4.2.	Ensaio de proteção em camundongos vacinados com vírus YF 17D recombinantes e desafiados com tripomastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i>	96
PARTE II – Obtenção e caracterização do vírus YF 17D/ENS1/Tc		99
4.5.	Construção e recuperação do vírus YF 17D/ENS1/Tc recombinante para o fragmento de 120 aminoácidos de ASP-2 de <i>Trypanosoma cruzi</i>	99
4.6.	Caracterização biológica do vírus YF 17D/ENS1/Tc	107
4.6.1.	Obtenção do vírus recombinante	107
4.6.2.	Proliferação do vírus YF 17D/ENS1/Tc em células Vero e determinação do fenótipo de placas de lise celular	107
4.6.3.	Estabilidade genética do vírus recombinante YF 17D/ENS1/Tc	109
4.6.4.	Expressão do inserto heterólogo pelo vírus recombinante YF 17D/ENS1/Tc	110
4.7.	Avaliação da capacidade de indução de anticorpos neutralizantes específicos ao Vírus da Febre Amarela em camundongos A/J	111
4.8.	Avaliação da resposta imune específica para proteína ASP-2 <sub>261-380</sub> de <i>T. cruzi</i>	113
4.8.1.	Reatividade de anticorpos induzidos pela imunização de camundongos pelo vírus recombinante YF17D/ENS1/Tc com formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>	113
4.8.2.	Proteção contra a infecção por <i>T. cruzi</i> cepa Y em camundongos vacinados com YF17D/ENS1/Tc ou formulações virais	114
4.8.3.	Avaliação da parasitemia em camundongos vacinados e infectados por <i>T. cruzi</i>	118
4.8.4.	Determinação da indução de células de baço produtoras de interferon-gama específicas a TEWETGQI ou ao Vírus da Febre Amarela nos animais imunizados	119
4.8.5.	Ensaio de linfoproliferação de células T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> por marcação com CFSE	125

5.	DISCUSSÃO	132
5.1	Imunidade protetora contra <i>T. cruzi</i> e relação com a imunidade induzida pela vacinação com 17D, escolha dos antígenos heterólogos	132
5.2	Influência do local genômico de expressão	134
5.3	Caracterização dos vírus 17D recombinantes	138
5.4	Atenuação dos vírus recombinantes	141
5.5	Imunogenicidade dos vírus 17D recombinantes	142
5.5.1	Indução de anticorpos neutralizantes e de células produtoras de IFN- $\gamma$ (comparação entre os vírus)	143
5.5.2	Expansão das células T CD8 <sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ e a relação com proteção	144
5.5.3	A escolha das formulações virais e a indução de proteção	146
5.5.4	Parasitemia	149
5.5.5	A resposta imune celular e a proteção induzida pela Formulação 1	150
5.5.6	Linfoproliferação e a indução de resposta imune pelo YF 17D vacinal	152
6.	CONCLUSÕES	154
7.	PERSPECTIVAS	156
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	159
9.	ANEXOS	189
9.1.	Meios, soluções e reagentes	189
9.2.	Artigo	192



Ministério da Saúde

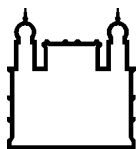
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DE VÍRUS AMARÍLICOS RECOMBINANTES EXPRESSANDO ANTÍGENOS DA PROTEÍNA ASP-2 DE AMASTIGOTAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

### **RESUMO**

O vírus vivo atenuado de Febre Amarela (FA) YF 17D é uma das vacinas virais mais seguras e eficazes já administradas a humanos, a qual induz uma resposta imune polivalente. Estas características tornam este vírus vacinal uma plataforma tecnológica para o desenvolvimento de novas vacinas. Através da tecnologia do clone infeccioso, nós utilizamos o arcabouço de YF 17D para expressar epítipo indutor de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, TEWETGQI e um fragmento imunogênico, ambos provenientes da proteína de superfície de amastigota 2 (ASP-2) de *Trypanosoma cruzi*, parasita causador da Doença de Chagas. Este estudo objetivou evidenciar o potencial deste vírus em expressar antígenos heterólogos. O epítipo TEWETGQI foi clonado e expresso baseando-se em dois sítios distintos do genoma: na alça *fg* da proteína de Envelope (E) (YF17D/E200/Tc) e no sítio de clivagem proteolítico entre NS2B e NS3 (YF17D/NS2B3/Tc). Uma terceira estratégia envolveu a montagem de um cassete heterólogo expressando um fragmento imunogênico de 120 aminoácidos de ASP-2 entre as proteínas E e NS1 (YF17D/ENS1/Tc). Nós investigamos se o sítio de expressão poderia influenciar a imunogenicidade do antígeno heterólogo. Assim, foram gerados vírus que se replicaram em cultura de células similar ao YF 17DD e permaneceram estáveis geneticamente após algumas passagens seriadas em célula Vero. A expressão dos antígenos heterólogos pelos vírus recombinantes revelou distintos padrões de detecção em diferentes regiões da célula. Outros estudos de caracterização mostraram que os vírus YF17D/E200/Tc e YF17D/NS2B3/Tc são mais atenuados do que YF 17DD, quando inoculados via intracerebral em camundongos, sendo YF17D/E200/Tc o mais atenuado. Estudos de imunogenicidade revelaram que todos os vírus foram capazes de induzir anticorpos neutralizantes para Febre Amarela e o vírus YF17D/ENS1/Tc induziu anticorpos que reagem especificamente com amastigotas. Além disso, os vírus recombinantes induziram em camundongos imunizados uma resposta celular T produtora de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) antígeno-específica, além de uma resposta balanceada T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> para Febre Amarela. A vacinação de uma linhagem murina altamente suscetível à infecção por *T. cruzi* com um regime de dose-reforço homólogo que utilizou uma formulação de vírus YF 17D recombinantes induziu células T CD8<sup>+</sup> TEWETGQI específicas após uma única dose, a qual poderia explicar o maior grau de proteção após desafio com *T. cruzi*. Assim, concluímos que a plataforma de YF 17D é útil para expressar antígenos de protozoários (*T. cruzi*) em regiões funcionais distintas do genoma com um impacto mínimo na viabilidade viral. Além disso, o uso de novas formulações contendo diferentes vírus YF 17D recombinantes parece ser uma estratégia promissora, a qual será explorada para outros patógenos.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DE VÍRUS AMARÍLICOS RECOMBINANTES EXPRESSANDO ANTÍGENOS DA PROTEÍNA ASP-2 DE AMASTIGOTAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

### **ABSTRACT**

The attenuated Yellow Fever (YF) 17D vaccine virus is one of the safest and most effective viral vaccines administered to humans, in which it elicits a polyvalent immune response. These characteristics make this vaccine virus a technological platform to the development of new vaccines. Herein, through the infectious clone technology, we used the YF 17D backbone to express a CD8<sup>+</sup> T cell epitope, TEWETGQI and an immunogenic fragment, both originated from the *Trypanosoma cruzi* (the causative agent of Chagas disease) Amastigote Surface Protein 2 (ASP-2). This study aimed to provide further evidence for the potential of this virus to express foreign epitopes. The TEWETGQI epitope was cloned and expressed in two different genomic insertion sites: the *fg* loop of the viral Envelope protein (E) (YF17D/E200/Tc) and the protease cleavage site between the NS2B and NS3 (YF17D/NS2B3/Tc). A third strategy involved the construction of a heterologous cassette expressing an immunogenic ASP-2 fragment between E and NS1 (YF17D/ENS1/Tc). We investigated whether the site of expression had any influence on foreign antigen immunogenicity. In this sense, we generated virus that replicated similarly to vaccine virus YF 17DD in cell culture and remained genetically stable after some serial passages in Vero cells. The expression of the heterologous antigens by the recombinant viruses revealed distinct patterns of detection regarding different regions of the cell. Other characterization studies showed that YF17D/E200/Tc and YF17D/NS2B3/Tc were more attenuated than YF 17DD, when inoculated intracerebrally in mice, YF17D/E200/Tc being the most attenuated. Immunogenicity studies revealed that all viruses elicited neutralizing antibodies to YF virus and YF17D/ENS1/Tc virus induced antibodies that react specifically to amastigotes. Moreover, recombinant viruses generated an antigen specific gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) mediated T-cell response in immunized mice as well as a balanced YF T CD4<sup>+</sup> and T CD8<sup>+</sup> response. Vaccination of a mouse lineage highly susceptible to infection by *T. cruzi* with a homologous prime-boost regimen of a YF 17D recombinant formulation elicited TEWETGQI specific CD8<sup>+</sup> T cells after only one dose which could explain the higher degree of protection after *T. cruzi* challenge. We conclude that the YF 17D platform is useful to express Protozoan (*T. cruzi*) antigens at different functional regions of its genome with minimal reduction in vector viability. Besides, the use of new viral formulations composed of different YF 17D recombinant viruses seem to be a promising strategy that will be explored to other pathogens.

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1. *Flavivírus*: classificação, estrutura e replicação

A Família *Flaviviridae* consiste de três gêneros: *Pestivirus*, que inclui vírus importantes no setor agrícola e bovino; *Hepacivirus*, no qual o vírus da hepatite C é o único membro; e *Flavivirus*, o maior dos três gêneros, compreendendo mais de 80 membros (Lindenbach & Rice, 2001). O gênero *Flavivirus* contém mais de 70 vírus que incluem: o vírus da dengue (DENV-“*Dengue virus*”), o vírus da encefalite japonesa (JEV – “*Japanese encephalitis virus*”), o vírus da encefalite transmitida por carrapato (TBEV – “*Tick-borne encephalitis virus*”), o vírus do Oeste do Nilo (WNV- “*West Nile virus*”), o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV-“*Saint-Louis encephalitis virus*”) e o vírus da Febre Amarela (YFV-“*Yellow fever virus*”). Os flavivírus são agrupados em complexos antigênicos seguindo critérios sorológicos, ou em *clusters*, clados e espécies, baseando-se em estudos filogenéticos moleculares.

Os flavivírus estão distribuídos na maior parte das regiões tropicais e subtropicais do mundo. Os membros dessa família de vírus que tem como vetor mosquitos ou carrapatos, são denominados arbovírus (*arthropod-borne vírus*) (Rice, 1996). Os vetores invertebrados mantêm a transmissão para hospedeiros vertebrados na natureza, como aves e mamíferos (p. ex: roedores, macacos e morcegos).

### 1.1.1. O Genoma dos *Flavivírus*

Os flavivírus possuem em torno de 50 nanômetros de diâmetro, são esféricos e possuem uma simetria icosaédrica (Lindenbach & Rice, 2003). Apresentam um capsídeo circundado por uma bicamada lipídica (envelope), derivada da célula hospedeira, na qual estão inseridos dois tipos de proteínas, a proteína de Envelope (E) e a proteína de Membrana (M), ou sua precursora (prM). O nucleocapsídeo consiste de várias cópias da proteína de capsídeo (C) e uma molécula de RNA de aproximadamente 11.000 nucleotídeos (Chambers *et al.*, 1990; Rice, 1996), fita simples e de polaridade positiva (+ssRNA), sendo desta forma infeccioso.



O RNA genômico dos flavivírus contém uma única fase aberta de leitura (ORF) que codifica para uma poliproteína de cerca de 3.400 aminoácidos, a qual é processada simultaneamente à tradução e após, por proteases celulares e virais (Figura 1.1). A porção N-terminal do genoma codifica para três proteínas estruturais (capsídeo ou C, pré-membrana ou prM, forma precursora de M, e envelope ou E), as quais constituem a partícula viral. Sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), que são essenciais na replicação viral, são codificadas pelo restante do genoma. As sequências codificantes são flanqueadas por seqüências 5' e 3' não traduzidas (UTR), sendo que na região 5', a UTR é curta, de aproximadamente 120 nucleotídeos, além de uma estrutura de *cap* (resíduo G metilado), que permite uma tradução similar aos RNAs mensageiros da célula. A região 3' apresenta uma região não traduzida de aproximadamente 600 nucleotídeos e não possui uma seqüência poliadenilada.

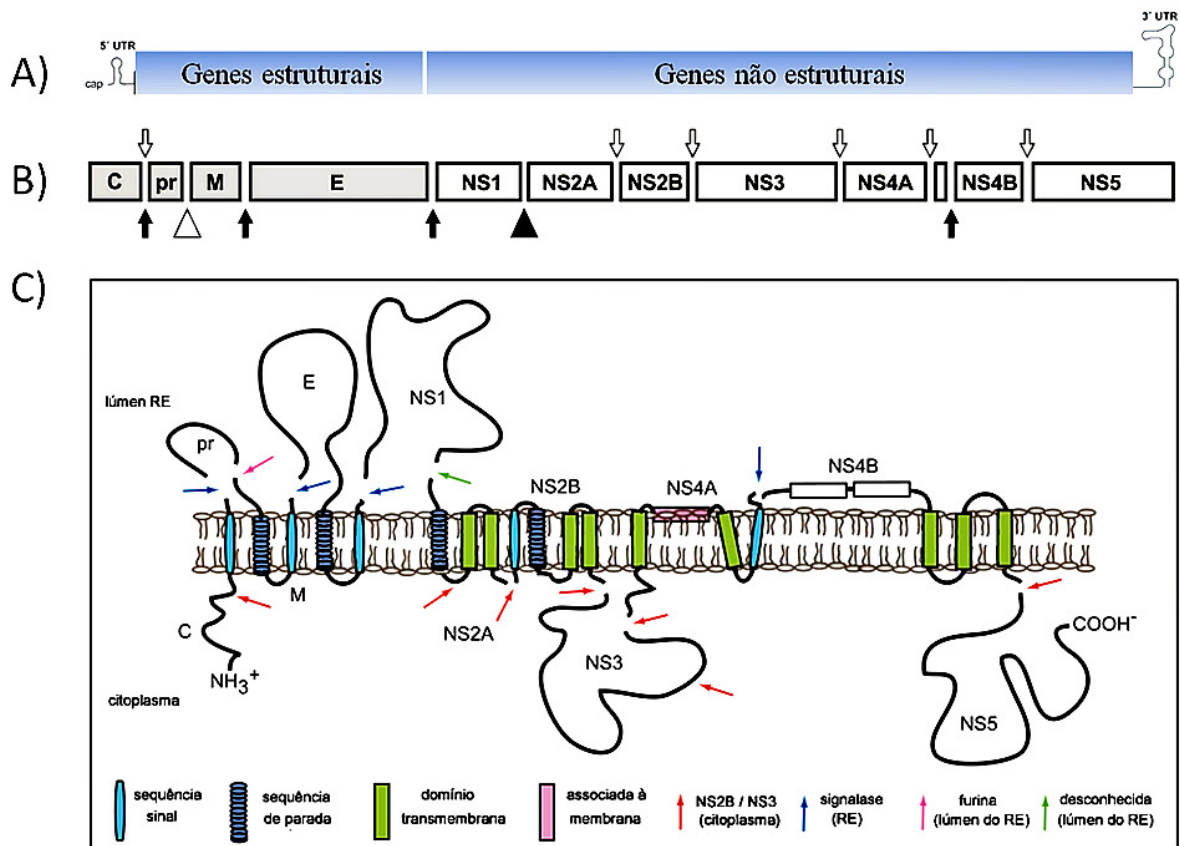


Figura 1.1 – Organização genômica dos flavivírus. A) O genoma viral é um ssRNA+ de aproximadamente 11 kb que possui duas seqüências 5' e 3' não traduzidas (UTR) flanqueando as regiões traduzidas em proteínas estruturais e não-estruturais. B) A poliproteína precursora de aproximadamente 3.400 aminoácidos sofre um processamento proteolítico por proteases virais e do hospedeiro. Setas brancas indicam sítios de clivagem da protease viral NS2B/NS3, para maturação /

geração de proteínas virais no lado citoplasmático da célula. Setas escuras indicam sítios de clivagem pela peptidase sinal (signalase) do hospedeiro. Outros motivos de processamento proteolítico da poliproteína viral são indicados pelo triângulo em aberto, que indica sítio de clivagem pela furina, e pelo triângulo escuro, que indica sítio de clivagem por protease desconhecida do hospedeiro. C) Topologia das proteínas virais na membrana do retículo endoplasmático indicando o ancoramento das proteínas estruturais (C e E) à membrana. Durante a maturação, prM é clivada pela furina, gerando o peptídeo pr e a proteína M. NS2A/2B e NS4A/4B estão ancoradas na membrana do RE como proteínas transmembranas enquanto que ocorre a liberação das proteínas não-estruturais NS1, NS3 e NS5 no citosol por proteases, conforme descritas acima. Fonte: adaptado de Perera & Kuhn, 2008.

Seqüências e estruturas secundárias codificadas pelas regiões UTR 5' e 3' e o gene do capsídeo (C), incluindo seqüências de ciclização (Khromykh *et al.*, 2001), regiões AUG e o terminal 3' contendo regiões de alça (“*stem-loop*”), são responsáveis pela regulação da síntese de RNA, tradução e replicação viral (Harris *et al.*, 2006). Em relação à homologia, estruturas secundárias da região 5' parecem ser comuns dentre os diferentes flavivírus, sugerindo a sua importância funcional (Brinton & Dispoto, 1988). Já a região UTR 3' contém várias seqüências, que são conservadas dentre os flavivírus transmitidos por mosquitos, capazes de formar estruturas organizadas e complexas que incluem elementos secundários e terciários de RNA envolvidos na iniciação e na regulação da amplificação do genoma e da tradução (Markoff, 2003; Wei *et al.*, 2009). No entanto, ainda que estruturas secundárias dessa região sejam bem conservadas, apenas algumas seqüências nucleotídicas (por exemplo, restritas a região de alça) são comuns dentre alguns flavivírus relacionados (WNV, YFV e SLEV). Verificou-se que existem grandes diferenças de homologia entre as estruturas secundárias da região 3' entre vírus transmitidos por carrapatos e os transmitidos por mosquitos (Thurner *et al.*, 2004).

Vários elementos já foram mapeados nas regiões UTR 5' e 3'. Elementos da região de alça da porção UTR 3' foram descritos como sinais de reconhecimento e de ligação da polimerase viral, implicando na sobrevivência do vírus (Brinton *et al.*, 1986). Em JEV, foi demonstrado que ocorre a ligação específica da RNA Polimerase NS5 à região de alça (Chen *et al.*, 1997). As seqüências nucleotídicas mais relevantes, mapeadas na região de alça em 3' compreendem o pentanucleotídeo de seqüência CACAG e o dinucleotídeo CU no final do genoma (Brinton *et al.*, 1986; Hahn *et al.*, 1987b). Apesar da conservação destas seqüências, foi visto que mutações pontuais podem ser bem toleradas pelo vírus da FA no motivo do

pentanucleotídeo (Silva *et al.*, 2007). Ambas as regiões 5` e 3` possuem um papel na regulação da expressão, preferencialmente modulando a eficiência de tradução do que pela estabilidade do RNA através da contribuição sinérgica de alguns elementos conservados, como CS1 (*conserved sequence*) na região 3`, que é complementar ao elemento cCS1, presente na região 5` (Chiu *et al.*, 2005).

A proteína do capsídeo, de 12 a 14 kDa, está envolvida no empacotamento do genoma viral, formando o nucleocapsídeo (Lindenbach & Rice, 2001). A proteína prM (PM de 18 a 19 kDa) é um precursor glicosilado da proteína de membrana (M) e está presente na forma imatura do vírus. Durante a maturação do vírus, ao nível das vesículas do Trans-Golgi (“Trans-Golgi Network” – TGN), prM é clivada pela endoprotease do hospedeiro, a furina, dando origem ao peptídeo “pr” e à proteína M. A função da prM é de estabilizar a proteína E, atuando como uma chaperona, com a finalidade de impedir a exposição prematura do peptídeo de fusão em função do pH reduzido nas vesículas do TGN (Figura 1.2).

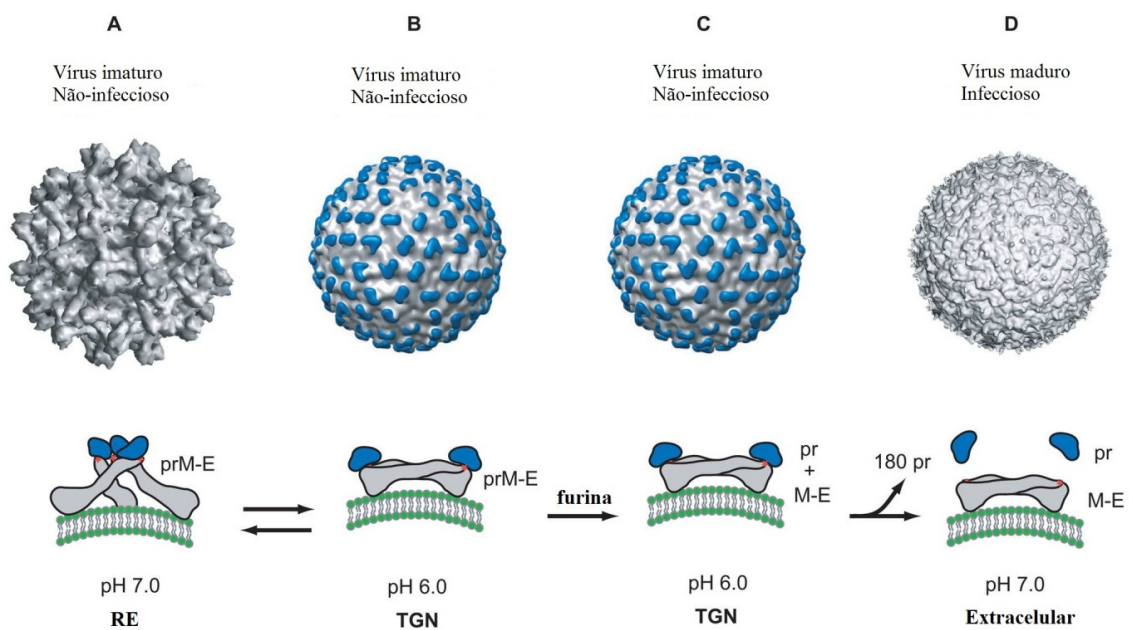


Figura 1.2 - Estrutura do vírion do vírus da dengue e conformações da proteína E. A) reconstrução por cristalografia do vírion imaturo em pH neutro, nesta estrutura, a proteína E está sob forma de heterodímero junto de prM. Estes heterodímeros formam 60 espículas triméricas por toda a superfície do vírus. A conformação da proteína E está mostrada abaixo do vírion. B) O vírion imaturo que encontra um baixo pH, durante o trânsito pela via do Trans-Golgi (TGN). O heterodímero prM-E assume uma nova conformação, formando 90 dímeros paralelamente à superfície do vírus, originando uma morfologia não-espiculada ao vírion. C) Ainda no TGN, prM é clivado em pr e M, sendo que pr ainda mantém sua função de *cap* na proteína E. D) O vírion maduro é secretado no meio extracelular e o peptídeo pr é liberado da partícula madura. Fonte: adaptado de Perera & Kuhn 2008.

A proteína E, de cerca de 55 kDa é o principal componente do envelope viral e pode se apresentar glicosilada em alguns mas não todos os flavivírus (Mukhopadhyay *et al.*, 2005). A proteína E possui em torno de 40% de identidade de aminoácidos dentre os membros de flavivírus (Perera *et al.*, 2008). O número e posição dos resíduos de carboidratos variam dentre as diferentes cepas para o mesmo vírus, sugerindo que a glicosilação na superfície do vírus modula a especificidade de ligação ao receptor celular. A proteína E desempenha atividades biológicas importantes, que são: 1) ligação a receptores glicoproteicos da superfície celular, mediando a entrada do vírus (endocitose), 2) fusão dependente de pH em vesículas lisossomais, 3) montagem da partícula viral e 4) indução de resposta imune incluindo a geração de anticorpos neutralizantes (Schlesinger *et al.*, 1983; Heinz *et al.*, 1986; Barrett *et al.*, 1989; Guirakhoo *et al.*, 1989).

A elucidação da estrutura atômica tridimensional da proteína E (ectodomínio) foi determinada inicialmente para TBEV e posteriormente, para DEN2 e JEV (Rey *et al.*, 1995; Modis *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003). Ambas as estruturas são expressas na forma de dímeros, em que cada monômero possui três domínios definidos (Figura 1.3). O domínio central da molécula (domínio I) está flanqueado, por um dos lados, pelo domínio de dimerização (domínio II), o qual contém o peptídeo de fusão em sua porção distal. Do outro lado do domínio I, encontra-se o domínio tipo imunoglobulina (domínio III), o qual possui sítios de ligação a receptores (glicosilados) e alvo de anticorpos neutralizantes (Beasley & Barrett, 2002). Alterações em resíduos específicos do domínio III foram capazes de modificar o fenótipo do vírus da febre amarela, quanto ao neurotropismo ou atenuação (Lee & Lobigs, 2008).

Há certa flexibilidade entre os domínios I e II que facilita mudanças conformacionais, pela qual passa o vírus durante a maturação e fusão (Modis *et al.*, 2003). As mudanças conformacionais da proteína E estão representadas na Figura 1.2. Na forma madura do vírion, a proteína E é encontrada sob forma de 90 homodímeros sobre a superfície do vírus, formando uma “capa” de proteínas não espiculadas (Figura 1.2D). A porção restante C-terminal de cada monômero da glicoproteína E compõe a haste-âncora (HA). A região de HA, correspondente aos últimos 100 aminoácidos da proteína E, é composta por duas regiões alfa-hélices que formam a haste (H1 e H2), separadas por uma seqüência conservada de conexão (CS) e por dois elementos transmembrana (TM1 e TM2) que formam a âncora, a qual se insere na membrana do RE durante a replicação viral e mantém a proteína de Envelope ancorada até o empacotamento viral (Allison *et al.*, 1999). A Figura 4.16A (seção Resultados)

esquematisa o arranjo estrutural da região de haste-âncora. O elemento TM1 age como um sinal de parada de transferência da proteína prM no RE, enquanto que o elemento TM2 age como seqüência sinal de translocação da proteína E para o lúmen do RE (Op De Beeck *et al.*, 2004) e também atua como seqüência sinal para a proteína NS1 (Rice, 1996).

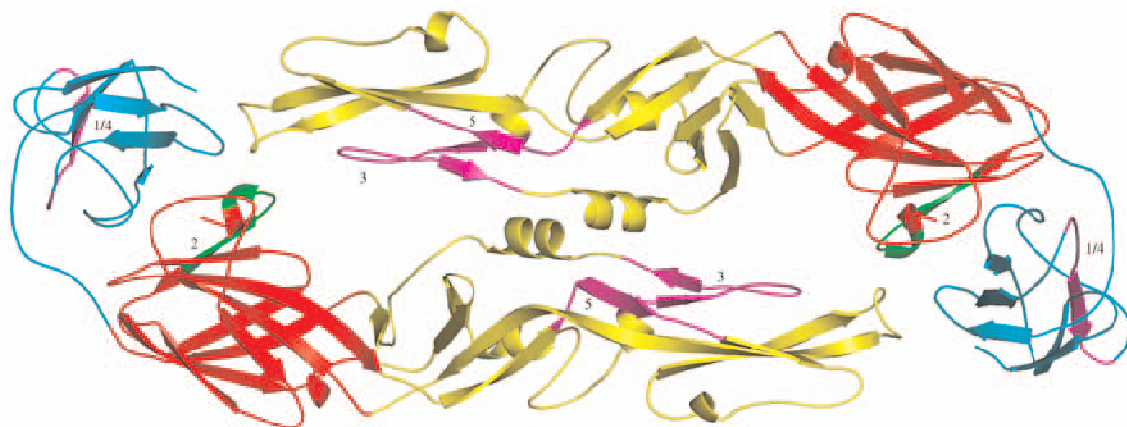


Figura 1.3 – Modelo estrutural em 3D da proteína E do vírus da febre amarela YF 17D, na sua forma dimérica. Domínio I (central) está mostrado em vermelho, domínio II (dimerização) está mostrado em amarelo e o domínio III (de ligação a receptores), em azul. Adaptado de Bonaldo *et al.*, 2006.

As proteínas não-estruturais estão envolvidas com a regulação da transcrição, tradução e replicação viral, além de atenuar resposta antiviral do hospedeiro (Chung *et al.*, 2006). Entre os diferentes flavivírus, três das proteínas não-estruturais possuem seqüências muito conservadas: NS1, NS3 e NS5. A proteína NS1 (PM de 46 a 50 kDa) pode permanecer associada à superfície celular e/ou ser secretada extracelularmente na forma de homodímeros (Winkler *et al.*, 1988, 1989). A NS1 é encontrada no soro de pacientes infectados com WNV e DENV, o que é correlacionado com a gravidade da doença (Young *et al.*, 2000). É tida como uma proteína multifuncional, pois desempenha um papel na replicação, na montagem viral e na modulação do sistema imune inato. Alguns trabalhos exemplificam estas hipóteses, mostrando que NS1 atua como co-fator na replicação viral, já que co-localiza com a forma replicativa de RNA dupla-fita (Mackenzie *et al.*, 1996) e que mutações em NS1 podem atenuar a síntese de RNA (Muylaert *et al.*, 1996, 1997). Um estudo recente indicou que mutações em um motivo peptídico no N-terminal de NS1 (imediatamente após a seqüência-sinal de clivagem) podem ser responsáveis pela retenção ou liberação de NS1 à membrana do RE, em YF, DENV ou WNV (Youn *et al.*, 2010). A expressão de NS1 parece variar de acordo com o vírus, pois Youn e equipe verificaram que a infecção por DENV está mais

associada à secreção de NS1 ao meio extracelular do que a infecção por YF e WNV, que parece reter esta proteína na superfície celular (Youn *et al.*, 2010).

Quanto à modulação do sistema imune, estudos mais recentes indicaram que NS1 de DENV, ao contrário do que se acreditava, não parece exercer imunidade protetora por interferir na ativação do sistema de complemento, mas sim o de evadir o sistema imune através da formação de complexos imune por anticorpos, consumindo complemento e retardando a formação do complexo de ataque (C5b-C9) em células infectadas (Chung *et al.*, 2006). Por outro lado, estudos mostraram que a imunização com a proteína purificada ou com anticorpos monoclonais contra NS1 de DENV, YFV ou WNV, protegeu camundongos desafiados com dose letal do vírus (Gould *et al.*, 1986; Faulgot *et al.*, 1990; Chung *et al.*, 2006). Estudos mais recentes de vacinação em camundongos com plasmídeos de DNA contendo sequências de NS1 provenientes de DENV-2 e de JEV demonstraram induzir a produção de anticorpos neutralizantes e a sobrevivência de camundongos desafiados (Mellado-Sánchez *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2010).

A proteína NS3, também é uma enzima multifuncional e possui três atividades conhecidas: 1) protease, 2) helicase e 3) nucleotídeo trifosfatase (NTPase) e RNA trifosfatase (RTPase). Os 184 aminoácidos da porção N-terminal de NS3 são responsáveis pela atividade enzimática de protease e estão compreendidos no domínio I. Existem ainda dois domínios desta proteína, que consistem de 450 aminoácidos, os quais permitem as atividades de helicase e RTPase. A atividade de protease é formada por um complexo de NS3 e o seu cofator NS2B, e que cliva a poliproteína na face citoplasmática da membrana do retículo endoplasmático (RE) entre as proteínas C e prM, NS2A e NS2B, NS2B e NS3, NS3 e NS4A e entre NS4B e NS5. Mais recentemente, verificou-se que NS3 também desempenharia um papel essencial na montagem do vírus independente das suas funções enzimáticas (Patkar & Kuhn, 2008).

Outras funções têm sido sugeridas para NS3, demonstrando sua interação com outras proteínas da célula do hospedeiro. Foi visto que a infecção por DENV pode modular a biosíntese de ácido graxo para aumentar a síntese de lipídeos com a finalidade de estabelecer ou expandir o complexo replicativo. A proteína NS3 purificada demonstrou ser capaz de aumentar a atividade da sintase de ácido graxo (FASN, *fatty acid synthase*) *in vitro* (Heaton *et al.*, 2010). Os ácidos graxos produzidos, assim em maior quantidade poderiam ser incorporados na membrana do RE, levando a modificações na membrana que culminariam na curvatura desta, contribuindo para a indução das vesículas replicativas virais. Além disso, o nosso grupo demonstrou que NS3 está associada a uma proteína do hospedeiro, Alix, um

componente do complexo endosomal celular requerido para transporte, denominado ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) que reconhece proteínas ubiquitinadas destinadas à degradação através da formação de corpos multivesiculares endossomais (Carpp *et al.*, 2011). O vírus de FA é capaz de recrutar Alix, através da proteína NS3, cujo motivo (YPTI) foi mapeado no domínio de helicase, com a finalidade de auxiliar a morfogênese e liberação das partículas infectivas de YFV. Além disso, foi visto que o sobrenadante obtido de células negativas para Alix e infectadas por YFV apresentava títulos virais reduzidos em relação ao controle, porém a superprodução de NS3 foi capaz de recuperar o defeito quanto à liberação das partículas infectivas (Carpp *et al.*, 2011).

A proteína NS2A, de 24 kDa, é a primeira das quatro pequenas proteínas hidrofóbicas (NS2A, NS2B, NS4A e NS4B). O perfil hidrofóbico dessas proteínas sugere uma possível interação com membranas (Chambers *et al.*, 1990; Brinkworth *et al.*, 1999). Foi visto que em WNV, NS2A é a proteína responsável por bloquear a transcrição pelo promotor de IFN- $\beta$  (mediador da resposta imune inata contra infecções virais) e que uma única substituição de aminoácido é capaz de reduzir esse efeito inibitório (Liu *et al.*, 2004). Além disso, esses mutantes demonstraram ser mais atenuados em ensaios de neurovirulência em camundongos, embora a mutação não tenha alterado os níveis de anticorpos produzidos nem a imunidade protetora frente a um desafio com uma cepa virulenta de WNV (Liu *et al.*, 2006).

A proteína NS2B, de 14 kDa, é essencial para a atividade de protease da NS3, atuando como co-fator para a ativação proteolítica de NS3 (Chambers *et al.*, 1990; Falgout *et al.*, 1991). Um estudo molecular da estrutura formada por NS2B e NS3 revelou que o complexo NS2B-NS3pro (protease) é mais rígido do que a proteína NS3 sozinha devido principalmente à ligações hidrofóbicas no complexo e que NS2B tem a função de facilitar o desdobramento do domínio de protease de NS3 bem como a de diretamente interagir com o substrato de ligação (Zuo *et al.*, 2009).

Não se têm evidências diretas sobre a função das proteínas NS4A e NS4B. No entanto, estudos recentes sugerem que a proteína NS4A está ancorada à membrana do retículo e interage com as proteínas NS1, NS3 e NS5 (Lindenbach & Rice, 1999; Westaway *et al.*, 2003). A proteína NS4B possui uma hélice anfipática na sua região N-terminal que é seguida por quatro domínios transmembranares em sua porção central (Elazar *et al.*, 2004). Alguns estudos demonstraram que durante a replicação viral, a proteína NS4B está localizada preferencialmente no núcleo e no RE, e parece estar envolvida na inibição da síntese de interferon, mas seu papel ainda não foi determinado (Lindenbach & Rice, 2003). Outros evidenciaram que NS4B é capaz de provocar rearranjos na membrana do RE formando um

“foco de membranas” (MAFs, *membrane associated foci*”) em que se encontra também RNA, indicando que NS4B está envolvida com a criação de sítios onde ocorre a síntese do genoma viral (Jones *et al.*, 2009). Além disso, em relação à resposta imune induzida pelas proteínas virais, NS4B demonstrou ser um componente imunodominante ao induzir cerca de 42% das células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  totais de indivíduos HLA-A2<sup>+</sup> vacinados com YF 17D, enquanto que a resposta imune induzida pelas outras proteínas virais não foi de mesma magnitude (Akondy *et al.*, 2009).

Já a função da NS5, a maior, em torno de 100 kDa e mais bem conservada dentre os flavivírus é bem descrita como uma RNA polimerase RNA-dependente (Rice *et al.*, 1986). Esta proteína forma um complexo com a proteína NS3 e pode estimular suas atividades de nucleotídeo-trifosfatase e helicase (Yon *et al.*, 2005). A NS5 atua ainda como uma metiltransferase (MTase), metilando a estrutura de *cap* no RNA viral (Lindenbach & Rice, 2000) e pode ser uma das proteínas responsáveis por inibir a produção de IFN- $\beta$  na célula, se ligando a STAT2 (*Signal Transducers and Activators of Transcription protein*), requerido para a sinalização de IFN, reduzindo a expressão desta citocina (Ashour *et al.*, 2009).

### **1.1.2. Ciclo de replicação viral**

Os Flavivirus entram nas células hospedeiras por endocitose mediada pela interação com receptores (Lindenbach & Rice, 2003). O baixo pH do ambiente do endossomo resulta em mudanças conformacionais na proteína E expondo o peptídeo de fusão, permitindo a fusão com a membrana do endossomo e a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. A proteína C dissocia-se do RNA e a replicação do genoma e montagem de novas partículas inicia-se (Lindenbach & Rice, 2001). Assim que o genoma é liberado no citoplasma, o RNA é traduzido em uma poliproteína que é clivada *co* e pós-traducionalmente por proteases virais e celulares. A replicação ocorre nas membranas intracelulares. Durante o processo de tradução da poliproteína, algumas proteínas virais são translocadas ao retículo endoplasmático através de seqüências-sinais e, ancoradas no mesmo através de seus domínios de ancoragem à membrana. A proteína C contém uma seqüência sinal hidrofóbica em sua porção C-terminal, que transloca a proteína prM para o lúmen do RE. A prM, por sua vez, contém dois domínios transmembrana, um com sinal de retenção e outro com uma seqüência sinal, resultando na translocação da proteína E ao lúmen do RE. Por fim, uma seqüência sinal na porção carboxila da E, é responsável pela translocação da proteína NS1 ao RE (Falgout *et al.*, 1989). As partículas imaturas são transportadas pelo Trans-Golgi (TGN), onde a clivagem pela furina de



prM em pr e M leva à formação de partículas infecciosas, que deixam a célula por exocitose. A Figura 1.4 mostra o ciclo de replicação dos flavívirus.

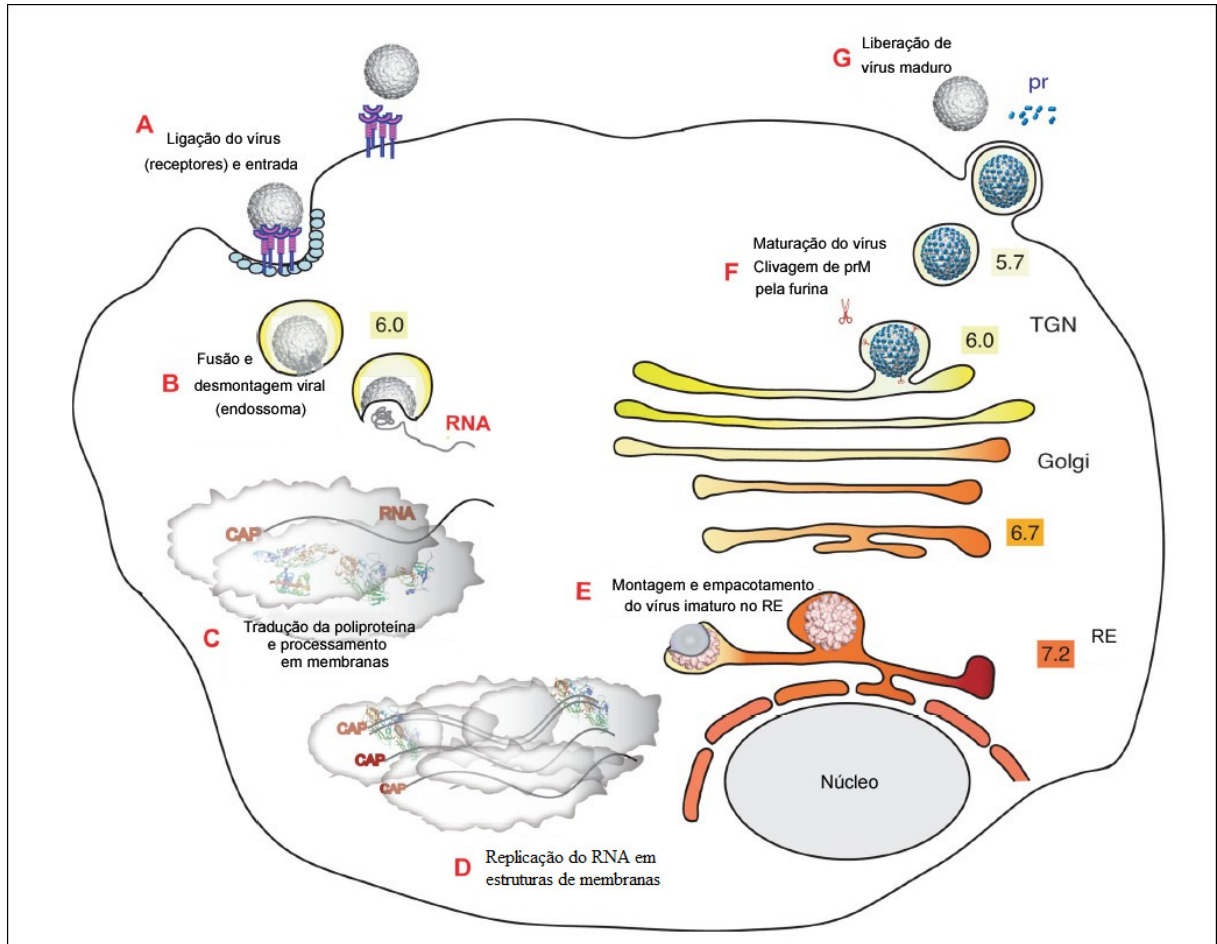


Figura 1.4 – Ciclo de replicação dos flavívirus. A) Vírus se liga à superfície celular por receptores que medeiam a endocitose. B) Em baixo pH (endossomo), as glicoproteínas virais medeiam a fusão das membranas virais e do endossomo, permitindo a desmontagem viral e liberação do RNA no citoplasma. C) O RNA viral é traduzido em uma poliproteína que é processada por proteases virais e do hospedeiro. D) As proteínas não-estruturais replicam o genoma de RNA. E) A montagem do vírus imaturo ocorre na membrana do RE e ocorre o empacotamento do RNA viral e do capsídeo pela membrana do RE. F) Partículas imaturas são transportadas pela via secretora do Trans-Golgi (TGN), onde ocorre a maturação do vírus pela clivagem de prM pela furina. F) O vírus maduro é liberado no citoplasma. Os números mostrados referem-se ao pH dos respectivos compartimentos. Fonte: adaptado de Perera *et al.*, 2008.

## 1.2. O vírus da Febre Amarela

### 1.2.1. Breve Histórico

O vírus da Febre Amarela é o protótipo do gênero *Flavivirus* e foi o primeiro vírus reconhecido como agente etiológico de uma doença em humanos, transmitido por mosquitos. A descrição mais antiga sobre a Febre Amarela é a de um manuscrito maia, de 1648 (Monath, 1996). Porém, análises filogenéticas descreveram uma relação de evolução do vírus da Febre Amarela com outros vírus também transmitidos por mosquitos, em torno de 3.000 anos atrás (Zanotto *et al.*, 1996), provavelmente na África.

Em 1900, uma comissão liderada por Walter Reed indicou a presença de um agente filtrável da febre amarela no sangue dos doentes e confirmou que a doença era transmitida de homem para homem pelo mosquito *Aedes aegypti*, como principal vetor (Reed & Carroll, 1902). Esta proposta, na verdade, havia sido feita inicialmente pelo cubano Carlos Finlay em 1881. Algumas décadas após, Stokes, Bauer e Hudson mostraram que macacos *rhesus* eram suscetíveis à doença, se inoculados com sangue de pessoas infectadas. O isolamento do vírus e o estabelecimento deste modelo animal possibilitaram, portanto o desenvolvimento da vacina atenuada para Febre Amarela YF 17D.

A Febre Amarela possui três modos epidemiológicos de transmissão: o ciclo urbano, em que o homem é o único hospedeiro, o silvestre, em que ocorrem infecções acidentais e uma terceira forma de transmissão intermediária, a que combina as duas situações acima. Todas as formas de transmissão levam a formas clínicas idênticas. Nas Américas, o vírus da FA circula através do ciclo silvestre, que resulta em até centenas de novos casos em trabalhadores não imunes das florestas por ano. Devido às campanhas de erradicação do *Aedes aegypti* pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), casos de febre amarela urbana não são reportados desde 1954, a despeito da intensa re-infestação do mosquito (Monath, 2001). A febre amarela silvestre, por ser uma zoonose, é impossível de ser erradicada. No Brasil, a manutenção do ciclo silvestre de transmissão é o responsável pelos casos de febre amarela em seres humanos. Na África, o vírus circula através de ambos os ciclos: urbano e silvestre, ocasionando epidemias em grande número de pessoas. No Brasil, o primeiro caso de febre amarela urbana aconteceu na Bahia, em 1685, ocorrendo somente outra epidemia em 1849, também na Bahia. No período entre 1850 e 1899 a doença se disseminou pelo país e a última epidemia urbana registrada foi em 1929, no Rio de Janeiro. A febre

amarela urbana continuou a ocorrer de maneira pouco expressiva, até 1942 (Franco, 1969). No período de novembro de 2008 a março de 2009, entretanto, o estado do RS confirmou 8 casos de febre amarela silvestre, com 5 óbitos, enquanto que em SP, no período de março a abril de 2009, foram confirmados 22 casos, com 9 óbitos. São consideradas áreas de risco para febre amarela os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Minas Gerais, Distrito Federal e áreas específicas do Piauí, Bahia, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

### **1.2.2. A vacina para febre amarela**

O primeiro isolamento do vírus da febre amarela ocorreu através de passagens sucessivas em macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) em 1927 a partir de amostras do sangue de um homem, chamado Asibi. Este vírus, que recebeu o nome do seu doador, foi identificado como a linhagem selvagem virulenta do vírus da febre amarela (Stokes *et al.*, 1928). A cepa original YF17D desenvolveu-se após 176 passagens da cepa Asibi, sendo as primeiras passagens realizadas através de inoculações intracerebrais em camundongos e macacos e posteriormente, em tecido de aves (Theiler & Smith, 1937). O processo de atenuação da cepa selvagem de Asibi prosseguiu com novas passagens sucessivas em tecido embrionário de galinha desnervado, o que possibilitou a redução do neurotropismo e viscerotropismo do vírus. A Figura 1.5 ilustra o histórico de passagens de vírus vacinais de febre amarela a partir da cepa selvagem Asibi.

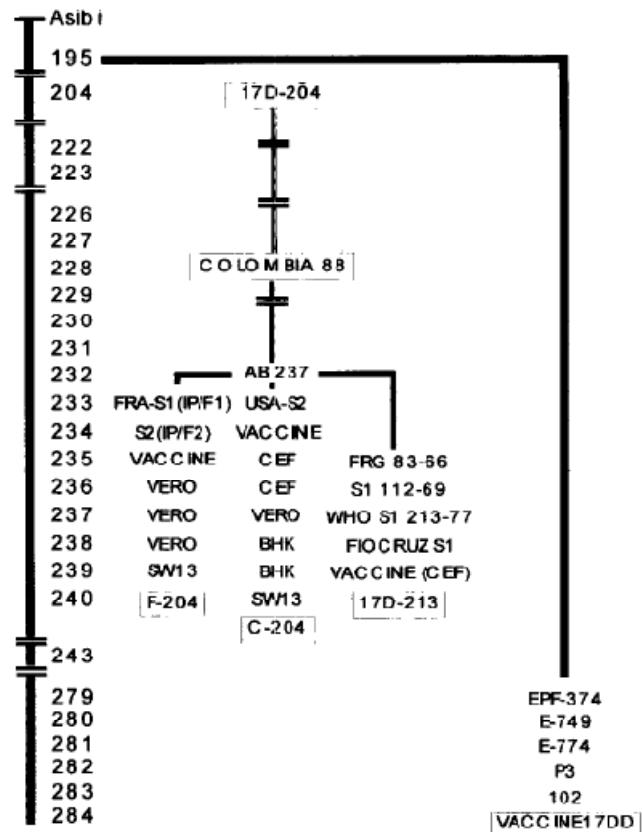


Figura 1.5 – Histórico de passagens da linhagem Asibi e derivação das cepas vacinais do vírus YF 17D e seus subcultivos. Fonte: Galler *et al.*, 1998.

A cepa 17D originou os genótipos 17DD na passagem 195 e 17D-204 na passagem 204 (Galler *et al.*, 1998). O 17DD foi novamente cultivado até a passagem 243 e sofreu mais 43 passagens adicionais em embriões de galinha até chegar ao lote-semente vacinal hoje usado, na passagem 284. A cepa 17D-204 foi passada para produzir a cepa Colombia 88, a qual originou as vacinas usadas atualmente na França (passagem 235) e nos EUA (passagem 234). Estas cepas 17D-204 foram posteriormente purificadas por placa de lise em linhagens celulares diferentes e utilizadas para obtenção de clones de cDNA (F-204) ou análise de seqüência (C-204). A cepa 17D-213 foi obtida da cepa 17D-204 para se produzir uma semente de 17D livre do vírus da leucose aviária e esta semente, por sua vez, foi utilizada para preparar uma semente primária na Fiocruz (FIOCRUZ-S1) (Post *et al.*, 2001). Duas sub-cepas de YF 17D são utilizadas para vacinação hoje em dia: 17D-204 e 17DD, as quais estão nas passagens 235-240 e 287-289, respectivamente, em relação a cepa Asibi. Enquanto que 17DD é usada no Brasil (produzida exclusivamente por Bio-Manguinhos), 17D-204 é usada no resto do mundo (Monath, 1999).

Duas vacinas atenuadas foram desenvolvidas na década de 30: a Vacina Neurotrópica Francesa (FNV), oriunda do vírus selvagem de Asibi submetido a passagens em cérebro de camundongo, e a vacina YF 17D, oriunda do vírus selvagem de YF submetido a passagens em ovos embrionados de galinha. A FNV, no entanto, apesar de ter sido administrada entre 1939 e 1952, foi associada a uma alta incidência de reações encefálicas em crianças e sua produção foi descontinuada em 1980. Dessa forma, YF 17D é o único tipo de vacina contra a Febre Amarela produzida atualmente, sendo que apenas três produtores: no Brasil (Bio-Manguinhos, Fiocruz), França (Sanofi-Pasteur) e Senegal (Pasteur Institute) são certificados pela Organização Mundial da Saúde (WHO) para produção da vacina (Monath *et al.*, 2007).

A cepa YF 17D foi trazida ao Brasil em 1937 (passagem de número 229) e o modelo de lote-semente foi desenvolvido a fim de diminuir a variabilidade na produção da nova vacina e garantir a segurança desta (Post *et al.*, 2001). Problemas iniciais relacionados a muito ou pouca atenuação (início dos anos 30), quando a vacina YF 17D começou a ser usada, foram resolvidos com a implantação de um sistema de lote-semente em 1945. Esta vacina demonstrou ser bastante efetiva contra a Febre Amarela durante surtos e em períodos intermediários de epidemias. Em 1990, a recomendação foi a de que todos os países com risco de Febre Amarela incorporassem a vacinação em seus calendários de imunização.

### **1.2.3. Reações adversas após vacinação com YF 17D**

Apesar das boas propriedades vacinais, alguns casos raros de eventos adversos foram reportados, como: 1) reações de hipersensibilidade - mais associado a proteínas do ovo, meio de cultura para a vacina; 2) eventos neurológicos e 3) eventos viscerotrópicos.

Menos do que 25% dos vacinados desenvolvem sintomas sistêmicos moderados, que incluem dor de cabeça, mialgia, desconforto na região da imunização ou febre baixa, 2 a 6 dias após a vacinação (Monath, 2001). Já as reações neurológicas são extremamente raras, sendo que a maioria dos casos de eventos adversos neurológicos reduziu-se após introdução do sistema lote-semente. Estima-se que estes eventos ocorram em até 0,4 por 100.000 doses administradas da vacina (McMahon *et al.*, 2007). Os casos raros de encefalites estiveram associados a crianças menores de seis meses, idosos ou pacientes com imunodeficiências (Lindsey *et al.*, 2008). O maior risco em crianças pode estar relacionado à indução de títulos virêmicos maiores do que em adultos (ou mais prolongados), além da susceptibilidade devido à barreira hemato-encefálica. Os primeiros casos de eventos viscerotrópicos foram descritos

mais recentemente (Chan *et al.*, 2001; Vasconcelos *et al.*, 2001), sendo que a determinação da viremia é um marcador para viscerotropismo e é a base dos testes de segurança aplicados em macacos *Rhesus* para liberação de lotes da vacina YF 17D (WHO, 1998). Os títulos de anticorpos neutralizantes mostraram estar acentuados em alguns dos casos de eventos adversos, quando comparados com indivíduos saudáveis, no entanto, isto não se correlacionou com os dados clínicos de uma paciente de 23 anos de idade que apresentou neurotropismo e viscerotropismo combinados (Silva *et al.*, 2010). Neste caso, a paciente apresentou uma resposta celular exacerbada além de uma produção elevada de citocinas plasmáticas.

Diante de inúmeros trabalhos que avaliaram casos de eventos adversos associados à vacina YF 17D, algumas hipóteses que incluíram tanto características virais quanto do hospedeiro puderam ser postuladas para explicar a base destes eventos (revisado por Silva *et al.*, 2010). A reversão genética de YF 17D em uma cepa mais virulenta foi raramente reportada, enquanto que determinados fatores do hospedeiro, como idade avançada, histórico de doença do timo e imunocomprometimento do sistema imune foram mais fortemente associados e apontados como fatores de risco para o desenvolvimento de eventos adversos (Barwick, 2004; Khromava *et al.*, 2005).

#### **1.2.4. Análise molecular da atenuação do Vírus da Febre Amarela**

As seqüências nucleotídicas do genoma das cepas selvagem Asibi (Hahn *et al.*, 1987a), vacinais 17D-213 e 17DD (Dos Santos *et al.*, 1995) e 17D-204 (Rice *et al.*, 1985) foram determinadas. Foram detectadas 67 diferenças nucleotídicas que resultaram em 31 resíduos de aminoácidos modificados entre a cepa Asibi e as seqüências genômicas de cepas 17D-204 (Hahn *et al.*, 1987a). Já 17D-204 difere de 17DD por 10 aminoácidos, sendo que o genótipo 17DD é o mais estável geneticamente (Galler *et al.*, 1998). Além disso, foi visto que a proteína E acumula a mais alta taxa de substituições não conservadas em relação à cepa Asibi e a YF 17D (Galler *et al.*, 1998).

Entretanto, ainda não está claro que mutações estão diretamente associadas com a atenuação ao longo das passagens virais ou que determinantes moleculares codificam para viscerotropismo ou neurotropismo (Galler *et al.*, 2001). Além disso, sabe-se que a virulência é um produto de vários genes, determinado tanto pelos genes estruturais quanto não-estruturais (revisado por Monath, 2001). Os dados mostram que tanto os fatores associados a eventos viscerotrópicos quanto neurotrópicos são mais relacionados a uma resposta anormal do sistema imune do indivíduo do que com a vacina por si (Silva *et al.*, 2010) e que apesar de

terem havido raros eventos adversos, o vírus vacinal 17D está entre as mais seguras e efetivas vacinas virais existentes (Monath, 1999).

### **1.2.5. A resposta imunológica para o vírus da Febre Amarela**

A vacina YF 17D é utilizada em todo o mundo há 70 anos com mais de 400 milhões de doses administradas (Monath, 2001). Acredita-se que a proteção em indivíduos vacinados é mediada em grande parte por anticorpos para a proteína de envelope (E) e proteína não-estrutural NS1, que perduram por mais de 35 anos (Polland *et al.*, 1981; Lobigs *et al.*, 1987 e Brandriss *et al.*, 1990). Foi mostrado que tanto a imunização ativa com a proteína E do vírus da FA ou proteína NS1, quanto uma imunização passiva com anticorpos monoclonais direcionados a estas proteínas promoveram uma proteção de camundongos e macacos contra um desafio letal pelo VFA (Schlesinger *et al.*, 1985, 1986, Brandriss *et al.*, 1986).

Enquanto que o vírus da febre amarela selvagem induz alta viremia em macacos e humanos, a vacina YF 17D induz um título mínimo de vírus circulando no sangue e ocorre nos humanos desde o 4º dia até o 10º dia, com pico entre o 5º e o 7º dia pós-vacinação. A queda da viremia corresponde ao período em que se detecta elevação dos anticorpos neutralizantes (8º a 9º dia pós-vacinação). No entanto, níveis de proteção parciais foram relatados em macacos vacinados com YF 17D e que foram desafiados 1 a 3 dias após (antes do aparecimento de anticorpos) com vírus virulento de FA, sugerindo que níveis baixos de anticorpos podem ser protetores (Mason *et al.*, 1973)

A sobrevivência de animais desafiados em 1 ou 3 dias após vacinação com YF 17D sugere que mecanismos da resposta inata também possam ter um papel essencial na resposta imune ao vírus da febre amarela (revisado por Pulendran, 2009). Nesse sentido, as células dendríticas (DCs) desempenham papel fundamental em reconhecer esses micróbios e em integrar esta informação para iniciar e modular a resposta imune adaptativa. O vírus YF 17D é capaz de se replicar minimamente em DCs humanas imaturas e maduras. Além disso, as células DCs infectadas são capazes de processar e apresentar epítomos do genoma viral ou heterólogos para os linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Barba-Spaeth *et al.*, 2005). Aliado a este resultado, Querec e equipe (2006) demonstraram que a ativação das células dendríticas pelo vírus YF 17D ocorre através de vários receptores do tipo Toll (TLRs): TLR2, TLR7 e TLR8 e TLR9, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias potentes, como IL-12, IL-6 e de IFN tipo I, que vão mediar a resposta imune adaptativa. Apesar de não se conhecer que

componentes virais exatamente induzem os TLRs, é possível que TLR7 e TLR8 sejam induzidos pelo ácido nucleico viral (Takeuchi & Akira, 2009). O engajamento de múltiplos TLRs tem um significado biológico peculiar da vacinação com YF 17D: o engajamento de uma resposta imune balanceada do tipo Th1 e Th2 (Querec *et al.*, 2006).

Outros componentes importantes na imunidade inata são constituídos pelas células NK (do inglês Natural Killer). Viu-se que estas podem atuar limitando a viremia, atuando em conjunto com as DCs na geração de resposta imune adaptativa (Moretta *et al.*, 2002). A vacinação com YF 17D por sua vez, é capaz de ativar células NK, demonstrado pela presença de marcadores de superfície, como CD69 e antígenos leucocitários humanos (HLA-DP, DQ e DR de MHC classe II) dois dias após vacinação com YF 17D (Neves *et al.*, 2009). Essa ativação é dependente de TLR3 e TLR9, induzido por RNA dupla-fita, o que requer que o vírus esteja se replicando. Como consequência, as células NK se tornam fortemente citotóxicas e produzem IFN- $\gamma$ , contribuindo para a geração de uma resposta Th1 prevalente. Além das células NK, o sistema imune inato contribui com o aumento de ativação de fagócitos mononucleares, monócitos e macrófagos, relevantes para a rápida eliminação do vírus circulante (Martins *et al.*, 2008).

Dentre os vários mecanismos imunológicos efetores da imunidade adquirida, os linfócitos T são críticos para a resolução das doenças infecciosas (Yewdell e Haeryfar, 2005), já que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> possuem mecanismos efetores para suprimir a replicação de patógenos infecciosos in vivo (Letvin, 2006; Tsuji e Zavala, 2003). Vários estudos focaram nos aspectos da imunidade humoral para YF 17D, no entanto, a resposta imune celular pós-vacinação com YF 17D ainda está sendo esclarecida, com um crescente número de trabalhos nesta área.

A sugestão de uma resposta imune mediada por células foi inicialmente proposta por Reinhardt e equipe (1998), que demonstraram a ocorrência de um aumento significativo no número de linfócitos T CD8<sup>+</sup> já a partir do 5º dia pós-vacinação com YF 17D. Os primeiros trabalhos que identificaram epítomos específicos das proteínas do vírus vacinal YF 17D, responsáveis por induzir linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, foram os de Co e equipe (2002), além de Van der Most e equipe (2002). Co e equipe identificaram em humanos de MHC HLA-B35, células T citotóxicas específicas direcionadas a epítomos das proteínas E, NS1, NS2B e NS3, que são induzidas antes do 14º dia pós-vacinação e são mantidas por mais de 18 meses. Van der Most e equipe relataram dois epítomos T CD8<sup>+</sup> restritos ao MHC murino H-2D<sup>b</sup>, presentes nas proteínas E e NS3 e um epítomo T CD4<sup>+</sup> na proteína E, tendo sido estas duas proteínas os maiores alvos de resposta imune celular induzida pelo vírus YF 17D.



Trabalhos anteriores, que mapearam o genoma de outros flavivírus em busca de determinantes antigênicos reconhecidos por células T citotóxicas de variados haplótipos murinos também identificaram a proteína NS3 como fonte principal de peptídeos antigênicos (Hill *et al.*, 1992; Lobigs *et al.*, 1994). Dentre as proteínas estruturais de YF 17D, foi visto que a proteína E contém epítomos indutores de células T, sendo o repertório destes, constituído em sua maioria por epítomos reconhecidos por células T CD4<sup>+</sup> (Maciel *et al.*, 2008). Posteriormente, foi demonstrado que além das proteínas E e NS3, todas as outras proteínas de YF 17D possuem determinantes imunogênicos indutores de T CD8<sup>+</sup> em humanos (Akondy *et al.*, 2009).

A análise da cinética de indução de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> mostraram que estas células entram em uma fase de expansão massiva em resposta ao antígeno que perdura até o 14º dia, até que gradualmente se diferenciam as células de memória de longa duração (Miller *et al.*, 2008). Em um estudo longitudinal de diferenciação de células T CD8<sup>+</sup> de memória em humanos vacinados com YF 17D, viu-se que a imunização é capaz de induzir células T CD8<sup>+</sup> de memória polifuncionais e persistentes (por mais de 2 anos pós-vacinação), que são mantidas de forma antígeno-independente (Akondy *et al.*, 2009).

Sabe-se que a produção de mediadores solúveis, como IL-4, TNF- $\alpha$  e interferons (IFN) desempenham importantes papéis durante a infecção por FA. Santos e equipe (2008) demonstraram a indução em humanos de majoritariamente IFN- $\gamma$  em 7, 15 e 30 dias após vacinação com YF 17DD. Um importante aspecto da vacinação com o vírus YF 17D é a sua capacidade peculiar de induzir uma produção precoce de IFN- $\gamma$  (5º a 7º dia pós-vacinação). Porém, ao invés de uma resposta clássica de T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>, observou-se que esta produção inicial de IFN- $\gamma$  provinha de células T CD8<sup>+</sup> de TCR gama-delta ativadas e de T CD4<sup>+</sup> ativadas no 7º dia pós-vacinação (Neves *et al.*, 2010).

Com o advento de tecnologias de alta performance e com o recente avanço em sistemas biológicos que podem predizer perfis de expressão gênicos e moléculas que são induzidas após vacinação, permitiu-se uma análise multivariada da imunidade induzida pela vacinação com YF 17D (Gaucher *et al.*, 2008; Querec *et al.*, 2009). A indução de um perfil balanceado Th1 / Th2 pela vacinação com YF 17D tem sido recentemente confirmado por vários trabalhos que demonstram que o vírus é capaz de induzir a produção de citocinas por células T CD4<sup>+</sup> que contribuem para os dois tipos de resposta: Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2 ou TNF- $\beta$ ) e Th2 (IL-4, IL-5 ou IL-10) (Querec *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2010). Além disso, foi visto que células T auxiliares de memória central, presentes no sangue de indivíduos vacinados há 365 dias, expressam marcadores de superfície típicos de Th1 ou Th2 quando estimulados com peptídeos de YF 17D (Gaucher *et al.*, 2008). Este tipo de resposta imune,

indutor tanto de resposta humoral (Th2) quanto celular (Th1) está intimamente relacionado com a eficácia da vacinação com YF 17D (Querec *et al.*, 2006).

### 1.3. Desenvolvimento de vacinas virais recombinantes: o uso do vírus YF 17D como vetor para expressão de antígenos heterólogos

A idéia de se usar vírus como veículos para “entregar” genes que combatem doenças, traz novas perspectivas ao mundo atual. Os vírus vivos atenuados que já vem sendo utilizados como vacinas são vantajosos, pois permitem o uso da metodologia estabelecida de produção em grande escala e de baixo custo para vacinação em massa e constituem abordagens de interesse (revisado em Liniger *et al.*, 2007).

O vírus vivo atenuado YF 17D constitui uma das vacinas mais seguras administradas atualmente e é capaz de induzir imunidade duradoura com apenas uma dose. Esta vacina é capaz de preencher alguns dos pré-requisitos necessários para novos candidatos vacinais, que são: eficácia e segurança comprovada, condições de produção em larga-escala e capacidade de induzir múltiplas vias imunológicas. O uso de outros vetores virais ainda encontra-se sob avaliação quanto à segurança, imunogenicidade, eficácia e potencial oncogênico (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 – Vacinas virais recombinantes para uso humano e veterinário

Vírus vetores	Uso	Antígeno-alvo	Situação	Características do vetor/vacina
<b>Adenovírus</b>		HIV-1	Fase IIb	Replicação-deficiente; metodologia estabelecida; boa resposta CTL, CD4 <sup>+</sup> e Ac; fácil manipulação; alta dose necessária; pré-imunidade em humanos; integração ao genoma
Ad5 (humano)	Humano	<i>P. falciparum</i>	Fase I / IIa	Replicação-deficiente; não há pré-imunidade; boa resposta humoral; metodologia complexa; segurança não estabelecida; integração ao genoma
	Veterinário	Febre aftosa	Pré-clínica	
Ad35 (humano)	Humano	SIV, <i>M. tuberculosis</i>	Pré-clínica	Não há pré-imunidade; metodologia em desenvolvimento; segurança não estabelecida; pouca imunogenicidade; alta dose necessária
<b>Herpes vírus simplex (HSV)</b>	Humano	HIV	Pré-clínica	Replicação-deficiente; não há pré-imunidade; boa resposta humoral; metodologia complexa; segurança não estabelecida; integração ao genoma
<b>Alfavírus Venezuelán equine</b>	Humano	HIV-1	Fase I	Replicação-deficiente; não há pré-imunidade; boa resposta CTL e Ac; metodologia complexa para produção

<i>encephalitis</i> ( <i>Sindbis</i> ; <i>Semliki</i> <i>Forest vírus</i> )				em massa; segurança não estabelecida em humanos; instabilidade
<b>Flavivírus</b> Quimeras YF 17D	Humano	dengue	Fase IIb/III	Vírus atenuado; segura e imunogênica em humanos; soroconversão para os quatro sorotipos; resposta CD4 <sup>+</sup> Th1 e CD8 <sup>+</sup> ; metodologia estabelecida; pré-imunidade ao vetor; limitação tamanho inserto (vetor)
		JEV	Em registro	Vírus atenuado; segura e imunogênica em humanos; 100% soroconversão
	Veterinário	WNV	Fase II	Vírus atenuado; segura e imunogênica em humanos ; boa resposta celular
		WNV	Certificada (EUA)	Vírus atenuado; segura e eficiente em cavalos, menos neurovirulenta do que YF 17DD; boa resposta celular
<b>Influenza aviária (H5N1)</b>	Veterinário	Vírus <i>Newcastle</i>	Certificada	Vírus atenuado; boa proteção direcionada ao vetor e ao antígeno
<b>Poliovírus</b> Sabin (PV)	Humano	SIV	Pré-clínica	Vírus atenuado; metodologia complexa; seguro em humanos; resposta celular e humoral em macacos; pré-imunidade; instabilidade
<b>Sarampo</b> (MV, <i>Measles virus</i> )	Humano	SIV, HIV, hepatite B, SARS, WNV	Pré-clínica	Vírus atenuado; pré-imunidade ao vetor; metodologia estabelecida; seguro; resposta imune de longa duração; estabilidade do inserto; não-integração ao genoma hospedeiro
<b>Poxvírus</b> Vaccinia virus Ankara (MVA) ou NYVAC vírus; Canarypox	Humano	HIV-1, câncer, influenza A	Fase I / II (MVA) III (canarypox-HIV)	Replicação-deficiente (MVA) ou vírus atenuado (NYVAC); metodologia estabelecida; seguro; boa resposta CTL, pré-imunidade (MVA) ao vetor; imunogenicidade limitada, potencial uso em regimes heterólogos
	Veterinário	Influenza equina, WNV, raiva	Certificadas	Replicação-deficiente; segura; boa resposta celular e humoral
<b>Vesicular stomatitis vírus</b> (VSV)	Humano	Ebola, HIV-1, Marburg virus	Pré-clínica	Replicação competente; metodologia não estabelecida; segurança não determinada em humanos; potencial risco de neurotoxicidade

Modificado e adaptado de Liniger *et al.*, 2007; Draper & Heeney, 2010.

O desenvolvimento da tecnologia do clone infeccioso possibilitou a manipulação genética de YF 17D (Rice *et al.*, 1989). Com isso, vírus recombinantes YF 17D puderam expressar diferentes antígenos através da construção de clones de cDNA, que reconstituem o genoma viral de YF 17D através de transcrição *in vitro*, resultando na produção de progênes virais viáveis após transfecção celular do RNA viral. Desse modo, várias abordagens de construção de YF 17D são possíveis em função do antígeno a ser expresso (Galler *et al.*, 1997).

Uma das mais importantes abordagens no uso de flavivírus como vetor, refere-se à construção de quimeras de YF 17D através da troca dos genes prM e E por genes homólogos de outros Flavivírus. Vírus 17D quiméricos foram criados pela troca de prM/E do vírus da Encefalite Japonesa (JEV; Chambers *et al.*, 1999), dos quatro sorotipos do vírus da Dengue (Caufour *et al.*, 2001; Guirakhoo *et al.*, 2001, 2002, 2004), do vírus do Oeste do Nilo (WNV; Arroyo *et al.*, 2004; Monath *et al.*, 2001, 2006) e do vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV; Pugachev *et al.*, 2004). Estas vacinas mostraram-se comprovadamente seguras e imunogênicas em humanos e estão em distintas fases de ensaios clínicos ou aguardando registro (revisado por Guy *et al.*, 2010).

Outras estratégias abordadas dizem respeito à inserção de genes nas regiões 3' e 5' não-traduzidas (UTRs) no genoma de YF 17D. Esta metodologia foi primeiramente descrita por Andino e equipe (2002) e se referiu à construção de cassetes recombinantes bicistrônicos que contém uma seqüência nucleotídica exógena de IRES (do inglês *Internal Ribosome Binding*) inserida no genoma viral que permite o início da tradução do RNA viral independentemente do resto do precursor da poliproteína viral. As seqüências IRES podem ser inseridas em um sítio interno anterior a uma região de códon ou nas extremidades 3' ou 5' UTR do genoma viral. Inserções de IRES virais adjacentes a uma seqüência exógena que codifica para o gene p24 (HIV-1) foram realizadas na região 3' UTR no genoma de YF 17D e geraram vírus viáveis porém instáveis geneticamente. Recentemente, o mesmo tipo de estratégia foi empregado na construção de um vírus YF 17D recombinante para o gene p24 (HIV-1), dessa vez inserido na região 5' UTR (Franco *et al.*, 2010). Este vírus mostrou-se replicativo em cultura de células e imunogênico *in vivo*, sendo capaz de induzir em camundongos resposta humoral e celular T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> específica para o epítipo p24, porém se tornou instável geneticamente após somente quatro passagens seriadas.

Outra abordagem de construção de YF 17D refere-se à utilização deste como vetor para epítopos heterólogos de patógenos relacionados ou não, que podem ser expressos em diferentes regiões do genoma, as quais serão descritas em seguida. A primeira estratégia

descreve o uso da proteína E (Envelope) como alvo para a inserção “in-frame” de epítomos heterólogos. Isto foi possível devido à disponibilidade da estrutura tridimensional da proteína E (Rey *et al.*, 1995), que acarretou na determinação de sítios em que inserções seriam viáveis. O nosso grupo construiu clones infecciosos de YF 17D recombinantes para epítomos humorais e celulares de circunsporozoíta (CS) de *Plasmodium spp*, os quais foram inseridos na alça *fg* da proteína E (Bonaldo *et al.*, 2002, 2005). Estes vírus recombinantes mostraram-se estáveis geneticamente em células de vertebrados e imunogênicos, além disso, mantiveram-se atenuados em camundongos e macacos (Bonaldo *et al.*, 2005).

Um recente trabalho descreveu uma nova estratégia de inserção de peptídeo do vírus *influenza A* diretamente na glicoproteína não-estrutural NS1, que ao contrário de desenhos racionais de inserção, utiliza como estratégia a mutagênese randômica com a finalidade de identificar possíveis sítios de inserção otimizados pela capacidade de replicação do vetor e de apresentação eficiente ao sistema imune (Rumyantsev *et al.*, 2010). Pela análise de um número de mutantes *in vivo*, um variante pode ser escolhido pela sua melhor configuração imunogênica. No trabalho de Rumyantsev e equipe (2010), os mutantes permitiram a inserção de peptídeo de até 56 aminoácidos somente no resíduo 326 de NS1. Apesar das inserções neste sítio terem desestabilizado a formação estrutural do dímero de NS1 *in vitro*, os vírus mutantes foram capazes de se replicar em cultura de células Vero e de induzir imunogenicidade *in vivo*, ainda que os níveis de proteção induzidos após um desafio com o vírus da *influenza* em camundongos tenham sido insuficientes.

Outra estratégia de inserção no genoma de YF 17D abordou a clonagem de epítomos flanqueados por motivos de reconhecimento da protease viral NS2B/NS3, que cliva e libera o epítomo heterólogo do resto da poliproteína viral. Um estudo utilizando um modelo de câncer murino demonstrou que o vírus recombinante YF 17D expressando epítomo de ovalbumina, clonado nesta região, promoveu a indução de proteção após um desafio letal com células tumorais malignas expressando ovalbumina (McAllister *et al.*, 2000). Outros estudos também demonstraram a produção de vírus viáveis quando clonados nesta região para albergar epítomo T CD8<sup>+</sup> de *P. yoelii* (Tao *et al.*, 2005) e epítomo do vírus *influenza* (Barba-Spaeth *et al.*, 2005).

Utilizando uma abordagem similar de inserção de epítomos flanqueados por motivos de clivagem, foi possível inserir seqüências heterólogas mais longas, no caso entre as proteínas E e NS1, em que a clivagem é realizada pela sinalase celular, presente no retículo endoplasmático (RE). Esta metodologia foi desenvolvida pelo nosso grupo (Bonaldo *et al.*, 2007) e se baseou na construção de um cassete que inclui além do inserto, a duplicação da

região de haste-âncora (HA) da proteína E, respeitando sua estrutura e a função de cada elemento nela contido, permitindo, assim, a inserção e o correto processamento das proteínas virais no lúmen do RE (Bonaldo *et al.*, 2007). Pôde-se demonstrar que o vírus recombinante expressando EGFP entre as proteínas E e NS1 foi geneticamente estável por até dez passagens seriadas, tendo sido capaz de reter a proteína exógena ancorada no RE e de induzir resposta humoral específica tanto para YF 17D quanto para EGFP (Bonaldo *et al.*, 2007).

A expressão de um precursor de uma glicoproteína de Lassa vírus também na região E/NS1 de YF 17D resultou em um vírus recombinante replicativo em cultura de células, porém a estabilidade genética do inserto foi duvidosa (Bredenbeek *et al.*, 2006). A construção abordada por Bredenbeek e equipe (2006) diferiu da explorada pelo nosso grupo (Bonaldo *et al.*, 2007), por conter um trecho menor da HA duplicada - região codificante para somente o segundo domínio transmembrana de 23 aminoácidos - no desenho de seu cassete heterólogo, o que possivelmente afetou a seqüência-sinal e a translocação de NS1 à membrana do RE. Posteriormente, os autores demonstraram que a clonagem de dois insertos mais curtos de Lassa vírus entre os genes E e NS1 foi capaz de aumentar a estabilidade genética dos vírus recombinantes e a competência destes em se replicar e em processar os antígenos heterólogos nas células infectadas, além de ter induzido proteção em cobaias (Jiang *et al.*, 2011).

Esta estratégia de inserção, entre as proteínas E e NS1, vem sendo utilizada pelo nosso grupo, com algumas modificações que otimizaram a estabilidade do cassete heterólogo, para expressar antígenos de Gag do vírus da imunodeficiência símia (SIVmac239) (Bonaldo *et al.*, 2010). Resultados preliminares mostraram que a imunização de macacos *rhesus* com o vírus recombinante YF 17D expressando proteína de SIV foi capaz de induzir T CD8<sup>+</sup> secretoras de várias citocinas, além de ter suprimido a replicação de SIV em T CD4<sup>+</sup>. Franco e equipe (2010) recentemente, descreveram uma construção de YF 17D recombinante expressando o gene p24, oriundo do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) entre as proteínas E e NS1. Diferentemente das construções desenvolvidas em nosso laboratório, estes empregaram a inserção do gene heterólogo adjacente a uma região de transmembrana (E2), oriunda do vírus Sindbis, um alfavírus, como forma de manter a correta topologia e o processamento da poliproteína viral. No entanto, o vírus recombinante foi estável geneticamente somente até a quarta passagem seriada em cultura de células. Apesar desta desvantagem, ao se comparar o vírus recombinante YF 17D com MVA (“*Modified Vaccinia Ankara*”) e adenovírus recombinantes que expressam proteínas de HIV-1 (Gag p24), viu-se que os vírus recombinantes de FA foram capazes de induzir uma resposta imune mais balanceada de T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e um perfil mais abrangente de secreção de citocinas,

caracterizando a polifuncionalidade destas células, e refletindo a propriedade imunológica característica do vírus 17D parental.

Uma das limitações de uso do vetor de FA seria a relativa instabilidade genética dos vírus recombinantes gerados (revisado em Liniger *et al.*, 2007). Em nossa equipe, vírus recombinantes expressando proteína EGFP mantiveram a proteína heteróloga no genoma de FA até a 20ª passagem (quimeras de DENV4). No entanto, vírus recombinantes 17D expressando proteína heteróloga de DENV3 foram estáveis até a 5ª passagem somente, indicando que características do inserto também podem influenciar a estabilidade genética dos vírus recombinantes. Dessa forma, o sistema de expressão de antígenos heterólogos entre E/NS1 do vírus 17D, desenvolvido por nosso grupo, possibilitou resultados promissores porém este sistema necessita ser melhor estudado quanto à inserção de genes que codificam para os mais variados antígenos, dentre eles o de *T. cruzi*.

## **1.4. A Doença de Chagas**

### **1.4.1. Epidemiologia, modos de transmissão e ciclo biológico**

A tripanosomíase americana humana (Doença de Chagas) é causada pelo parasita intracelular obrigatório flagelado *Trypanosoma cruzi*, descoberto por Carlos Chagas, em 1909 (Chagas, 1909). A doença é endêmica nos países da América do Norte (México), Sul e Central, sendo que na Bolívia e Argentina, um percentual que pode variar de 4 a mais de 5% da população está infectada pelo protozoário. Apesar dos esforços em se reduzir a transmissão de Chagas na América Latina, cerca de 13 milhões de pessoas ainda são afetadas, provocando mais de 15.000 mortes por ano, enquanto que de 50 a 80 milhões de pessoas estão sob risco de infecção (WHO, 2005).

A infecção por *T. cruzi* existiu nas Américas como uma enzootia, transmitida por várias espécies de animais selvagens, que mantiveram o *T. cruzi* na natureza por milhões de anos até o início do século XX. As mudanças no ambiente, decorrentes da ocupação humana, modificaram este panorama, agravando o problema do ponto de vista epidemiológico. A migração de pacientes de áreas rurais, as transmissões por transfusões sanguíneas e a recente ocorrência de epidemias locais transmitidas por contaminação alimentar vêm tornando esta doença um problema urbano nas áreas afetadas (Coura *et al.*, 2007; Steindel *et al.*, 2007; Alárcon *et al.*, 2010). Além disso, a migração massiva de pacientes de países endêmicos a outras regiões não-endêmicas, como EUA, Canadá, Europa, Austrália e Japão podem

modificar o cenário epidemiológico mundial, sendo que como nesses países não há vetores transmissores de *T. cruzi*, a contaminação se dá por transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos e transmissão vertical de mãe para filho (Figura 1.6).

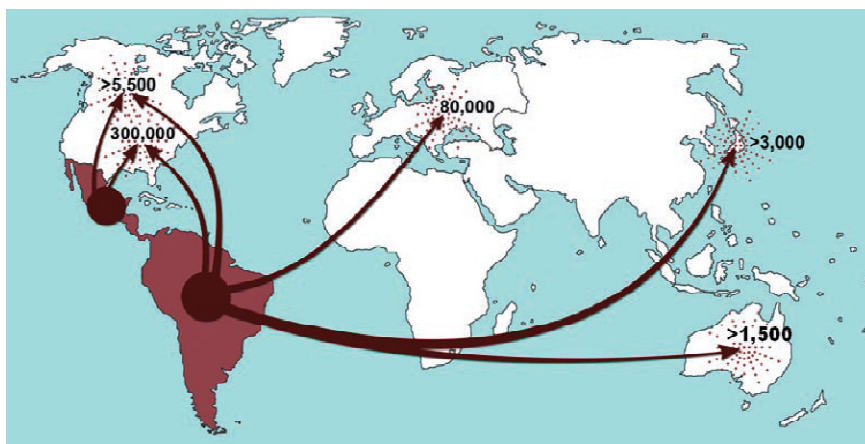


Figura 1.6 – Rota de migração da América Latina e o número total de indivíduos infectados em países não-endêmicos. Fonte: Nature Outlook: Chagas Disease (<http://www.nature.com/nature/outlook/chagas/index.html>)

*T. cruzi* é naturalmente transmitido pelo hospedeiro invertebrado do gênero *Triatoma* (família *Reduviidae*) ou popularmente conhecido como barbeiro, que durante o repasto sanguíneo, este defeca na pele, transmitindo os parasitas que estão sob forma de tripomastigotas metacíclicos. Estes penetram no hospedeiro pela pele ou mucosas, posteriormente invadindo células locais e se transformando em amastigotas que são formas replicativas intracelulares. Alguns amastigotas se transformam novamente em tripomastigotas que lisam as células, liberando tanto amastigotas quanto tripomastigotas que podem infectar novas células, entrar na corrente sanguínea ou colonizar o tecido muscular ou nervoso formando ninhos de amastigotas. O barbeiro ingere do hospedeiro contaminado sangue contendo tripomastigotas e no inseto, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas, que se replicam assexuadamente e chegam ao reto do vetor, se diferenciando em tripomastigotas metacíclicos infectivos (Hoare 1972; revisado por De Souza *et al.*, 2010). Dessa forma, completa-se o ciclo de vida do *T. cruzi*.

O único tratamento disponível contra a doença de Chagas é através de quimioterápicos fabricados há mais de 40 anos: as drogas benznidadol e nifurtimox, as quais apresentam grandes efeitos colaterais e podem levar à resistência, sendo eficaz em apenas 55,8% de crianças infectadas (De Andrade *et al.*, 1996) e somente em 19,1% dos adultos (Viotti *et al.*, 1994). São ainda menos efetivas em pacientes crônicos (Jannin & Villa, 2007).



Apesar do controle ao vetor triatomíneo *T. infestans* ter sido bem sucedido no Brasil durante a década de 80 (Silveira & Vinhaes, 1999), há alguns fatores que contribuem para a necessidade de novas estratégias imunoterápicas, como por exemplo: 1) a possibilidade de interrupção do programa de controle ao vetor, 2) ausência de um tratamento eficaz e inócuo, 3) presença de milhões de indivíduos infectados crônicos e novos casos de infecção em vários países da América do Sul e Central, e 4) dificuldade de se controlar diferentes espécies de barbeiros vetores, além da possível colonização de outras espécies silvestres em ambientes domiciliares no lugar de *T. infestans* (Camargo, 2009; Schofield *et al.*, 2006).

#### **1.4.2. Mecanismos efetores da resposta imune contra a Doença de Chagas**

A doença de Chagas pode seguir diferentes percursos clínicos e dentre os fatores determinantes, alguns podem ser destacados: o inóculo inicial de *T. cruzi*, as oportunidades de re-infecção, as características biológicas das cepas ou clones infectantes e a resposta imune do hospedeiro (Coura *et al.*, 2007). Após o primeiro contato com o *T. cruzi*, o homem desenvolve a fase aguda da doença, caracterizada pela presença de parasitemia e de reações inflamatórias locais (granulomas). A progressão para a fase crônica da doença é marcada pelo desaparecimento da parasitemia, sendo que a maioria dos indivíduos pode permanecer por toda a vida nesta fase da doença (Teixeira *et al.*, 2006). Muitos destes, não desenvolvem sintomas, permanecendo na fase indeterminada da doença. A forma crônica sintomática da doença pode ocorrer em cerca de 30% dos indivíduos infectados, com alta frequência de *T. cruzi* no tecido miocárdico e outros tecidos, e um reduzido número de parasitas no sangue.

Durante as etapas iniciais da fase aguda, a replicação de *T. cruzi* ocorre no citoplasma de variados tipos celulares, em especial: macrófagos, fibroblastos, células musculares esqueléticas e do miocárdio, neurônios e células epiteliais. O hospedeiro sobrevive a esse estágio inicial devido à geração de resposta inata, em que os componentes do *T. cruzi*, como o DNA e glicoconjugados da membrana (proteínas e componentes da âncora de GPI – glicosilfosfatidil-inositol) induzem receptores Toll (TLR9 e TLR2) em macrófagos e células dendríticas, através da ativação da molécula adaptadora MyD88 (Campos *et al.*, 2004; Báfica *et al.*, 2006). Os macrófagos murinos também podem reconhecer componentes da âncora de GPI (Camargo *et al.*, 1997). Após ativação, estas células secretam citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que aumentam a endocitose e a morte intracelular de parasitas através da liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Citocinas pró-inflamatórias

como IL-1, IL-6, IL-12 e fator de necrose tumoral tipo alfa (TNF- $\alpha$ ) são prontamente liberadas e ativam outras células inflamatórias (Bilate & Cunha-Neto, 2008).

Os resultados obtidos sugeriram que macrófagos e células NK seriam regulados por meio de um sistema de retroalimentação positiva via produção de IL-12 e IFN- $\gamma$ . Macrófagos e células dendríticas que endocitaram o parasita subseqüentemente estimulam uma resposta adaptativa mediada por células T e por anticorpos contra *T. cruzi* (revisado por Cunha-Neto *et al.*, 2009). Os tripomastigotas são as principais formas extracelulares do parasita e são alvos de anticorpos, porém, mesmo a geração robusta de anticorpos específicos não é suficiente para eliminar o parasito (revisado por Rodrigues *et al.*, 2009b).

Em animais infectados, demonstrou-se que as citocinas interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), bem como o fator de necrose tumoral tipo alfa (TNF- $\alpha$ ) são essenciais na resposta protetora contra *T. cruzi* (Aliberti *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2005). Estas citocinas levam à ativação da enzima catalisadora da síntese de óxido nítrico (iNOS ou do inglês: “*inducible nitric oxide synthase*”) em macrófagos e inibem a replicação parasítica (Vespa *et al.*, 1994). IFN- $\gamma$  é sintetizado logo após a infecção pelas células NK (Aliberti *et al.*, 1996), porém linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> também produzem esta citocina durante a infecção por *T. cruzi* (Martins *et al.*, 2004). A evidência de que a produção de óxido nítrico é crítica na eliminação dos parasitas foi obtida em infecções de camundongos geneticamente deficientes para iNOS, os quais se mostraram altamente suscetíveis à diferentes cepas de *T. cruzi* (Rodrigues *et al.*, 2000).

As células T CD8<sup>+</sup> são importantes mediadoras da resposta imune adaptativa contra infecções causadas por parasitas como *T. cruzi*, *Leishmania major* and *Plasmodium spp* (Rodrigues *et al.*, 2003). Além de secretar IFN- $\gamma$ , linfócitos T CD8<sup>+</sup> podem atuar limitando a parasitemia, através da lise de células infectadas via perforina ou liberação de granzimas, de apoptose via Fas-FasL (Muller *et al.*, 2003) ou ainda da secreção de outros importantes mediadores, como TNF- $\alpha$  (Munoz-Fernandez *et al.*, 1992). Foi demonstrado que a frequência de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  específicas para proteínas do *T. cruzi* está altamente correlacionada com a gravidade da doença em humanos, sendo significativamente menor em pacientes com doença grave em comparação àqueles sem sintomas (Laucella *et al.*, 2004). Na infecção humana, células T específicas para *T. cruzi* puderam ser detectadas em indivíduos na fase crônica, possivelmente exercendo uma atividade anti-parasítica similar à infecção no modelo murino (Dutra *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2008). Por outro lado, apesar de suas atividades citolíticas, células T CD8<sup>+</sup> também contribuem (através dos efeitos de

TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) para a imunopatogênese cardíaca e lesão tecidual em pacientes crônicos (Gomes *et al.*, 2003; Cunha-Neto *et al.*, 2009).

As evidências mostraram que uma resposta Th1 é predominante no controle de *T. cruzi* (Hoft & Eickhoff, 2005). No entanto, citocinas regulatórias como IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  têm sido associadas com a susceptibilidade à infecção devido à inibição dos efeitos de IFN- $\gamma$  e da ativação de macrófagos (revisado por Gutierrez *et al.*, 2009). Uma representação esquemática resumindo a participação de células e citocinas envolvidas na imunidade contra a infecção por *T. cruzi* pode ser observada na Figura 1.7.

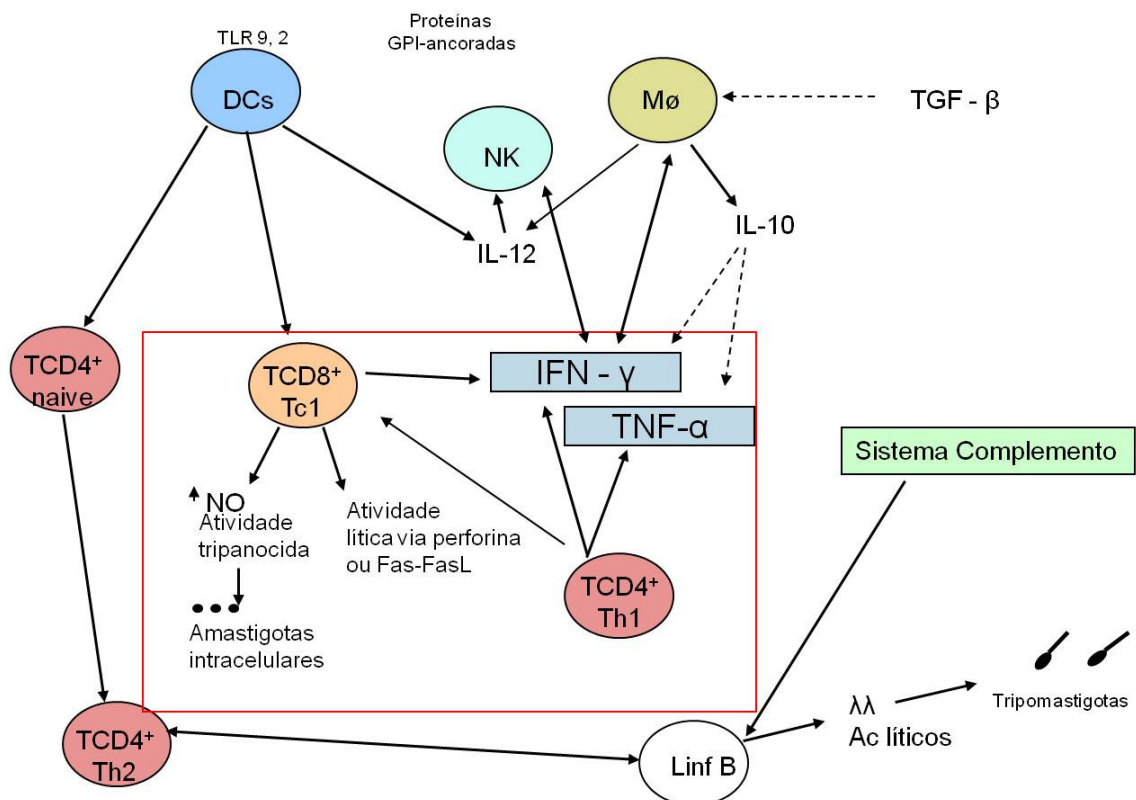


Figura 1.7 – Mecanismo de participação de citocinas e tipos celulares na indução da imunidade contra infecção por *T. cruzi*. O esquema mostra a contribuição de uma resposta TCD8<sup>+</sup> Tc e de TCD4<sup>+</sup> Th1 na produção das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , responsáveis por mediar a atividade anti-parasítica intracelular.

### 1.4.3. Evasão da resposta imune por *T. cruzi*

As seguintes estratégias de evasão do sistema imune pelo *T. cruzi* foram descritas: 1) indução da produção de citocina reguladora TGF- $\beta$ , 2) indução de apoptose linfocitária pelo sistema de receptores Fas-FasL, 3) transferência de ácido siálico do hospedeiro à superfície do parasito, inibindo a lise mediada por complemento, 4) competição

antigênica (indução linfocitária policlonal) e 5) bloqueio de antígenos solúveis do complemento (mediado pela proteína gp160 de membrana do *T. cruzi*).

Apesar da imunidade mediada por T CD8<sup>+</sup> ser crítica na proteção contra *T. cruzi*, o parasita pode conseguir sobreviver e estabelecer uma infecção crônica, retardando o aparecimento de T CD8<sup>+</sup> (Tzelepis *et al.*, 2006, 2007). Apenas depois que o nível de parasitemia chega a um ponto crítico, é que se inicia a imunidade mediada por células (CMI, do inglês “*cell-mediated immunity*”).

Sabe-se que a ativação de T CD8<sup>+</sup> pelas APCs depende da densidade e da afinidade do TCR (do inglês T cell receptor) para o complexo peptídeo-MHC que está sendo apresentado. Sendo assim, dois mecanismos poderiam contribuir para a evasão da resposta imune mediada por T CD8<sup>+</sup> a *T. cruzi*: 1) a diversidade de proteínas distintas que são liberadas por *T. cruzi* para processamento via MHC classe I (intracelular) compromete a indução de uma resposta mais potente e focada, e 2) a apresentação simultânea de peptídeos homólogos (alterados ou modificados) pode antagonizar células T *naïve* ou efetoras.

O genoma de *T. cruzi* contém mais de 12.000 genes, no entanto, apenas uma parte deste demonstrou conter epítomos de classe I, que são em sua maioria expressos por diferentes membros da superfamília de antígenos de superfície de *T. cruzi*, denominados de trans-sialidases (TS). Estas proteínas estão associadas a caudas de GPI na superfície da membrana e as TS ativas têm como função hidrolisar e transferir ácido siálico de glicoconjugados da superfície do hospedeiro a aceptores do tipo mucina na membrana do parasito (Schenkman & Eichinger, 1993). Centenas ou até milhares de proteínas antigênicas distintas ou homólogas de TS (visto que compreendem mais de 800 famílias de genes) podem ser liberadas no citosol das células infectadas, para processamento proteolítico via MHC classe I, assim estes epítomos poderão competir pela apresentação na superfície da célula hospedeira ou atuar como antagonistas de células T específicas (Martin & Tarleton, 2004).

Com a identificação de vários destes epítomos, permitiu-se estudar o efeito da imunodominância, um dos mecanismos mais eficazes de evasão do sistema imune pelo *T. cruzi*, através de infecções experimentais em camundongos com diferentes cepas de *T. cruzi* (Martin *et al.*, 2006; Tzelepis *et al.*, 2008). O uso da diversidade de resposta imunodominante entre diferentes cepas de *T. cruzi* apresenta-se como uma nova e desafiadora estratégia para o desenvolvimento de uma vacina contra a doença de Chagas (Rodrigues *et al.*, 2009a).

#### 1.4.4. Estratégias de vacinação experimental contra doença de Chagas

Os primeiros estudos vacinais para Chagas empregaram o uso de *T. cruzi* atenuado ou morto (Menezes, 1968; Basombrio, 1990), no entanto, estas imunizações apenas promoveram um retardo na manifestação da doença. Com os primeiros estudos moleculares de antígenos de *T. cruzi*, reconhecidos pelo soro imune de pessoas ou animais infectados, estudos de imunização foram conduzidos utilizando-se de proteínas recombinantes baseadas no isolamento destes antígenos específicos, que incluíam membros da superfamília das trans-sialidases (TS). Estes antígenos expressos tanto em tripomastigotas infectivos quanto em amastigotas, foram relacionados com a invasão de células do hospedeiro (Schenkman & Eichinger, 1993), escape do fagossomo (Hall *et al.*, 1992) e resistência ao complemento (Tomlinson *et al.*, 1994). A utilização de proteínas recombinantes, no entanto, requer diversas formulações de adjuvantes para induzir uma imunidade protetora de longa duração (Hoft & Eickhoff, 2005; Araújo *et al.*, 2005; Hoft *et al.*, 2007). Enquanto que alguns ensaios experimentais utilizando vacinas de DNA plasmidial expressando genes de *T. cruzi* mostraram-se indutores de uma resposta protetora em modelos murinos distintos (Fujimura *et al.*, 2001; Fralish & Tarleton, 2003; Boscardin *et al.*, 2003; Vasconcelos *et al.*, 2004), outros falharam em induzir proteção em modelos murinos altamente suscetíveis a uma infecção por *T. cruzi* (Costa *et al.*, 1998; Vasconcelos *et al.*, 2003).

A linhagem do tipo A/J é extremamente sensível à infecção por diferentes cepas de *T. cruzi* e o desafio com pequenas doses do parasito provoca uma letalidade de 100% (Vasconcelos *et al.*, 2003). Dessa forma, esta linhagem torna-se um modelo experimental interessante para o estudo de candidatos vacinais e dos mecanismos imunológicos envolvidos na imunidade protetora à infecção por *T. cruzi*.

Proteínas da família TS constituem os maiores alvos de células T CD8<sup>+</sup> específicas para *T. cruzi* (Tarleton, 2007). No citoplasma, as formas amastigotas de *T. cruzi* liberam grandes quantidades de peptídeos que irão ser apresentados via MHC classe I para reconhecimento pelas T CD8<sup>+</sup> (Garg *et al.*, 1997). Esta liberação ocorre devido a clivagens da âncora de GPI, comumente usada na retenção de proteínas de superfície em tripanosomatídeos.

A proteína de superfície de amastigota 2 (ASP-2), purificada e parcialmente seqüenciada por Pan e McMahon-Pratt (1989) foi determinada como uma trans-sialidase inativa (Wrightsmann *et al.*, 1994; Low & Tarleton, 1997). Esta proteína de 83 kDa foi reconhecida em soro humano de paciente chagásico, sugerindo seu potencial uso no

diagnóstico de infecção por *T. cruzi*. Nesta proteína, ocorre um motivo de ácido aspártico (ASP box), presente nas sialidasas bacterianas e um motivo altamente conservado, característico do módulo do tipo três de fibronectina, tendo sido esta proteína classificada como pertencente à subfamília II da superfamília de sialidasas/trans-sialidasas de *T. cruzi* (Cross e Takle, 1993). Recentemente, foi identificado em ASP-2 um domínio de ligação, denominado de FLY (VTVXNVFLYNR), que tem a capacidade de se ligar à proteína de citoqueratina 18 (CK18) do hospedeiro, expressa no citoplasma da célula epitelial (Claser *et al.*, 2008). Essa interação seria responsável por iniciar uma cascata de sinalização no parasita, recrutando as proteínas sinalizadoras necessárias para a multiplicação de amastigotas de cepas Y e Brener de *T. cruzi*.

ASP-2 contém múltiplos epítomos restritos a MHC I, reconhecidos por células T CD8<sup>+</sup> tanto de camundongos quanto do homem (Low *et al.*, 1998; Wizek *et al.*, 1998). A importância da resposta imune dirigida à ASP-2 é evidenciada através de estudos de vacinação que mostraram que a imunização com genes ou domínios protéicos de ASP-2 é capaz de induzir uma resposta imune de T CD4<sup>+</sup> Th1 e T CD8<sup>+</sup> Tc1, que se reflete na redução da fase aguda da parasitemia, da mortalidade de camundongos desafiados com cepas de *T. cruzi* (Boscardin *et al.*, 2003; Vasconcelos *et al.*, 2004) e em induzir os maiores níveis de citotoxicidade *in vivo* mediado por T CD8<sup>+</sup>. Além disso, a imunização com ASP-2 foi capaz de reduzir a inflamação tecidual em fase crônica da infecção (camundongos infectados por mais de 100 dias) (Araújo *et al.*, 2005).

A imunização com plasmídeo contendo genes da ASP-2 promoveu a sobrevivência de 65% de camundongos A/Sn desafiados por *T. cruzi* (Vasconcelos *et al.*, 2004) enquanto que a vacinação com plasmídeo contendo genes codificadores de antígenos específicos de tripomastigotas (genes *ts*) não induziu esta mesma magnitude de proteção. No entanto, foi visto que a imunização simultânea de plasmídeos contendo genes *ts* e de ASP-2 pôde gerar um aumento na proteção destes camundongos (86% de sobrevivida) (Vasconcelos *et al.*, 2004). Uma estratégia vacinal utilizando uma imunização simultânea destes mesmos antígenos de *T. cruzi*, no caso, expressos em adenovírus recombinantes, também foi responsável por aumentar a imunidade protetora de camundongos BALB/c em até 100% (Machado *et al.*, 2006).

Outros grupos de antígenos foram utilizados em ensaios de vacinação de camundongos, como a proteína do flagelo ligadora de cálcio (Tc24), proteína 2 do paraflagelo (PAR-2), LYT-1, cruzipaína, proteína do ribossoma tipo L7a, KMP11, dentre outras. A

Tabela 1.2 mostra um resumo dos antígenos e o sistema de entrega correspondente empregado nos diferentes ensaios de vacinação experimental para *T. cruzi*.

A maioria dos estudos conduzidos associou proteção com a geração de uma resposta imune mediada tanto por células T CD4<sup>+</sup> quanto por T CD8<sup>+</sup>, em que a depleção de uma população de células ou de outra resulta na completa susceptibilidade do animal (Tarleton *et al.*, 1996; Hoft *et al.*, 2007; Tzelepis *et al.*, 2007; de Alencar *et al.*, 2009).

Em um estudo de vacinação, utilizando-se de diversas frações protéicas recombinantes de ASP-2, associadas a adjuvantes, verificou-se que a imunização de camundongos A/Sn com uma fração correspondente aos aminoácidos 261 a 380 de ASP-2 foi capaz de induzir uma proteção maior (100%) do que a imunização com a proteína inteira (65%) e que a depleção de T CD8<sup>+</sup> reverteu completamente a imunidade protetora gerada (Araújo *et al.*, 2005). O epítipo TEWETGQI foi mapeado como indutor de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  neste sistema. Miyahira e equipe (2005) foram capazes de gerar uma resposta imune protetora utilizando um único epítipo de *T. cruzi* reconhecido por T CD8<sup>+</sup> em uma estratégia de dose-reforço com vaccínia e adenovírus recombinantes. No entanto, posteriormente, verificou-se que além de epítopos T CD8<sup>+</sup> em ASP-2, epítopos T CD4<sup>+</sup> desempenham um papel significativo na indução da proteção (de Alencar *et al.*, 2007). Epítopos T CD4<sup>+</sup> em ASP-2 estão ainda por ser mais bem caracterizados.

Outros epítopos reconhecidos por T CD8<sup>+</sup> foram identificados em alguns outros antígenos de *T. cruzi*, como já descrito para as trans-sialidases ativas, ASP-1 e ASP-2 (Martin *et al.*, 2006; Low *et al.*, 1998).

Tabela 1.2 – Resumo dos sistemas de apresentação dos antígenos utilizados em ensaios de vacinação experimentais contra *Trypanosoma cruzi*

Vetor / Sistema de apresentação	Antígeno / gene + adjuvante	Linhagem camundongo	Cepa <i>T. cruzi</i> sobrevida (%)	Referência
Proteína nativa	<i>paraflagellar rod</i> <i>protein-2</i> + alum / IL-12	C57BL/6J	Peru	Wrightsmann & Manning (2000)
Proteína nativa	Cruzipaína + CpG ODN	C3H	RA (100%)	Frank <i>et al.</i> (2003)
Proteína recombinante	Antígenos repetitivos citoplasmáticos e flagelares	BALB/c C57BL/6	Y (50 – 60%)	Pereira <i>et al.</i> (2005)

<b>Proteína recombinante</b>	Cruzipaína + anti-IL-4 / IL-12	BALB/c	Tulahuén (80%)	Schnapp <i>et al.</i> (2002)
<b>Proteína recombinante</b>	TS + CpG ODN	BALB/c	Tulahuén (100%)	Hoft <i>et al.</i> (2007)
<b>Proteína recombinante</b>	ASP-2 + CpG ODN/alum	A/Sn	Y (66 – 100%)	Araújo <i>et al.</i> (2005) De Alencar <i>et al.</i> (2007)
<b>Proteína recombinante + DNA plasmidial</b>	TS + alum	A/Sn	Y (0%)	Vasconcelos <i>et al.</i> (2003)
<b>DNA plasmidial</b>	TS	BALB/c	Y (85 – 100%)	Fujimura <i>et al.</i> (2001)
			Tulahuén (100%)	Hoft <i>et al.</i> (2007)
<b>DNA plasmidial</b>	TSA-1	C57BL/6	Brazil (30%)	Garg & Tarleton (2002)
	ASP-1		Brazil (40%)	
	ASP-2		Brazil (66%)	
	ASP-2	BALB/c	Y (100%)	Boscardin <i>et al.</i> (2003)
<b>DNA plasmidial</b>	ASP-3 ASP-4	A/Sn	Y (65%)	Vasconcelos <i>et al.</i> (2004)
		A/Sn	Y (50%)	Silveira <i>et al.</i> (2008)
			Y (66%)	
<b>DNA plasmidial</b>	Proteína de kinetoplastídeo (KMP11)	BALB/c C57BL/6	Y (50%)	Planelles <i>et al.</i> (2001)
<b>DNA plasmidial</b>	Tc24 + TSA-1	BALB/c	H1 (ND*)	Limon-Flores <i>et al.</i> (2010)
<b>Adenovirus recombinante</b>	TS	BALB/c	Y (50%)	Machado <i>et al.</i> (2006)
	ASP-2		Y (80%)	
<b>DNA + Adenovirus recombinante</b>	ASP-2	A/Sn	Y (80%)	De Alencar <i>et al.</i> (2009)
<b>Adenovirus recombinante + MVA recombinante</b>	Epítipo T CD8 <sup>+</sup> , ANYNFTLV (TSSA) + RANKL	C57BL/6	Tulahuén (100%)	Miyahira <i>et al.</i> (2005)
<b>Salmonella recombinante</b>	Cruzipaína	C3H/HeN	RA (100%)	Cazorla <i>et al.</i> (2008)
<b>Virus Sendai</b>	ASP-2	C57BL/6	Tulahuén (90%)	Duan <i>et al.</i>



(2009)				
<b>MVA + vírus da influenza + adenovírus recombinantes</b>	Epítipo T CD8 <sup>+</sup> , ANYNFTLV (TSSA)	B6	Tulahuén (100%)	Takayama <i>et al.</i> (2010)

\* ND, não determinado

Modificado e adaptado de Rodrigues *et al.*, 2009b.

Conforme descrito, uma vacina ainda é inexistente para a Doença de Chagas e faz-se necessária a fim de complementar outras estratégias, como o tratamento com drogas ou controle do vetor. No entanto, apesar de se ter caracterizado uma variedade de antígenos promissores de *T. cruzi*, eficientes em induzir resposta protetora em modelos murinos bem estabelecidos, ainda há uma complexidade envolvida neste assunto que se relaciona principalmente com a natureza complexa do parasito e sua interação com o sistema imune humano. As estratégias para uma vacina efetiva para Chagas devem considerar a variabilidade imunológica induzida pelas diferentes cepas do parasito (e a relevante heterogeneidade dos imunógenos, o que inclui a ASP-2 – existiria um antígeno protetor universal?), as diferenças regionais no ciclo de transmissão da Doença de Chagas, a variabilidade individual quanto ao curso da infecção (o diagnóstico pode ser negativo por muitos anos após infecção, as formas clínicas são variadas), a capacidade de eliminar totalmente ou não o parasito (imunidade estéril) e a definição da população-alvo atual para vacinação. Além disso, ensaios de vacinação em primatas não-humanos ainda deverão ser conduzidos com a finalidade de trazer informações a respeito da real possibilidade de se obter as primeiras vacinas contra a infecção por *T. cruzi*.

Desse modo, este trabalho não tem como objetivo principal buscar uma vacina ideal contra *T. cruzi*, visto ser este objetivo mais abrangente do que o aqui proposto, mas sim tem como proposta inicial o desenvolvimento e utilização do modelo vacinal de *T. cruzi* para avaliação do vírus da FA como vetor de expressão para antígenos de patógenos humanos, visto que o estudo da capacidade de entrega de distintos antígenos heterólogos pelos vírus da FA recombinantes tem sido cada vez mais explorado. Considerando que uma vacina contra *T. cruzi* deva ser capaz de induzir uma resposta imune preferencialmente mediada por células T CD4<sup>+</sup> Th1 e T CD8<sup>+</sup> Tc1, avaliamos que o vírus vacinal de FA 17D seja apropriado para gerar a imunidade desejada contra *T. cruzi*, já que este vírus é capaz de gerar uma resposta imune celular de múltiplas funções, induzindo uma produção robusta e persistente de T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> em humanos vacinados. Dessa forma, esperamos que em caráter complementar, os resultados desta tese possam encorajar o futuro desenvolvimento de novas vacinas humanas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Gerais**

1. Avaliar o potencial de uso do vírus 17D como vetor de expressão ao incluir genes de *Trypanosoma cruzi* em diferentes regiões genômicas no vírus vacinal analisando-se a estabilidade genética, a expressão do antígeno heterólogo e a indução de resposta imune protetora
2. Contribuir para o estabelecimento do vírus 17D como ferramenta de estudo de resposta imune e desenvolvimento de vacinas

### **2.2. Específicos**

#### **2.2.1. Obtenção dos vírus recombinantes**

Expressar no vírus da febre amarela YF 17D o epítipo TEWETGQI por inserção na proteína E do envelope viral ou na região intergênica NS2B/NS3 e o fragmento de 120 aminoácidos de ASP-2<sub>261-380</sub> na região intergênica E/NS1.

#### **2.2.2. Caracterização biológica e genética dos vírus YF 17D recombinantes**

1. Avaliar o potencial proliferativo dos vírus recombinantes, assim como a estabilidade do gene heterólogo introduzido no genoma viral
2. Determinar o grau de atenuação viral comparativamente ao vírus vacinal YF 17DD por meio de testes de neurovirulência em camundongos
3. Caracterizar/estudar a expressão dos antígenos de *T. cruzi*

#### **2.2.3. Estudo da resposta imune induzida pelos vírus YF 17D recombinantes**

1. Estabelecer a capacidade dos vírus recombinantes de induzirem anticorpos neutralizantes específicos ao Vírus da Febre Amarela e o grau de proteção frente ao desafio intra-cerebral pelo vírus vacinal
2. Detectar a presença de anticorpos reativos a formas amastigotas de *T. cruzi* em soros de animais imunizados com os vírus recombinantes

3. Caracterizar a indução e resposta imune celular em camundongos imunizados com os vírus recombinantes por meio da análise de células de baço produtoras de interferon-gama específicas ao peptídeo TEWETGQI ou ao vírus YF 17DD

4. Estabelecer o grau de proteção fornecido pela imunização dos camundongos com os vírus recombinantes por desafio dos animais com *T. cruzi* (cepa Y)

5. Caracterizar a ativação de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> responsivas ao epítipo de *T. cruzi* e ao Vírus da Febre Amarela vacinal após a imunização de camundongos com os vírus recombinantes

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos de clonagem em genoma do vírus da febre amarela, obtenção dos moldes de cDNA dos vírus recombinantes e ensaios imunológicos como: ELISPOT e linfoproliferação celular foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus (LABMOF) na unidade IOC da Fiocruz. Parte dos ensaios de caracterização viral em cultura de células Vero foi realizada no LABMOF e em parceria com o LATEV (Laboratório de Tecnologia Viroológica) do Departamento de Desenvolvimento Tecnológico/Bio-Manguinhos/FIOCRUZ. Pela ocasião do início dos experimentos desta tese, apenas o LATEV enquadrava-se no nível 2 de Biossegurança, porém o LABMOF obteve a concessão de licença para nível 2, emitida pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio – CQB 0105/99), o que permitiu o trabalho com os vírus recombinantes criados.

Os experimentos com camundongos foram realizados parte no Laboratório de Experimentação Animal (LAEAN) do Departamento de Desenvolvimento Tecnológico/Bio-Manguinhos/FIOCRUZ e parte no Laboratório de Experimentação Animal do IOC/ Fiocruz.

A Figura 3.1 mostra resumidamente o esquema de trabalho adotado nesta tese para as diferentes estratégias de construção dos vírus recombinantes 17D.

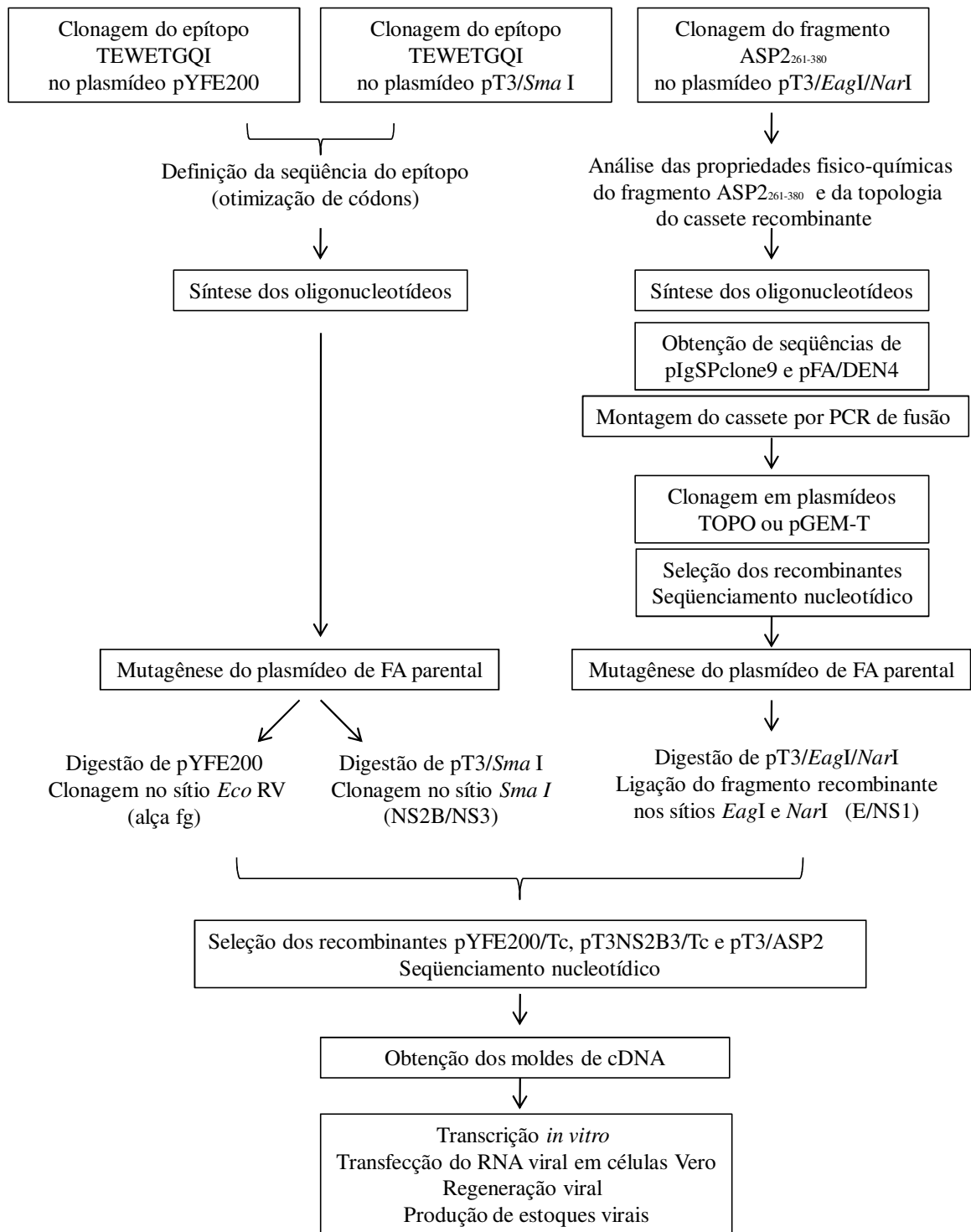


Figura 3.1. Esquematização das etapas adotadas neste trabalho para construção e obtenção dos vírus recombinantes de FA 17D.

### 3.1. Bactérias

Foram utilizadas duas cepas de bactérias *E. coli* quimiocompetentes para as etapas de clonagens: MC1061 (Promega) e SURE (Stratagene). A preparação das bactérias quimiocompetentes baseou-se no protocolo de preparação de células competentes por cloreto de cálcio descrito por Sambrook e equipe (1989), com modificações.

### 3.2. Cultura de células

Foram utilizadas células Vero que derivam de células epiteliais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), obtidas da Coleção Americana de Culturas e Depósitos (ATCC, 1994). Esta linhagem celular é aceita como adequada para a produção e padronização de vacinas.

O estoque, propagação e manutenção das células eram de responsabilidade dos técnicos do LATEV ou do LABMOF de acordo com os Protocolos Operacionais Padrões (POP) estabelecidos por cada laboratório. As passagens eram realizadas semanalmente e a manutenção das células feita em garrafas descartáveis de 175 cm<sup>2</sup> em meio de cultura Earle 199 completo contendo 2,5% de NaHCO<sub>3</sub> (sistema fechado) e mantidas em estufa de 37° C com atmosfera de CO<sub>2</sub> 5%.

Antes de cada experimento, as células, obtidas a partir de uma parte das garrafas passadas semanalmente, eram semeadas em garrafas ou placas apropriadas com 24 horas de antecedência. As monocamadas de células passavam por um processo de tripsinização por meio de dupla lavagem com solução de tripsina/EDTA ou verseno/tripsina a 1% seguida da incubação a 37° C por 3 a 5 minutos. Após esse período, as células eram ressuspensas em 5 mL de meio Earle 199 completo para neutralização da reação e uma pequena alíquota era diluída a 1:20 e contada com o auxílio de uma câmara de Neubauer em microscópio de luz invertido. As células eram plaqueadas e cultivadas em densidades diferentes, de acordo com a necessidade do experimento, em placas e garrafas de sistema aberto (com tampas com filtro) contendo meio Earle 199 completo com 5% de NaHCO<sub>3</sub> e incubadas a 37° C em estufa com atmosfera de CO<sub>2</sub> 5% até o seu uso.

### 3.3. Animais

Os camundongos utilizados neste trabalho foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL), Fiocruz (Rio de Janeiro) ou comprados pelo Biotério Central da Unicamp (CEMIB), São Paulo. Para os ensaios de neurovirulência, foram utilizados camundongos Suíços, fêmeas, de 3 semanas de idade enquanto que para os ensaios de imunogenicidade, desafio, ELISPOT e linfoproliferação, foram utilizados camundongos A/J, fêmeas, de 4 a 6 semanas de idade. Todos os experimentos estão regulamentados e autorizados pelo Comitê de Ética e Uso de Animais (CEUA) no documento de no L-0032/08.

### 3.4. Obtenção de formas tripomastigotas sanguíneas de *Trypanosoma cruzi*

Formas tripomastigotas sanguíneas de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, foram obtidas de camundongos Suíço Webster infectados no pico da parasitemia. Vinte camundongos machos pesando entre 18 a 20 g foram inoculados via intraperitoneal com  $3 \times 10^5$  formas tripomastigotas e no 7º dia após infecção (dpi) foi realizado o isolamento e a purificação da massa parasitária. Os camundongos foram submetidos à eutanásia em câmara mortuária com CO<sub>2</sub> e o sangue obtido por punção cardíaca, utilizando-se 0,2 mL de citrato de sódio a 3,8% como anticoagulante. O sangue foi, então, centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm com a finalidade de separar as células sanguíneas e obter o plasma sanguíneo enriquecido em formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Em seguida, o plasma sanguíneo foi transferido para tubos cônicos (15 mL) e centrifugados por 15 min a 3500 rpm para sedimentação dos parasitas. O sedimento contendo parasitas e plaquetas foi ressuspensão em meio DMEM suplementado com 20% de SFB e mantido por 20 min em banho-maria a 37 °C. Este procedimento permite a formação de um grumo de plaquetas que pode ser facilmente removido, evitando a presença de plaquetas na massa parasitária. Após eliminação do grumo de plaquetas, os parasitas foram centrifugados por 15 min a 3.500 rpm e ressuspensos em 2 mL de DMEM. O número de parasitas/mL foi determinado pela quantificação em câmara de Neubauer ( $n^\circ$  de parasitas x diluição x  $10^4$ /mL) por microscopia de contraste de fase.

### 3.5. Vírus

#### 3.5.1. YF 17DD

Este vírus foi utilizado como controle em todos os experimentos e consiste no próprio vírus vacinal obtido de Bio-Manguinhos (FIOCRUZ) na forma liofilizada. Este foi reconstituído em 2 mL de água bidestilada estéril, seguido de homogeneização em agitador por 30 s, incubado em gelo por 10 min e adicionado de 3 mL de meio completo Earle 199.

Em seguida, toda a suspensão foi utilizada para propagar o vírus em monocamada de células Vero com 80.000 células/cm<sup>2</sup> até visualização de efeito citopático (CPE) intenso (4º dia pós-infecção). O sobrenadante de cultura foi misturado ao estabilizador (sorbitol 8%) e armazenado a -70° C em alíquotas de 1 mL.

#### 3.5.2. YF 17D/E200T3

Este é o vírus parental usado como controle nos experimentos de cinética viral e cujo arcabouço genético foi utilizado para clonar o inserto de interesse e originar os vírus recombinantes descritos neste trabalho. Ele é formado a partir do sistema de clones infecciosos com os plasmídeos pYFE200 (Figura 3.2) e pT3 (Figura 3.3), derivados dos plasmídeos pYF5`3`IV e pYFM5.2, respectivamente, cujo cDNA viral foi obtido de um clone da sub-cepa YF 17D 204 (Rice *et al.*, 1989). Assim, a partir de pYF5`3`IV e pYFM5.2, foi possível obter um molde de cDNA viral no qual se pode utilizar para geração de um molde de cDNA viral e obtenção de RNA viral sintetizado *in vitro*, permitindo, assim, após sua transfecção celular, a recuperação de partícula virais infectivas (Rice *et al.*, 1989). Tanto pYFE200 quanto pT3 foram criados a partir de mutações feitas no cDNA original de YF 17D-204 (Jabor, 2001), para a criação de sítios de enzima de restrição e introdução de algumas mutações específicas à sub-cepa 17DD, previamente reportadas por Dos Santos e equipe (1995).

Os dois plasmídeos (pYFE200 e pT3) contêm juntos o genoma do Vírus da Febre Amarela, sendo que o pYFE200 (de 6.905 pb) contém a seqüência 5' (posição genômica de FA de 1 a 2.271 nt, correspondente às regiões 5' UTR, genes C, prM/M e parte do gene de E) e a seqüência 3' (posição genômica de FA de 8.276 a 10.862 nt, correspondente às regiões dos genes NS5 e 3' UTR), enquanto que pT3 (de 9.939 pb) contém a região central do genoma de



FA (posição genômica de 1.373 a 9.428 nt, correspondente às regiões de parte do gene E, NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B e parte de NS5).

O plasmídeo pYFE200 contém ainda mutações no nucleotídeo 1.568, que permitiram a criação de um sítio de *EcoRV* na posição do aminoácido 200 da proteína E, conforme descrito por Bonaldo e equipe (2002). O vírus YF 17D/E200T3 assemelha-se ao YF 17DD nas propriedades de crescimento em células Vero mas apresenta tamanho de placa de lise pequeno em comparação ao YF 17DD.

### **3.6. Purificação e extração de ácidos nucleicos**

#### **3.6.1. Extração de DNA plasmidial**

Todas as preparações plasmidiais foram feitas com sistemas QIAprep da QIAGEN que realizam preparações em pequena (*Miniprep*), média (*Midiprep*) ou grande (*Maxiprep*) escala. Para extrair ácidos nucleicos em pequena escala com o sistema QIAprep *Miniprep* da QIAGEN, 3 mL da cultura de bactérias foram centrifugados por 1 min a 12.000x g, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 250 µL do tampão P1. Em seguida, 250 µL do tampão P2 foram adicionados para que houvesse lise celular e 350 µL da solução N3 foram adicionados para neutralizar a reação. A mistura foi centrifugada por 10 min a 14.000x g e, em seguida, o sobrenadante foi aplicado na coluna de sílica. Após centrifugação, a coluna foi lavada com 500 µL do tampão PB e 750 µL do tampão PE. O DNA foi eluído em 50 µL de tampão EB. A cada etapa onde se utiliza a coluna, a passagem do líquido foi facilitada por centrifugação a 12.000x g por 1 min.

O princípio das extrações com os sistemas de *Midiprep* e *Maxiprep* da QIAGEN é o mesmo do descrito anteriormente. A diferença é a quantidade de cultura de bactérias utilizada no início e a quantidade de DNA que se consegue ao final da purificação. De forma resumida, de 50 mL (midi) a 150 mL (maxi) (plasmídeos com alto número de cópias) ou de 150 mL (midi) a 250 mL (maxi) (plasmídeos com baixo número de cópias) de cultura de bactérias foram centrifugadas a 6.000x g por 15 min a 4° C e o sedimento foi ressuspensão em 6 mL (midi) ou 10 mL (maxi) do tampão P1. Depois, foi adicionada a mesma quantidade do tampão P2 e a mistura foi deixada à temperatura ambiente por 5 min para que houvesse a lise das células. Após a lise, foi adicionada a mesma quantidade do tampão P3 gelado que neutraliza a reação. Todo o lisado foi colocado em um cartucho com tampa e incubado à temperatura ambiente por 10 min. A coluna do sistema foi previamente equilibrada por meio

da aplicação de 4 mL (midi) ou 10 mL (maxi) do tampão QBT. O líquido foi retirado do cartucho e passado na coluna com o auxílio de um êmbolo. Após a passagem do lisado, a coluna foi lavada com 20 mL (midi) ou 60 mL (maxi) de tampão QC e o DNA eluído em 5 mL (midi) ou 15 mL (maxi) de tampão QF. Após a eluição, o DNA foi precipitado com isopropanol, lavado com etanol 70 % e eluído em 1 mL de tampão TE.

### **3.6.2. Extração de DNA de gel de agarose**

A extração de DNA de gel de agarose foi utilizada para purificar e isolar fragmentos nucleotídicos de peso molecular desejado, de outros fragmentos de pesos moleculares diferentes que compunham uma amostra heterogênea. Para isso as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE e os fragmentos de DNA foram visualizados após coloração com brometo de etídeo (0.5 µg/mL) (BIORAD) por aproximadamente 3 minutos. A área de gel contendo o fragmento de DNA de interesse pôde ser recortada do restante da malha com o auxílio de um bisturi e o DNA foi extraído por meio do sistema *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN) segundo o manual fornecido pelo fabricante. Este sistema baseia-se na separação do DNA por afinidade em colunas de sílica.

### **3.6.3. Purificação de fragmentos de PCR**

Amostras de PCR de produtos homogêneos gerados neste trabalho puderam ser purificadas utilizando o sistema *QIAquick PCR Purification* (QIAGEN) segundo o manual fornecido pelo fabricante. Este procedimento foi utilizado com a finalidade de eliminar reagentes utilizados em reações de PCR, de forma que estes não interferissem nas etapas posteriores, ao utilizar os fragmentos desejados. Este sistema baseia-se na separação do DNA por afinidade em colunas de sílica.

### **3.6.4. Precipitação de DNA**

A precipitação de DNA foi utilizada neste trabalho para purificação e aumento de concentração de amostras de ácidos nucléicos por meio do método de acetato de amônio/etanol (Sambrook *et al.*, 1989). Para isto, foram adicionados às amostras 0,5 volume de acetato de amônia (7,5 M), 3 volumes de etanol absoluto (Merck) e 20 µg de gliocogênio (Invitrogen), este último, utilizado de acordo com a conveniência. A mistura foi submetida à

centrifugação a 12.000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de DNA foi lavado após adição de 3 volumes de etanol a 80%, centrifugado por 5 minutos, nas mesmas condições, e o sobrenadante novamente descartado. Para retirada do excesso de etanol, as amostras foram submetidas a duas centrifugações adicionais com retirada de sobrenadante após cada uma. O precipitado de DNA foi submetido à secagem por exposição ao ambiente e ressuspensão em 10 µL de tampão TE.

### **3.6.5. Eletroforese de ácidos nucleicos**

A eletroforese de ácidos nucleicos foi realizada utilizando gel de agarose nas concentrações de 0,8% e 1% e TAE como solução tamponante do sistema. A corrida eletroforética foi realizada utilizando-se 90 - 120 V. Para visualização dos ácidos nucleicos, o gel foi exposto por aproximadamente 3 minutos a uma solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL (BIORAD), que é capaz de se intercalar às cadeias dos ácidos nucleicos e torna-se fluorescente sob incidência de luz ultravioleta (transiluminador luz UV a 365 nm — Pharmacia LKB Macro Vue). Os padrões de peso molecular utilizados foram *Low Mass* (Invitrogen), e *Hind III* (Invitrogen), tomando-os como referência foi também possível a quantificação de fragmentos de DNA por meio da comparação da intensidade de bandas da amostra com a dos padrões. As imagens dos géis obtidas com o transiluminador foram registradas utilizando-se câmera digital (Kodak DC 120 — programa Kodak 1D *Image Analysis*).

### **3.6.6. Extração de RNA total de sobrenadante celular com TRIZOL LS®**

O protocolo utilizado segue as orientações do fabricante, tendo sido originalmente descrito por Chomczynski e Sacchi (1987) e Chomczynski (1993). Resumidamente, 750 µL de TRIZOL LS (Invitrogen) foram adicionados a 250 µL de suspensão viral. Esse reagente é uma mistura comercial de fenol, clorofórmio e isotiocianato de guanidina. Em seguida, esta mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 5 min. Após este tempo, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e a mistura foi homogeneizada vigorosamente por 15 segundos, seguida de incubação por 5 min à temperatura ambiente. Após esta incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000x g por 15 min para separação da mistura em três fases. A fase inferior possui restos celulares e o

reagente TRIzol LS®; a fase intermediária possui proteínas; e a fase aquosa superior é a fase de interesse por possuir o RNA.

A fase aquosa foi cuidadosamente removida e transferida para outro tubo de 1,5 mL onde foram adicionados 1 µL de glicogênio (20 µg/µL; Invitrogen) e 500 µL de isopropanol absoluto. As amostras foram incubadas por 15 min, centrifugadas a 12.000x g por 15 min e o sobrenadante descartado. Em seguida, foi adicionado 1 mL de etanol 70 % às amostras e estas foram novamente centrifugadas a 12.000x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado, o RNA obtido foi ressuspense em água livre de RNase e armazenado a -70 °C ou utilizado imediatamente na reação de RT-PCR. Esta etapa foi sempre realizada em condições de esterilidade e com material tratado, livre de nucleases.

### **3.7. Seqüenciamento nucleotídico**

O seqüenciamento de ácidos nucléicos foi feito pelo método da terminação da cadeia por dideoxiribonucleotídeo (ddNTP) descrito por Sanger *et al.*, (1977). Em todas as reações foi utilizado o sistema *Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit*® (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante. De forma resumida, em um tubo de 200 µl foi colocado 1 µl do oligonucleotídeo na concentração de 5 pmoles/µl e o DNA na concentração desejada (entre 10-50 ng) por 5 min a 95 °C. Depois, a essa mistura acrescentou-se 2 µl do tampão 2,5 X, 2 µl do *Big Dye Terminator*® e água para um volume final de 10 µl. Os tubos foram colocados no termociclador com um programa de 30 ciclos a 96° C por 10 s, 45° C por 5 s e 60° C por 4 min. As amostras foram precipitadas com isopropanol, lavadas com etanol 60% e ressuspensas em formamida. Os produtos da amplificação foram seqüenciados em um aparelho ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) pela Plataforma Multi-usuário de seqüenciamento – PDTIS/FIOCRUZ. As seqüências foram analisadas por meio do programa Chromas v. 3.0 (Technelysium Pty Ltd) e do SeqManII do conjunto *Lasergene*, v.5.07 (DNASStar, Inc.).

Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de seqüenciamento estão descritos na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Oligonucleotídeos utilizados nas reações de seqüenciamento

Oligonucleotídeos (sentido)	Seqüência (5' - 3')	Posição nucleotídica (gene)
RG 36 (+)	CCTACTGGTCTTGGCTGTTGG	940 – 960 (prM)
RG 65 (-)	TGTAAAGGTTGTTGTC	1781 – 1799 (E)
RG 48 (+)	GTATCCCAGTGAATGAGGC	4181 - 4200 (NS2B)
RG 184 (-)	GCGATCAACTGGACCT	4884 – 4900 (NS3)
RG 444 (+)	ACGTCTCACTTACCAGTGGCACAA	2122 - 2146 (E)
RG 418 (+)	TCACTTACTCGACGGACAAAGGCA	2582 - 2606 (ASP-2 <sub>261-380</sub> )
RG 419 (-)	AGGTATTGCCTTTGTCCGTCGAGT	2573 – 2597 (ASP-2 <sub>261-380</sub> )
RG 440 (-)	AACCATACTGCAGACCATCCCGAA	2772 - 2795 (NS1)

### 3.8. Construção dos vírus recombinantes YF 17D/E200/Tc e YF 17D/NS2B3/

#### 3.8.1. Estratégia de clonagem

Para a clonagem de seqüência codificadora do epítopo (TEWETGQI – posição 320-327 aminoácidos de ASP-2) de *T. cruzi* no genoma de YF 17D foram utilizadas duas abordagens previamente descritas: a de inserção na alça *fg* (Domínio II) da proteína de Envelope (E) (Bonaldo *et al.*, 2002) e a de inserção na região intergênica entre as proteínas não-estruturais NS2B e NS3 (McAllister *et al.*, 2000) com algumas modificações.

Para a clonagem na alça *fg* da proteína de Envelope, utilizamos como alvo de inserção o plasmídeo pYFE200 contendo sítio para *EcoRV* (Bonaldo *et al.*, 2002) (Figura 3.2), enquanto que para a clonagem entre NS2B e NS3, foi utilizado o plasmídeo pT3 contendo a porção central do genoma de FA, o qual foi mutagenizado para se criar um sítio de restrição para *Sma* I na região intergênica que codifica para NS2B e NS3 (Archer e Galler, não publicado) através de mutagênese sítio-dirigida (*QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit*, Agilent Technologies), em presença de oligonucleotídeos contendo as alterações desejadas. Essa mutação inseriu um códon CCC na posição genômica 4574 de FA e deu origem ao plasmídeo pT3/*Sma*I (Figura 3.3).

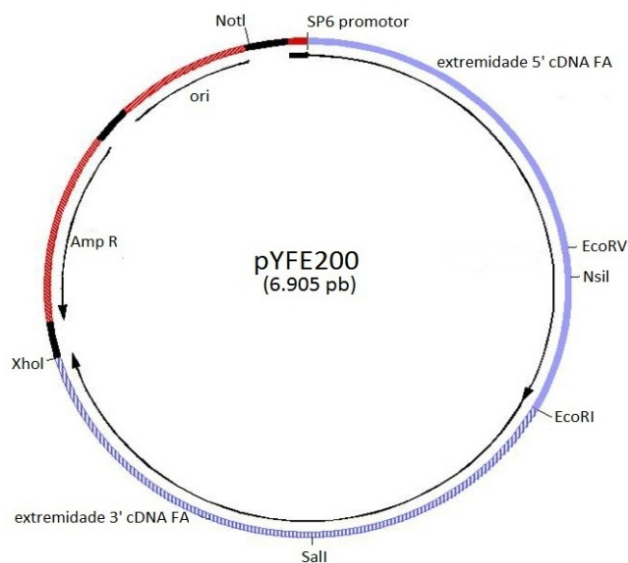


Figura 3.2 - Mapa do plasmídeo pYFE200. Plasmídeo de 6905 pb. Em azul sólido, extremidade 5' (1 a 2.271 nt) e em azul rachurado, extremidade 3' (8.276 a 10.862 nt) do cDNA de YF. Estas regiões são fusionadas através de um sítio de *EcoRI*. Sítio *EcoRV* (posição nt 1.568) que permitiu a inserção de epítipo heterólogo. Em vermelho rachurado, a origem de replicação do plasmídeo (*ori*) e região codificante para resistência a Ampicilina (*Amp<sup>R</sup>*). Em vermelho sólido, seqüência do promotor SP6 polimerase. Marcação de região de restrição para *EcoRV* (posição 1.568 nt). Imagem gerada em *Gene Construction Kit* v. 2.5.

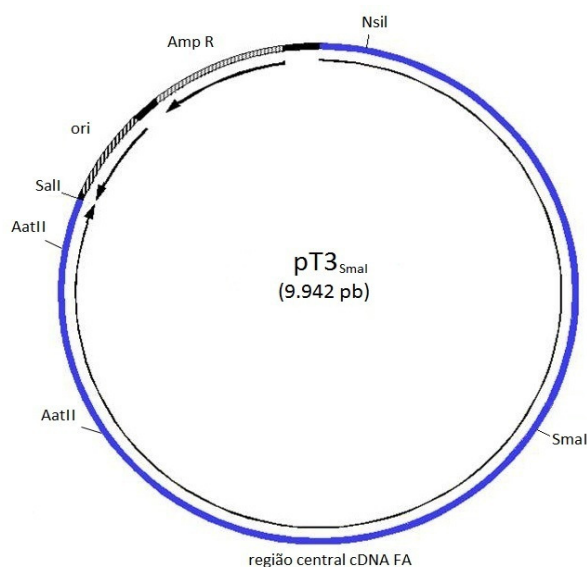


Figura 3.3 – Mapa do plasmídeo pT3/*SmaI* . Plasmídeo de 9942 pb. A região em azul corresponde à região central do genoma de FA (1373 a 9428 nt), na qual estão sinalizados os sítios de restrição da enzima *AatII* (posições 9.897 e 7.085 nt) e sítio para *SmaI* (4574 nt). Em cinza rachurado, são

mostrados a origem de replicação do plasmídeo (ori) e o gene de resistência a Ampicilina (Amp<sup>R</sup>). Imagem gerada em *Gene Construction Kit* v. 2.5.

Para obtenção dos vírus recombinantes, os plasmídeos pYFE200 e pT3/*SmaI* foram submetidos à digestão por *EcoRV* e *SmaI*, respectivamente, para linearizar a molécula e permitir a inserção do epítipo TEWETGQI. Foi criado um par de oligonucleotídeos sintéticos complementares e desforilados com o uso de códons otimizados para o vírus da FA (Tabela 3.2). Estes foram anelados e ligados no sítio de restrição de *EcoRV* de pYFE200 (para gerar o vírus YF17D/E200/Tc) ou no sítio *SmaI* de pT3/*SmaI* (para gerar o vírus YF17D/NS2B3/Tc). Estes procedimentos foram realizados da seguinte maneira: uma solução de 1 nmol de cada oligonucleotídeo foi incubada a 90° C por 2 min, a 25° C por 5 min, e em seguida, foi mantida em gelo. A clonagem foi executada com incubação de cerca de 100 ng de DNA plasmidial, 2 nmol de oligonucleotídeos pareados em presença de enzima T4 DNA Ligase e seu tampão correspondente (Epicentre) por 18 horas a 10° C durante a noite. Os plasmídeos recombinantes foram denominados de pYFE200/Tc ou pT3NS2B3/Tc. Após incubação e inativação, bactérias competentes *E. coli* MC1061 foram transformadas com 10 ng da ligação e os plasmídeos recombinantes purificados foram pré-triados pela digestão com *EcoRV* e *NotI* (pYFE200/Tc) ou *SmaI* e *AatII* (pT3NS2B3/Tc), seguido do seqüenciamento nucleotídico para que se confirmasse a correta orientação do inserto.

Tabela 3.2 - Iniciadores utilizados para clonagem de epítipo TEWETGQI

Oligonucleotídeos	Sentido	Seqüência (5` - 3`)*
RG 347	+	ACA GAA TGG GAG ACA GGA CAG ATC
RG 348	-	GAT CTG TCC TGT CTC CCA TTC TGT

\* A seqüência nucleotídica possui trocas (em sublinhado) em relação à original devido à otimização dos códons

### 3.8.2. Obtenção dos moldes de cDNA

Para montagem dos cDNAs virais, utilizamos o sistema de dois plasmídeos descrito por Rice e equipe (1989). A clivagem destes plasmídeos de FA com as enzimas *NsiI* e *SalI*, a ligação conjunta dos fragmentos gerados por uma DNA ligase seguida da

linearização desta preparação com a enzima *XhoI*, para formação do extremo 3' no molde viral, leva à obtenção de um molde de cDNA contendo todo o genoma viral.

Para tal, os clones recombinantes de pYFE200/Tc ou pT3NS2B3/Tc, confirmados por seqüenciamento foram primeiramente purificados em larga escala com o sistema QIAprep *Maxiprep*® (QIAGEN), conforme descrito na seção 3.6.1. As preparações foram analisadas e quantificadas em gel de agarose 0,8% / TAE corado com BrEt, como descrito anteriormente.

Em seguida, tanto os plasmídeos recombinantes (pYFE200/Tc ou pT3NS2B3/Tc) quanto os parentais (pYFE200 ou pT3) foram digeridos com as endonucleases *NsiI* / *Sall* (Promega), em reações utilizando 30U de cada enzima para cada 1,5 µg de DNA plasmidial nas condições fornecidas pelo fabricante em volume final de 200 µL, em incubação a 37° C por 2 horas. Estas amostras foram purificadas por QIAquick PCR *Purification Kit* (QIAGEN), segundo orientações do fabricante. Posteriormente, dois conjuntos destes plasmídeos foram submetidos à reações de ligação utilizando em um volume final de 30 µL, 300 ng dos plasmídeos pT3 ou pT3NS2B3/Tc, 200 ng do plasmídeo pYFE200 ou pYFE200/Tc em presença de 1U da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen), em uma incubação a 4° C durante a noite. Os dois conjuntos de moldes de cDNA gerados consistiram da ligação dos seguintes plasmídeos: 1) pYFE200/Tc (recombinante) e pT3; e 2) pYFE200 e pT3NS2B3/Tc (recombinante).

Após o período de incubação, foi realizada a inativação da ligase por 20 min a 65° C e as amostras foram linearizadas em uma reação de digestão com a enzima *XhoI* (Promega) a 37° C por 3hs. As amostras digeridas foram precipitadas com acetato de amônia 7,5 M, lavadas com etanol 80%, eluídas em TE e analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% / TAE corado com BrEt.

A Figura 3.4 esquematiza a obtenção dos moldes de cDNA correspondentes a pYFE200T3/Tc (para gerar o vírus YF17D/E200/Tc) e pT3NS2B3E200/Tc (para gerar o vírus YF17D/NS2B3/Tc), de acordo com a tecnologia do clone infeccioso de FA. A montagem do molde pYFE200 / pT3 sem inserto, também foi realizada para a produção do vírus parental não recombinante, utilizado como referência em alguns ensaios deste trabalho.



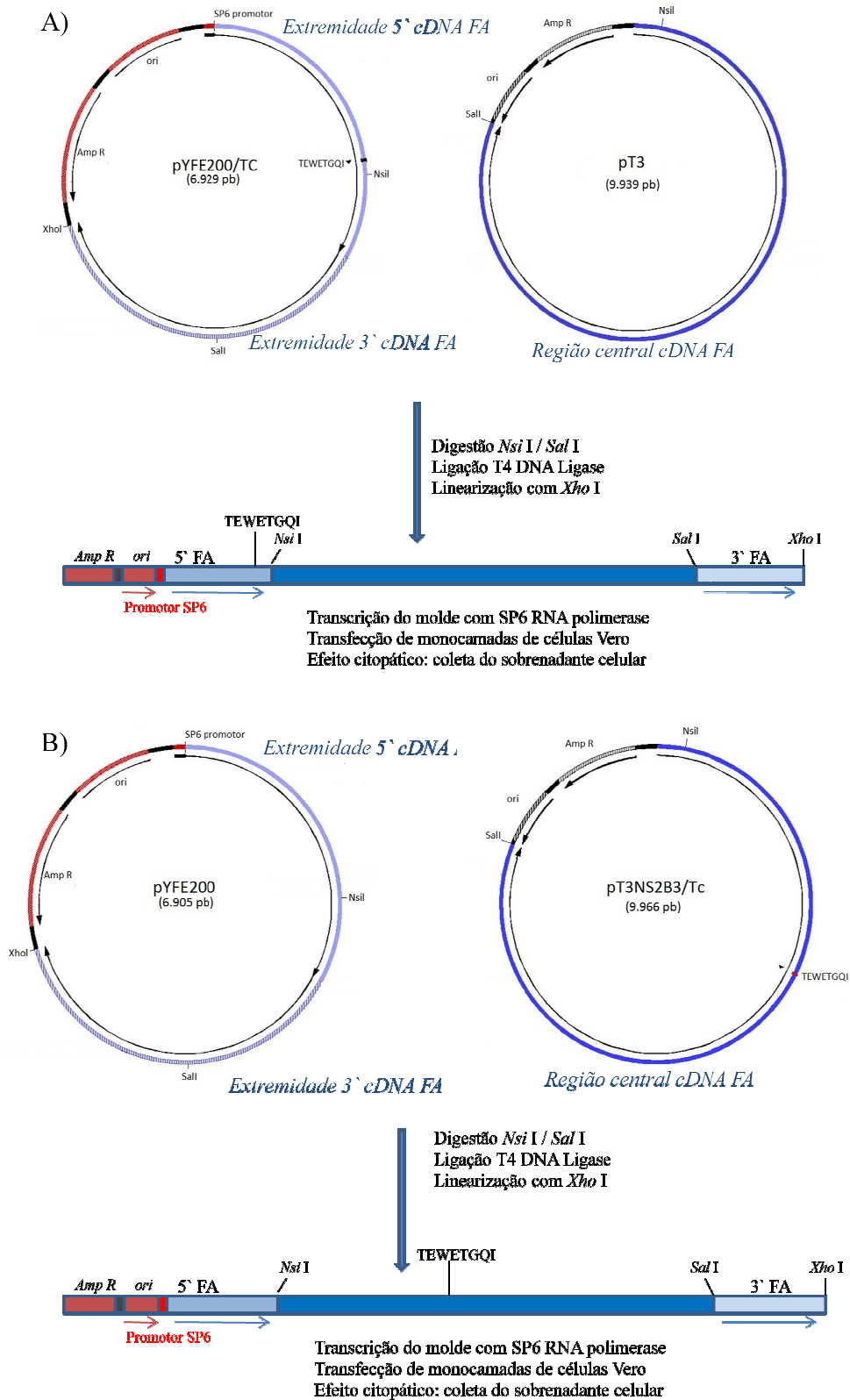


Figura 3.4 – Obtenção dos moldes de cDNA e produção dos vírus recombinantes através do sistema de dois plasmídeos (tecnologia do clone infeccioso de FA). A) Obtenção do vírus YF17D/E200/Tc pela ligação de pYFE200/TC (recombinante) e pT3; e B) Obtenção do vírus YF17D/NS2B3/Tc pela ligação de pYFE200 e pT3NS2B3/Tc (recombinante).

### 3.9. Construção do vírus recombinante YF 17D/ENS1/Tc

#### 3.9.1. Estratégia de clonagem

Para utilizar o vírus vacinal YF 17D como vetor de expressão, desenvolveu-se uma estratégia de clonagem do cassete heterólogo entre os genes do E/NS1 (Bonaldo *et al.*, 2007). Para isso, algumas seqüências conservadas nessa região foram duplicadas: foram adicionados nove aminoácidos do amino-terminal de NS1 do vírus da Febre Amarela antes do inserto, seguido da seqüência correspondente à haste-âncora (HA) completa de DENV-4. Como fonte dos fragmentos gênicos do inserto de ASP-2<sub>261-380</sub> (*T. cruzi*) e da HA de DENV-4, foram utilizados dois plasmídeos: pIgSPclone9 (Boscardin *et al.*, 2003), o qual contém a seqüência completa de ASP-2 (cepa Y) e pFA/DEN4, que compõe o clone infeccioso do vírus quimérico FA/DENV4, no qual os genes das proteínas estruturais E e prM do vírus de FA foram substituídos pelos homólogos do vírus da Dengue 4 (R. Galler, em preparação).

#### 3.9.2. Reações de PCR

O cassete de expressão recombinante foi todo montado por reações de PCR, utilizando-se de oligonucleotídeos descritos na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Oligonucleotídeos utilizados na montagem do cassete heterólogo entre os genes E / NS1

Oligonucleotídeos	Seqüência (5' - 3')	TM <sup>1</sup>
<b>RG381 (+)</b>	CCATCAACTTCGGCCGAAAGGATGTTGTGACTG CTGGTGG	69,0° C
<b>RG382 (-)</b>	CCTCTGTATGTGGACTCAAACATCTTGGTGATG AGGGCTCCCACACG	69,1° C
<b>RG383 (+)</b>	CGTGTGGGAGCCCTCATCACCAAGATGTTTGAG TCCACATACAGAGG	69,1° C
<b>RG380 (-)</b>	GCCAAAGTTGATGGCGCATCCTTGATCGGCGCC AACTGTGAAGCCC	72,6° C

<sup>1</sup>TM, do inglês *Temperature Melting*, é a temperatura em que 50% da dupla-hélice do DNA se dissocia em duas fitas simples

Para a primeira etapa de PCR foram usados dois conjuntos de iniciadores: RG381 (+) e RG382 (-), para o fragmento ASP-2<sub>261-380</sub>, e RG383 (+) e RG380 (-), para o fragmento HA de DENV-4, gerando produtos de 406 pb e 336 pb, respectivamente. Para amplificarmos o fragmento de ASP-2<sub>261</sub>, utilizamos o iniciador RG381 (+), que possui na sua porção 5', uma seqüência nucleotídica, a qual não se parecia durante a reação, que corresponde aos 27 primeiros nucleotídeos do gene NS1. O iniciador RG382 (-) possui na sua porção 5', uma seqüência, a qual também não se parecia, e que é correspondente aos 27 primeiros nucleotídeos do N-terminal de H1 de DENV-4.

O segundo conjunto de iniciadores foi utilizado para gerar o fragmento de 336 pb, correspondente à região de HA de DENV-4. Assim, foi utilizado o iniciador RG383 (+), que possui em sua região 5', a seqüência correspondente aos últimos 21 nucleotídeos de ASP-2<sub>261-380</sub>, a qual não se parecia, e o iniciador RG380 (-), que possui em sua região 5', a região codante para os primeiros 27 nucleotídeos de NS1, e que não se parecia ao molde.

Para a segunda etapa de PCR (de fusão), foram utilizados os iniciadores RG381 (+) e RG380 (-), em parte homólogos aos extremos 5' e 3', da região do fragmento de ASP-2<sub>261-380</sub> e da HA de DENV-4, respectivamente. Estes iniciadores se pareiam nas extremidades dos dois fragmentos obtidos da primeira etapa de PCR, unindo-os em um único produto de PCR, cujo peso molecular é de 708 pb.

As etapas de PCR acima descritas estão esquematizadas na Figura 3.5.

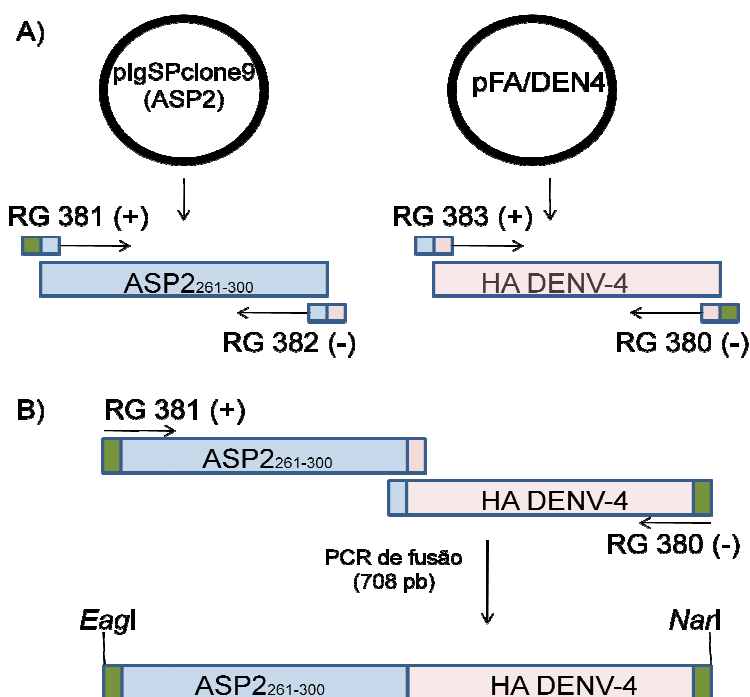


Figura 3.5. Esquema de amplificação do cassete de expressão heterólogo. A) Primeira etapa de PCR. A região de ASP-2<sub>261-380</sub> foi amplificada a partir do plasmídeo pIgSPclone9 utilizando os oligonucleotídeos RG381 (+) e RG382 (-). A região de HA de DENV-4 foi amplificada a partir do plasmídeo pFA/DEN4 utilizando os oligonucleotídeos RG383 (+) e RG380 (-). B) Segunda etapa de PCR (de fusão). Os dois produtos de PCR foram gerados com uma das extremidades complementares entre si e foram unidos por PCR de fusão utilizando os oligonucleotídeos RG381 (+) e RG380 (-), o que gerou o cassete de expressão com 708 pb. Em verde, seqüência correspondente aos 27 nucleotídeos do N-terminal de NS1 de FA.

Para a primeira etapa de PCR, cada amplificação foi feita utilizando-se 3 ng do vetor molde pIgSPclone9 e 30 ng de pFA/DEN4, dNTPs (1 mM), MgSO<sub>4</sub> (1mM), 1 pmol de cada oligonucleotídeo, 1 U de *Platinum Pfx DNA Polymerase* (Invitrogen), tampão Pfx Amplification Buffer (1x) (Invitrogen) e água destilada estéril para 50 µL de volume final. As reações foram submetidas a um ciclo inicial de desnaturação a 94° C por 5 minutos e, posteriormente, 30 ciclos de incubação a 94° C por 15 segundos, 55° C por 30 segundos, 68°C por 1 minuto. Adicionalmente, foi realizada uma etapa de extensão final a 68° C por 5 minutos.

Para a segunda etapa de PCR de fusão, cada amplificação foi feita utilizando-se 40 ng do produto de PCR contendo o gene de ASP-2<sub>261-380</sub> (406 pb) e 30 ng do produto de PCR contendo o gene de HA de DENV-4 (336 pb), dNTPs (1 mM), MgSO<sub>4</sub> (1mM), 1 pmol de cada oligonucleotídeo, 1 U de *Platinum Pfx DNA Polymerase* (Invitrogen), tampão Pfx

*Amplification Buffer* (1x) (Invitrogen) e água destilada estéril para 50 µL de volume final. As reações foram submetidas a um ciclo inicial de desnaturação a 94° C por 5 minutos e, posteriormente, 30 ciclos de incubação a 94° C por 15 segundos, 55° C por 30 segundos, 68° C por 1 minuto. Adicionalmente, foi realizada uma etapa de extensão final a 68° C por 5 minutos. As reações de PCR foram realizadas em Termociclador Applied Biosystems (PCR System 9700, Gene Amp).

Os fragmentos obtidos foram purificados pelo sistema *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN), segundo orientações do fabricante, e analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE.

### **3.9.3. Clonagem do cassete de expressão no plasmídeo pGEM-T**

Os produtos de PCR foram adenilados para a realização da subclonagem em pGEM-T. Para a reação de adenilação, foram utilizados no mínimo 150 ng de fragmento de PCR, dATP (0,2 mM), 5U da enzima Go Taq (Promega), nas condições fornecidas pelo fabricante em volume final de 10 µL e em uma incubação a 70° C por 30 minutos. Após esta reação, o fragmento adenilado foi incubado a 4° C durante a noite com o vetor pGEM-T numa proporção de 3 moléculas de inserto para 1 molécula do vetor, em uma reação de ligação utilizando-se 1 U da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen), em um volume final de 6 µL. Os produtos de ligação foram posteriormente utilizados na transformação de bactérias e as preparações plasmidiais de culturas bacterianas foram realizadas. Algumas foram submetidas à reação de clivagem pela enzima de restrição *NarI* (Promega), utilizando-se 3U da enzima e aproximadamente 100 – 300 ng de DNA, para um volume final de 10 µL. As reações foram submetidas à incubação a 37° C por 1 hora e posteriormente visualizadas em gel de agarose 0,8%. Esta subclonagem teve como objetivo obter grande quantidade de DNA correspondente ao cassete de expressão.

### **3.9.4. Clonagem do cassete de expressão no plasmídeo TOPO-pCR-BluntII**

O cassete de expressão purificado foi adicionado ao plasmídeo pCR-Blunt II TOPO® (Invitrogen) que utiliza-se de uma topoisomerase ao invés de uma T4 DNA ligase para unir o fragmento a ser clonado ao vetor. Esse plasmídeo é desenhado para clonar fragmentos com pontas cegas, como é o caso dos gerados por polimerases com atividade revisora 3'-5'. Basicamente, 1 µL do produto de PCR foi adicionado à 1 µL do vetor e 1 µL

de uma solução salina presente no sistema originando a reação de clonagem. A mistura foi homogeneizada e mantida à temperatura ambiente por 5 min, procedendo-se então à transformação em células *E. coli* DH5 quimio-competentes comerciais (Invitrogen). As preparações plasmidiais de culturas bacterianas foram realizadas e pré-visualizadas em gel de agarose 0,8%. Amostras com perfil de migração mais alto eram indicativas da presença de inserto e foram selecionadas para reação de sequenciamento, com a finalidade de confirmarmos a sequência nucleotídica do inserto. Os iniciadores utilizados no sequenciamento nucleotídico deste plasmídeo foram: M13F(+) e M13R(-), fornecidos pelo fabricante.

### **3.9.5. Clonagem no plasmídeo pT3 *EagI/NarI***

O plasmídeo bacteriano pT3 faz parte do sistema de dois plasmídeos do clone infeccioso de FA (Rice *et al.*, 1989). Ele contém a região central do cDNA viral de FA (posição genômica de 1373 a 9428 do vírus FA). Utilizamos um derivado do plasmídeo pT3, previamente mutagenizado para conter os sítios de restrição *EagI* (C/ GGCCG) e *NarI* (GG/CGCC) nas posições nucleotídicas 1113 nt e 1799 nt, respectivamente. Este novo plasmídeo foi denominado de pT3*EagI/NarI* (Figura 3.6). Este procedimento permitiu a realização de uma clonagem do tipo bidirecional, aumentando a probabilidade de obtermos a inserção do cassete em correta orientação no plasmídeo pT3*EagI/NarI*, pois o sítio para *EagI* está presente no início do cassete enquanto que *NarI* encontra-se no final do cassete de expressão.

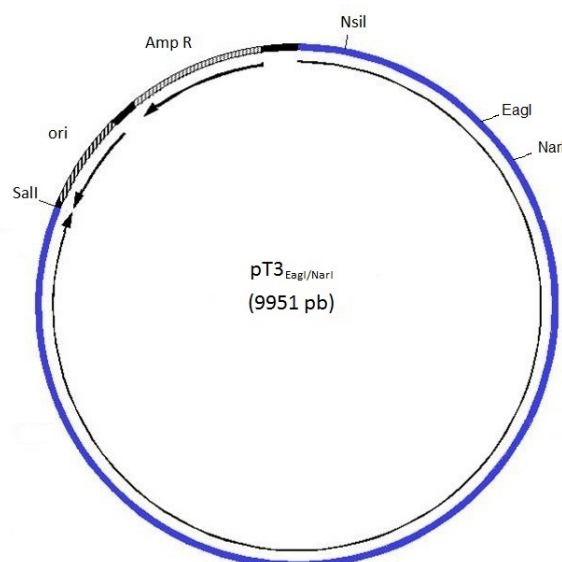


Figura 3.6 – Mapa do plasmídeo bacteriano pT3*EagI/NarI* de 9.951 pb contendo a região central do genoma do vírus FA. O cassete heterólogo foi clonado entre os sítios de *EagI* (posição nucleotídica de 1113) e *NarI* (posição nucleotídica de 1799) do plasmídeo. O gene de resistência a ampicilina (AmpR) e a origem de replicação (ori) também são mostrados. Plasmídeo desenhado com o programa Gene Construction Kit 2.5.

Digerimos 2 µg do plasmídeo pT3 *EagI/NarI* com 5 U da endonuclease *Eag I* ou *Nar I* (Promega) e submetemos a uma incubação a 37° C por 3 h.

Procedemos à etapa de retirada do cassete do plasmídeo pCR-Blunt II TOPO® recombinante através da dupla digestão deste com as enzimas de restrição *EagI* e *NarI*, sítios de restrição que ladeiam a sequência correspondente ao cassete. Como o plasmídeo possuía múltiplos sítios de restrição para ambas as enzimas, realizamos primeiramente a digestão pela enzima *EagI*. A partir dos fragmentos visualizados em gel de agarose 1%, extraímos e purificamos o fragmento de cujo peso molecular esperava-se conter a sequência do cassete recombinante (banda de 770 pb) através do *Gel Extraction kit* (QIAGEN) e procedemos à digestão deste fragmento por *NarI*, o que liberaria o inserto recombinante do fragmento excedente de 62 pb, oriundo do próprio vetor. O inserto liberado pela digestão foi novamente purificado por meio do *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN). O cassete purificado foi quantificado em gel de agarose e ligado ao pT3 *EagI/NarI*, previamente digerido por *EagI* e *NarI*, por meio da T4 DNA Ligase (5 U/µL - Invitrogen).

Para a reação de clivagem do plasmídeo TOPO recombinante por *EagI*, foram utilizadas 3U de enzima e aproximadamente 100 – 300 ng de DNA, em um volume final de 10 µL. Para a reação de clivagem do fragmento de 770 pb por *NarI*, foram utilizadas 2U de

enzima para aproximadamente 10 - 30 ng de DNA, em um volume final de 50 µL. Ambas as reações foram submetidas à incubação por 37° C por 1 hora e posteriormente, foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

A reação de ligação foi feita na proporção de 3:1 (inserto:vetor) e utilizou 100 ng do pT3*EagI/NarI* digerido, 21 ng do inserto digerido, 1 µL da ligase e 4 µL do seu tampão 5 X, totalizando 20 µL de volume final e foi incubada a 4°C por 16 h. Após a incubação, procedeu-se à transformação por choque térmico, como descrito anteriormente, de 2 µL da reação de ligação em 50 µL de células de *E. coli* SURE quimiocompetentes (Stratagene). Preparações plasmidiais em pequena escala dessas colônias feitas com o sistema *QIAprep Miniprep* (QIAGEN), foram submetidas à digestão por *Nar I* (Promega), utilizando 3U desta enzima, e analisadas em gel de agarose 0,8% pela comparação da menor ou maior migração devido à presença de inserto ou não. Mesmo tratando-se de uma clonagem unidirecional, prosseguimos com o seqüenciamento nucleotídico de alguns plasmídeos recombinantes para confirmação da seqüência do cassete heterólogo, utilizando dos oligonucleotídeos que flanqueiam a região do cassete: RG 444 (+), RG 418 (+), RG 419 (-) e RG 440 (-) (Tabela 3.2). As construções contendo o cassete íntegro foram denominadas de pT3-ASP2 e foram utilizadas em preparações plasmidiais de larga-escala, conforme descrito anteriormente (seção 3.6.1).

### **3.9.6. Obtenção dos moldes de cDNA**

Para montagem dos cDNAs virais, os plasmídeos recombinantes pT3-ASP2 e o plasmídeo pYFE200 foram quantificados em gel de agarose 0,8 %/TAE corado com BrEt, como descrito anteriormente. Em seguida, 1,5 µg de DNA plasmidial de pT3-ASP2 assim como do pYFE200 (sem inserto) foram digeridos com 3 U de cada uma das endonucleases *NsiI* e *SalI*, simultaneamente, por 3 h a 37° C. Estas amostras foram purificadas por *QIAquick PCR Purification* e, posteriormente, utilizadas em reações de ligação em volume final de 30 µL com: 300 ng dos plasmídeos pT3-ASP2, 200 ng do plasmídeo pYFE200 e 1 U da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen) em uma incubação a 4° C durante a noite, nas condições fornecidas pelo fabricante.

Após o período de incubação, foi realizada a inativação da ligase por 20 minutos a 65° C e as amostras foram linearizadas em uma reação de digestão com a enzima *XhoI* (Promega), conforme descrito na seção 8.2. A Figura 3.7 esquematiza a obtenção do molde de



cDNA capaz de gerar o vírus YF17D/ENS1/Tc, de acordo com a tecnologia do clone infeccioso de FA.

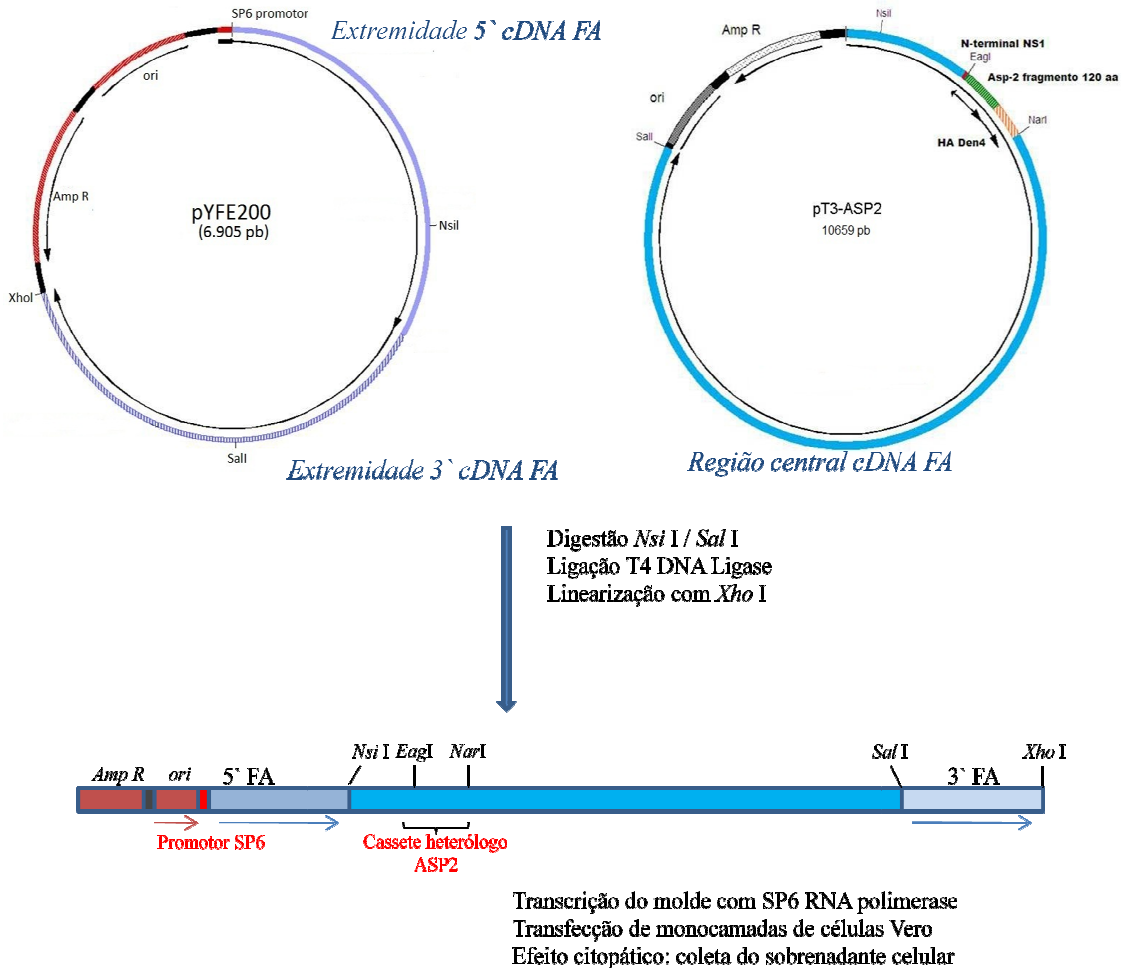


Figura 3.7. Obtenção do molde de cDNA e produção do vírus recombinante YF17D/ENS1/Tc através do sistema de dois plasmídeos (tecnologia do clone infeccioso).

### 3.10. Obtenção dos vírus recombinantes

#### 3.10.1. Transcrição *in vitro* dos moldes de cDNA dos vírus YF 17D

Os moldes de cDNA linearizados (pT3 sem inserto ligado ao pYFE200/Tc, pT3NS2B3/Tc ligado ao pYFE200 sem inserto, e pT3-ASP2 ligado ao pYFE200 sem inserto, além do controle pT3 ligado ao pYFE200) possuem em sua região 5' um promotor do bacteriófago SP6 possibilitando a transcrição *in vitro* do cDNA em RNA viral infeccioso pela SP6 RNA Polimerase. A transcrição foi feita utilizando o sistema *AmpliScrib SP6 High Yield*

*Transcription* (Epicentre), em condições livres de RNase e seguindo as recomendações do fabricante. Para cada reação de transcrição foram utilizados 100 ng de cada molde de cDNA linearizado, 1 µL do tampão 10 X do sistema, 10 mM de DTT, 7,5 mM de cada ribonucleotídeo (NTP) (menos do GTP que foi colocado a 0,75 mM), 3 mM de análogo de cap, 20 U de RNAsin (Promega), 2 µL da enzima SP6 RNA Polimerase. A reação foi incubada a 37° C por 2 h e a integridade do RNA transcrito foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% / TAE, na ausência de qualquer tipo de nuclease.

### **3.10.2. Transfecção dos RNAs virais em células Vero e regeneração dos vírus**

Aproximadamente 1 µg de cada RNA, previamente transcrito, foi transfectado em monocamada de células Vero (30.000 células/cm<sup>2</sup>), preparadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup>, com o emprego de 20 µg do lipídeo catiônico LipofectAmine (LA) (Gibco-BRL) na presença de 1 mL de PBS-DEPC 1 X. O RNA transcrito, o PBS-DEPC e a Lipofectamina foram misturados e incubados no gelo por 10 min. O meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com PBS-DEPC. Em seguida, o complexo RNA-LA em tampão foi adicionado sobre a monocamada de células e a garrafa foi incubada por 20 min, à temperatura ambiente com agitação a cada 2 min.

Após a incubação, todo o sobrenadante da garrafa foi retirado e foram adicionados 12 mL de meio Earle 199 completo com 5% de NaHCO<sub>3</sub> (sistema aberto) e as células foram incubadas a 37° C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e observada diariamente em microscópio invertido para verificar a presença de CPE (efeito citopático), caracterizando a infecção viral. Foi realizado um controle negativo em que se adicionou apenas PBS-DEPC 1 X e Lipofectamina (sem RNA) à monocamada de células.

Com o aparecimento de CPE intenso, o sobrenadante de transfecção (1P) de cada vírus foi recolhido na presença de 8% de sorbitol e imediatamente estocado a -70° C. Uma alíquota de sobrenadante de transfecção (1P) de cada amostra foi submetida à extração de RNA pelo método do TRIzol LS (seção 3.6.6) e os RNAs empregados em reações de RT-PCR utilizando as enzimas M-MLV RT e Taq Polimerase para verificar a presença das inserções (seção 3.11.3). O DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8 % e as seqüências analisadas por meio de seqüenciamento nucleotídico (seção 3.7).

### **3.10.3. Produção dos estoques virais de segunda passagem celular**

Foi preparado um estoque 2P de cada vírus por meio da infecção de células Vero (62.500 células/cm<sup>2</sup>), preparadas em uma garrafa T-175 cm<sup>2</sup>, através da adição de 5 mL do sobrenadante de 1P, seguido de incubação a 37° C por 1 h para adsorção do vírus, agitando-se a garrafa a cada 15 min. Passado o tempo de incubação, 75 mL de meio Earle 199 sem gentamicina e com 5% de NaHCO<sub>3</sub> foram adicionados à garrafa que foi novamente incubada a 37° C em estufa até o aparecimento de CPE.

Após a visualização de CPE na garrafa, o seu sobrenadante foi coletado, aliquotado e estocado a -70° C, como descrito para 1P. Uma alíquota foi utilizada para extração de RNA e reação de RT-PCR (seção 3.11.3), a fim de verificar a integridade das inserções em cada vírus recombinante. Os oligonucleotídeos que foram utilizados no RT-PCR da 1P e 2P correspondem às seqüências do genoma viral que flanqueiam o inserto, tendo sido utilizados: RG 36 (+) e RG 65 (-) para o vírus YF17D/E200/Tc; RG 48 (+) e RG 184 (-) para o vírus YF17D/NS2B3/Tc e RG 174 (+) e RG19 (-) para o vírus YF17D/ENS1/Tc (Tabela 3.5).

## **3.11. Caracterização viral**

### **3.11.1. Titulação viral por contagem de placas de lise**

A titulação das amostras virais obtidas em diferentes etapas deste trabalho foi realizada infectando-se monocamada de células Vero em densidade de 50.000 células /cm<sup>2</sup>, preparadas em placas de 24 poços (2 cm<sup>2</sup>/ poço). No momento da infecção, foram depositados sobre a monocamada 100 µL das suspensões virais, previamente preparadas com meio de cultura Earle 199 completo, obtidas por diluições seriadas de 10<sup>1</sup> a 10<sup>6</sup>. As placas foram incubadas por 1 h para adsorção viral a 37° C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e agitação manual a cada 15 min. Em seguida, o excesso de vírus de cada poço foi aspirado e 1 mL de carboximetilcelulose 3% (CMC) com meio Earle 199 acrescido de 5 % NaHCO<sub>3</sub> foi adicionado a cada poço. As placas foram novamente incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> (5 %) a 37°C por 7 dias. Após esse período, as placas foram fixadas pela adição de uma solução de formol 10 % a cada poço da placa durante 12h. Após a incubação, as placas foram lavadas com água, coradas com uma solução de cristal violeta a 0,02% por 30 min, novamente lavadas e colocadas para secar.

O número de placas de lise de cada diluição foi contado e o título do vírus foi determinado de acordo com a seguinte fórmula:

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

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

$\log_{10}M$  = média do n° de placas de lise contadas em uma determinada diluição

$\log_{10}ID$  = inverso da diluição onde as placas de lise foram contadas

$\log_{10}FC$  = fator de correção do inóculo para mL. Como o inóculo corresponde a 100  $\mu$ L, que é a décima parte de 1 mL,  $FC = 1$  ( $\log_{10} = 1$ ).

O título dos estoques virais produzidos foi obtido pela média de três ensaios independentes.

### 3.11.2. Cinética de replicação viral em células Vero

Os vírus recombinantes, assim como os controles YF 17D/E200T3 e YF 17DD tiveram suas cinéticas de replicação determinadas em monocamada de células Vero em garrafas T-25  $\text{cm}^2$  com 62.500 células/ $\text{cm}^2$ . As garrafas tiveram seu meio retirado, foram infectadas com cada um dos vírus em um MOI (do Inglês, *Multiplicity of Infection*) de 0,02 e incubadas por 1 h para adsorção viral em estufa de  $\text{CO}_2$ . Essa MOI é considerada baixa e visa garantir que os vírus observados após a infecção provenham, em sua grande maioria, de progênie das células infectadas.

Após esse período, foram acrescentados 11 mL de meio Earle 199 completo com 5% de  $\text{NaHCO}_3$  e as garrafas foram novamente incubadas em estufa de  $\text{CO}_2$  a 37° C. Alíquotas foram coletadas em intervalos de 24 horas até o tempo de 144 horas pós-infecção (p.i.) e estocadas a -70° C. Cada alíquota foi titulada em duplicata, como descrito na seção anterior. Foram feitos três experimentos independentes para cada vírus. A partir dos títulos obtidos em cada tempo p.i. foi possível montar uma curva com a cinética de replicação dos vírus. A análise estatística entre as curvas foi realizada pelo teste ANOVA *one way*, pós-teste Tukey, utilizando-se do programa GraphPadPrism 5.03 (GraphPad, Inc.).

As diferenças somente foram consideradas significativas quando o valor de *P* foi menor do que 0,05.

### **3.11.3. Reações de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)**

Amostras de RNA virais, oriundas de cada um dos três vírus recombinantes foram extraídas de culturas celulares infectadas e submetidas a reações de RT-PCR utilizando a enzima M-MLV RT (Promega) na geração de cDNA, e a reações de PCR utilizando Taq DNA Polimerase (Promega) ou a enzima GoTaq (Promega).

Na reação de geração de cDNA, 2 - 3 µL de RNA foi pré-incubado com 20 pmol do oligonucleotídeo RG 184 (-), RG 65 (-) ou RG 19 (-), os quais anelam nos genes NS3, E e NS1, respectivamente, por 90° C por 2 min. Posteriormente, foi adicionado ao mesmo tubo tampão 1X fornecido pelo fabricante, dNTP (0,8 mM cada), MgCl<sub>2</sub> (1 mM), 40 U da enzima *Recombinant RNAsin Ribonuclease Inhibitor* e 200 U da enzima M-MLV RT, em um volume final de 20 µL e submetido a 1 ciclo de 42° C por 60 min e 99° C por 5 min. Para a etapa de PCR, foram adicionados 7,5 µL de cDNA a MgCl<sub>2</sub> (1 mM), 20 pmol de oligonucleotídeo RG 48 (+), RG 36 (+) ou RG 174 (+), os quais anelam nos genes NS2B, prM e E, respectivamente, além de 1,25 U de enzima Taq DNA Polimerase (Promega), nas condições fornecidas pelo fabricante, em um volume final de 50 µL. As reações foram submetidas a uma desnaturação inicial a 94° C por 2 min e 25 ciclos a 94° C por 15 seg, 55° C por 30 seg e 72° C por 1 min, seguida de uma extensão final a 72° C por 5 min.

Para as reações de PCR utilizando GoTaq (Promega), foram adicionados ao volume de 7,5 µL da reação da primeira fase tampão GoTaq 1X, MgCl<sub>2</sub> (2 mM), 20 pmol de oligonucleotídeo de senso positivo acima descrito e 2,5 U da enzima GoTaq (Promega), em um volume final de 50 µL. As amostras foram submetidas a uma reação de ciclagem conforme descrita acima. A Tabela 3.4 lista os iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR.

Os produtos de RT-PCR foram submetidos e avaliados por corrida de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Tabela 3.4 – Iniciadores usados nas reações de RT-PCR

<b>Iniciadores</b>	<b>Sentido</b>	<b>Seqüência (5` - 3`)</b>	<b>Região FA (nt)</b>
<b>RG 48</b>	+	GTATCCCAGTGAATGAGGC	4.181 - 4.200 (NS2B)
<b>RG 184</b>	-	GCGATCAACTGGACCT	4.884 – 4.900 (NS3)
<b>RG 36</b>	+	CCTACTGGTCTTGGCTGTTGG	940 – 960 (prM)
<b>RG 65</b>	-	TGTAAAGGTTGTTGTC	1.781 – 1.799 (E)
<b>RG 174</b>	+	CGGGGTGTGGAGAGAGATGCA	1.639 – 1.659 (E)
<b>RG 19</b>	-	GGGAGTCAACTGAATTTAGGC	2.619 – 2.639 (NS1)

#### **3.11.4. Estabilidade genética do vírus recombinante**

Os vírus recombinantes foram analisados quanto a sua estabilidade genética por meio de passagens seriadas e em duplicata em monocamada de células Vero a partir do estoque 2P até 8P (vírus YF17D/NS2B3/Tc e YF17D/E200/Tc) ou 5P (vírus YF17D/ENS1/Tc). Garrafas T-25 cm<sup>2</sup> com 62.500 células/cm<sup>2</sup> foram preparadas com 24 h de antecedência e infectadas com o vírus (MOI 0,02; como descrito anteriormente para a cinética de replicação).

Em seguida, as garrafas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37° C até o aparecimento de CPE, determinada, neste caso, como sendo em 72 h p.i. Duas alíquotas foram coletadas de cada garrafa e estocadas a – 70° C. Uma das alíquotas foi utilizada para titulação do vírus, a fim de manter a MOI sempre próxima de 0,02 e a outra alíquota foi utilizada para infectar a passagem seguinte. Caso o valor de MOI se distanciasse de 0,02, esta era recalculada para uma MOI de 0,02 na infecção da passagem seguinte.

Nas passagens 5P e 8P, alíquotas foram utilizadas para extração de RNA seguida de RT-PCR e seqüenciamento nucleotídico para verificar a integridade da inserção nas regiões do vírus recombinante. Os oligonucleotídeos utilizados aqui foram os mesmos dos descritos para as passagens 1P e 2P (Tabelas 3.1 e 3.4).

### 3.11.5. Expressão de epítipo heterólogo através de imunofluorescência

A técnica de microscopia de fluorescência indireta foi utilizada para a avaliação da expressão do epítipo de *T. cruzi*, TEWETGQI, pelos vírus recombinantes. Monocamada de células Vero foram cultivadas em câmaras de oito cavidades (Lab-Tek Chamber Slides – Nunc) na densidade de 20.000 células / cavidade em meio completo Earle 199 com 5% de NaHCO<sub>3</sub>. Após 24 horas, o meio foi retirado e as células incubadas com suspensões de 100 µL dos vírus recombinantes a uma MOI de 0,1 por 1 hora em estufa com atmosfera de CO<sub>2</sub> 5% a 37° C. Como controle, foram utilizadas células infectadas com o vírus YF17D/E200T3. Após o período de incubação, foram adicionados a cada cavidade das câmaras 200 µL de meio completo Earle 199 com 5% de NaHCO<sub>3</sub> e estas foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C por 72 h. Após este período, a monocamada foi fixada com paraformaldeído 4% em tampão fosfato (0,1M, pH 7,2) por 10 minutos. As células foram lavadas com PBS (pH 7,4) e posteriormente, permeabilizadas com PBS contendo 0,5% Triton X-100 por 10 min. Em seguida, foi adicionada uma solução de bloqueio de PBS contendo 1% de BSA, por 30 min à temperatura ambiente. Foram utilizados como anticorpos primários anti-YF 17D policlonal oriundo de fluido ascítico hiperimune de camundongo (ATCC) e anti-TEWETGQI policlonal de camundongo diluídos a 1:400 e 1:50, respectivamente.

Anti-TEWETGQI foi obtido a partir da imunização de BALB/c com proteína recombinante de fusão contendo TEWETGQI fusionado a *Glutathione S-Transferase*. Os camundongos foram imunizados com 25 µg da proteína recombinante emulsificada em Adjuvante Completo de Freund e subsequentemente foram dadas duas doses de reforço com a mesma quantidade de proteína emulsificada em Adjuvante Incompleto de Freund, conforme descrito por Claser e equipe (2007).

Após uma incubação de 1 h à temperatura ambiente, e subsequentes lavagens com solução de bloqueio, foi adicionado à monocamada 200 µL de anticorpo secundário Alexa Fluor 546 anti-IgG de camundongo (Invitrogen) ou Alexa Fluor 488 anti-IgG de camundongo (Invitrogen), ambos diluídos a 1:400 de acordo com as instruções do fabricante. Após uma nova incubação de 1 h à temperatura ambiente, e subsequentes lavagens com solução de bloqueio, as preparações foram tratadas com reagente *SlowFade-Gold antifade* contendo 4,3-Diamidino-2-Fenilindol (DAPI, Invitrogen) para detecção do DNA e analisadas por microscópio de fluorescência invertido Olympus IX51.

### **3.11.6. Grau de atenuação dos vírus recombinantes (neurovirulência) em camundongos Suíços**

Grupos de 10 camundongos Suíço, fêmeas, com 3 semanas de idade foram inoculados via intracerebral (i.c.) com 30 µL de meio de Earle 199 (sem antibiótico ou antifúngico) contendo 1.000 PFU dos vírus recombinantes YF17D/NS2B3/Tc, YF17D/E200/Tc ou YF 17DD. O grupo controle (Mock) foi inoculado com somente meio 199/Earle. As amostras virais foram tituladas imediatamente após o procedimento de inoculação. Os animais inoculados foram monitorados por 21 dias e os sintomas, paralisia ou morte anotados. Os principais sintomas observados foram perda da tonicidade muscular e pêlo eriçado. Os animais moribundos, ou seja, com paralisia dos 4 membros, foram mortos por exposição à atmosfera de CO<sub>2</sub> ou injeção letal utilizando-se de 0,5 mL de Tiopental sódico 5% (20 ml/g) via intraperitoneal. Tanto a mortalidade cumulativa quanto as curvas de sobrevivência (método de Kaplan-Meier) obtidas foram comparadas entre os diferentes grupos de imunização e testadas pelo teste de *Log-Rank* em programa GraphPad Prism v. 5.03.

### **3.12. Avaliação inicial da permissividade das linhagens C3H/HeJ e A/J à infecção por *Trypanosoma cruzi***

#### **3.12.1. Desafio e parasitemia**

Grupos de 5 camundongos fêmeas, de 4 a 6 semanas de idade, das linhagens C3H/HeJ e A/J (H-2K<sup>k</sup>) receberam um inóculo, via intraperitoneal, contendo 100 ou 250 parasitas/mL de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y). Ensaios de sobrevivência e determinação de parasitemia foram realizados separadamente.

Para determinação da sobrevivência, os animais desafiados foram monitorados quanto aos sintomas e a morte foi anotada diariamente até o 20º dia pós-infecção (dpi), sendo que o peso de cada animal foi aferido do 6º até o 18º dpi.

A curva de parasitemia foi determinada pelo acompanhamento diário dos animais utilizando-se o método de Pizzi-Brener (Brener, 1962), onde 5 µl de sangue foram recolhidos da cauda de cada animal, colocados entre lâmina e lamínula (18 x18 mm) e o número de parasitas quantificado em 50 campos no microscópio ótico Zeiss utilizando-se objetiva de 40X. O número aproximado de parasitas por mL foi calculado pela seguinte razão:



$$n^{\circ} \text{ parasitas em } 5\mu\text{L} = \frac{n^{\circ} \text{ parasitas em } 50 \text{ campos}}{\text{área de } 50 \text{ campos}} \times \text{área total da lamínula}$$

Sendo:

i. Área total da lamínula =  $18 \times 18 \text{ mm} = 324 \text{ mm}^2$

ii. Área de 50 campos =  $50 \pi R^2$

Onde:  $\pi = 3,14$

$R = \text{raio do campo da objetiva de } 40X = 0,25 \text{ mm}$

Logo a área de 50 campos =  $50 \times 3,14 \times (0,25)^2 = 9,81 \text{ mm}^2$

iii. Assim:

$$n^{\circ} \text{ parasitas em } 5\mu\text{L} = \frac{n^{\circ} \text{ parasitas em } 50 \text{ campos}}{9,81 \text{ mm}^2} \times 324 \text{ mm}^2$$

$$n^{\circ} \text{ parasitas em } 5\mu\text{L} = n^{\circ} \text{ parasitas em } 50 \text{ campos} \times 33,02$$

iv. Logo,

$$n^{\circ} \text{ parasitas/mL} = n^{\circ} \text{ parasitas em } 50 \text{ campos} \times 33,02 \times 200$$

$$n^{\circ} \text{ parasitas/mL} = n^{\circ} \text{ parasitas em } 50 \text{ campos} \times 0,66 \times 10^4$$

### **3.13. Estudos de imunogenicidade em camundongos A/J para o Vírus da Febre Amarela YF 17DD**

#### **3.13.1. Susceptibilidade dos camundongos A/J ao vírus YF 17DD (desafio)**

Grupos de 6 camundongos A/J, fêmeas, de 4 semanas de idade foram inoculados, via subcutânea, com meio Earle 199 completo (sem antibiótico) contendo 100.000 PFU de vírus vacinal YF 17DD, vírus recombinante YF17D/NS2B3/Tc ou somente veículo (meio). Os animais receberam dois inóculos, um no dia zero e o segundo, no dia quinze. Duas semanas após a segunda dose, os animais foram sangrados (pelo plexo retro-orbital) e desafiados via intracerebral com meio contendo 3.000 PFU de YF 17DD. Os animais foram monitorados por 21 dias e as mortes foram anotadas diariamente. Os animais moribundos e com paralisia foram eutanasiados, conforme descrito na seção 3.11.6.

As amostras de soro obtidas destes animais foram analisadas pelo teste de PRNT (a ser descrito em seguida) para verificação da indução de anticorpos neutralizantes para o

vírus YF 17DD e soroconversão. Como controle, também foi retirado sangue de dois animais representativos para cada grupo experimental, antes do primeiro inóculo (soro pré-imune).

### 3.13.2. Ensaios de neutralização viral

Testes de neutralização viral por redução de formação de placas de lise (PRNT, *Plaque Reduction Neutralization Test*) foram executados em células Vero, em placas de 96 poços, como descrito por Stefano *et al.*, 1999.

Os soros dos animais, retirados por punção retro-orbital ou cardíaca, foram misturados ou não em cada grupo, inativados por 30 min a 56° C e diluídos nas placas de 96 poços serialmente em 1:10 em meio de Earle 199 contendo HEPES 1M. O vírus YF 17DD foi diluído em uma suspensão viral contendo meio Earle 199 completo a 5% de SFB, em seguida 50 µL desta suspensão viral foi plaqueada na presença dos soros diluídos e foram incubados por 1 h à temperatura ambiente. Após este intervalo de tempo, foram adicionados 50 µL da suspensão de células Vero, com densidade de  $1,0 \times 10^5$  células / mL. As células foram incubadas por 4h a 37° C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e, após esse tempo, o meio foi removido e adicionado 100 µL de CMC 3% em cada poço. As placas foram incubadas por 7 dias em estufa a 37° C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e então, fixadas com formaldeído 10% e coradas com corante Cristal Violeta a 0,02% para visualização e contagem das placas de lise.

O soro anti-FA (L13), um soro policlonal hiperimune de macaco Rhesus foi utilizado como soro controle. Os títulos de anticorpos neutralizantes foram calculados tomando-se como base a maior diluição de anticorpo (soro) capaz de reduzir 50% de placas de lise virais oriundas da suspensão viral diluída inicial. A porcentagem de soroconversão foi determinada com base nos níveis basais obtidos pelo grupo controle Mock (não soroconvertido). O teste estatístico *One-way* ANOVA foi usado para comparar a média dos títulos obtidos para os grupos experimentais e o teste de Tukey foi utilizado como um pós-teste para comparar os pares de grupos. A análise foi realizada pelo programa estatístico GraphPad Prism v. 5.03.

### **3.14. Avaliação de resposta imune específica para *Trypanosoma cruzi* após vacinação de camundongos A/J**

#### **3.14.1. Ensaios de avaliação da resposta imune protetora em animais experimentais**

A Figura 3.8 mostra o esquema de imunização em uma escala de tempo (dias) adotado para os ensaios experimentais de avaliação da resposta imune protetora em camundongos A/J.

Grupos de 5 camundongos A/J (fêmeas entre 4 a 6 semanas) foram utilizados para ensaios de proteção com os vírus recombinantes YF 17D ou formulações destes (Tabela 3.5). Após quarentena de uma semana em biotério, os camundongos receberam duas doses subcutâneas de  $10^5$  PFU de vírus vacinal YF 17DD, vírus recombinantes YF 17D, peptídeo TEWETGQI emulsificado em adjuvante de Freund (200 µg / kg do animal) ou meio de Earle 199 completo, sem antibiótico (Mock), com intervalo de 15 dias. As amostras virais foram tituladas imediatamente após o procedimento de inoculação.

As sangrias (pelo plexo retro-orbital) foram realizadas antes das imunizações (pré-imune, antes do dia zero) e duas semanas após cada dose (dias 14 e 28), com a finalidade de monitorarmos os títulos de anticorpos neutralizantes para YF 17DD (ensaios de PRNT, seção 3.13.2).

O desafio foi realizado, após 30 dias do término da imunização, pela infecção intraperitoneal com 250 tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Y, dos diferentes grupos de animais analisados. Os animais desafiados foram monitorados quanto aos sintomas clínicos (febre, apatia, pêlo eriçado e perda de apetite) a morte foi anotada diariamente, até o 60° dpi. As curvas de sobrevivência (Kaplan-Meyer) foram comparadas entre os grupos experimentais e testadas pelo teste de *Log-Rank*, utilizando-se do GraphPad Prism v. 5.03.

Ensaios de determinação de parasitemia foram realizados separadamente dos ensaios de sobrevivência e estes foram realizados até o 18° dpi, pelo método descrito na seção 3.12.1. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram verificadas pela análise de variância *One-way ANOVA* e pós-teste de Tukey.

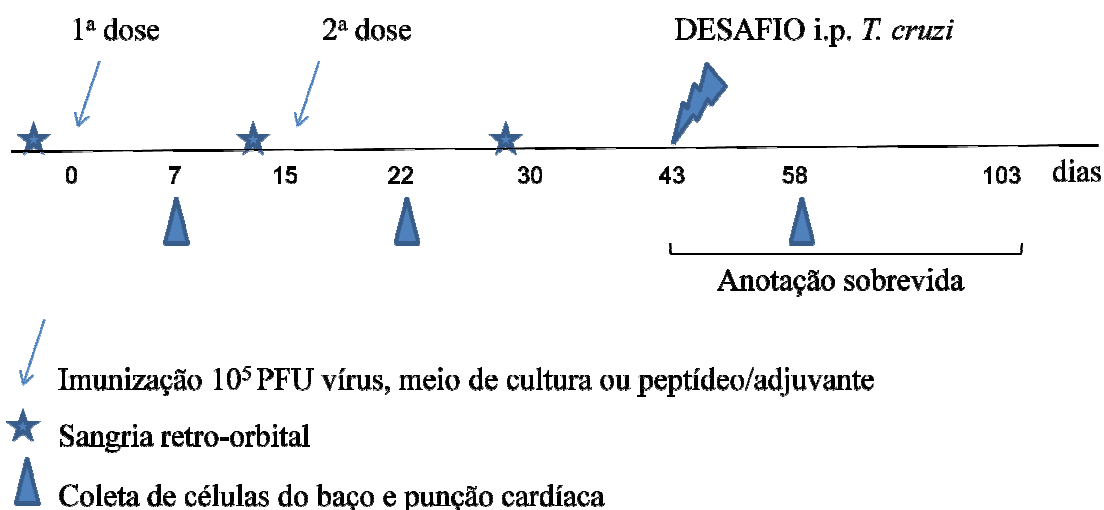


Figura 3.8. Esquema da cinética adotada para os ensaios experimentais realizados em camundongos A/J. As setas indicam as imunizações com vírus vacinal YF 17DD, vírus YF17D recombinantes, peptídeo TEWETGQI emulsificado em adjuvante de Freund ou somente meio (Mock). A forma (raio) indica o desafio intraperitoneal (i.p.) com *T. cruzi*. Estrelas indicam a retirada de sangue retro-orbital de camundongos no dia zero (pré-imune), dia 14 e 28. O triângulo indica os pontos de coleta de baço para determinação de células produtoras de IFN- $\gamma$  (ELISPOT). A sobrevivência dos camundongos infectados com *T. cruzi* foi anotada diariamente por até 60 d.p.i. (dia 103).

Tabela 3.5 – Formulações de vírus recombinantes YF 17D utilizadas nos ensaios de proteção

Vírus	Estratégia clonagem	Inserção	Dose (PFU/mL)	Dose (PFU/mL)	Dose (PFU/mL)
			Form. 1	Formul. 2	Form. 3
YF17D/E200/Tc	Envelope	TEWETGQI	-	-	50.000
YF 17D/NS2B3/Tc	NS2B / NS3	TEWETGQI	50.000	25.000	50.000
YF 17D/ENS1/Tc	E / NS1	ASP-2 <sub>261-380</sub> + TEWETGQI	50.000	75.000	-

### **3.14.2. Reatividade de anticorpos a formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi***

Células Vero foram infectadas por  $10^6$  tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, em uma relação parasita/célula hospedeira de 10:1. Após incubação de 24 horas, os parasitas que não infectaram a monocamada foram removidos por lavagens sucessivas com PBS e após, foi realizada uma nova incubação de 72 horas para o desenvolvimento intracelular de formas amastigotas. Após esse período, a monocamada de células foi fixada por 20 min a 4°C com paraformaldeído 4% em PBS e posteriormente, processada para imunofluorescência indireta. Após a fixação, a monocamada foi lavada três vezes por 10 min em PBS, seguido de lavagens com PBS contendo 0.5% de Triton X-100 (Sigma), favorecendo a permeabilização da membrana plasmática e permitindo uma boa penetração do anticorpo. Em seguida, a monocamada foi incubada em PBS contendo 4% de BSA por 15 min para bloqueio de sítios inespecíficos.

Posteriormente, as células foram incubadas a 4 °C por 12 a 18 h com os soros obtidos de camundongos A/J imunizados com peptídeo TEWETGQI (emulsificado em adjuvante de Freund) ou com o vírus recombinante YF17D/ENS1/Tc. Os soros foram utilizados em uma diluição de 1:25. Após lavagens com PBS/BSA 2- 4%, as células foram incubadas por 1 h a 37° C em câmara úmida com anticorpo secundário apropriado (anti-IgG de camundongo conjugado a FITC (Sigma Chemical Co.) diluído em 1:200. Em seguida, as células foram lavadas três vezes por 10 min em PBS/BSA 2% e coradas por 5 min à temperatura ambiente com 0,2 µg/mL de DAPI para detecção do DNA e montadas em PBS contendo 2,5% de 1,4-diazabicyclo-(2,2,2)-octano (DABCO) e 50% de glicerol, pH 7,2. As amostras foram observadas ao microscópio Zeiss Axioplan equipado com epifluorescência e ao microscópio confocal Zeiss com objetiva de 63X.

### **3.14.3. Resposta celular produtora de interferon-gama através de ensaio de ELISPOT**

Para os ensaios de ELISPOT, grupos de 4 ou 5 camundongos A/J foram imunizados, conforme descrição acima (seção 3.14.1). Uma semana após a primeira imunização e/ou após a segunda imunização, e duas semanas após o desafio (Figura 3.8), os camundongos foram sacrificados e o baço de cada animal foi retirado assepticamente.

Todos os ensaios foram realizados utilizando o *kit* IFN- $\gamma$  ELISPOT *set* (BD – Biosciences Pharmingen, San Diego-CA) e recomendações do fabricante. As placas foram

recobertas com 10 µg/mL de anti-IFN-γ purificado (fornecido pelo *kit*) e após incubação por 14 – 16 h, as placas foram bloqueadas com meio RPMI (Invitrogen) acrescido de SFB 1% por pelo menos 2 hs em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Após maceração asséptica do baço, esplenócitos foram recuperados e tratados com solução hemolisante para lise das hemácias por 5 min em estufa de CO<sub>2</sub>. Após neutralização da ação de lise com a adição de meio RPMI / SFB 1%, os leucócitos foram ressuspensos para uma concentração de 2 X 10<sup>6</sup> células viáveis por mL em meio RPMI / SFB 10% suplementado (completo). Após o plaqueamento de 2 X 10<sup>5</sup> células por poço, as células foram incubadas por 48 h a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub> com somente meio de cultura, 10 µg/mL de peptídeo sintético TEWETGQI (Invitrogen), 10.000 PFU de vírus YF17DD inativado (a 56 °C por 1 hora) ou 4 µg de concanavalina A (Sigma), diluídos em meio RPMI / SFB 10% suplementado.

Após incubação, a placa foi lavada exaustivamente e incubada com anticorpo de detecção anti-IFN-γ biotilado (fornecido pelo *kit*) por 12 -16 h, seguido de incubação com estreptavidina marcada com peroxidase (diluída a 1:800) por 3 h. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS-Tween 0,05% e a reação foi revelada pela adição do substrato AEC (BD) com cromógeno (20µl/mL) e adição de 1µl/mL de peróxido de hidrogênio 30% (Sigma). A reação foi finalizada com a lavagem da placa com água corrente. Células produtoras de IFN-γ, que apareceram como pontos (*spots*) vermelhos em cada poço foram contadas com o auxílio do leitor automatizado *Immunospot* (AMBRIEX, Cellular Technology Ltd., Cleveland, OH), usando o programa de versão 3 da Plataforma de ELISPOT do PDTIS /Fiocruz – Rio de Janeiro (Lima-Junior *et al.*, 2008).

As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram verificadas pela análise de variância *One-way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

#### **3.14.4. Proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>**

Esplenócitos foram recuperados de grupos de três camundongos A/J vacinados ou não e estas células foram submetidas ao mesmo preparo descrito acima (seção 3.14.3). Os leucócitos oriundos de cada grupo experimental foram agrupados em *pool* e ressuspensos para uma concentração total de 60 X 10<sup>6</sup> células viáveis por mL em meio RPMI / SFB 10% suplementado. Após centrifugação a 1700 rpm por 6 min a 4° C, o sobrenadante celular foi retirado com auxílio de pipeta e o sedimento celular (*pellet*) foi ressuspendido em solução de PBS pré-aquecido a 37° C contendo CFSE (*carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester*, Molecular Probes) na concentração final de 1,25 µM. Esta solução foi incubada a 37 °C por

10 minutos (agitando a cada 2 minutos para se ter uma marcação homogênea) e posteriormente, foi centrifugada a 1700 rpm por 6 min. O sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta e o agregado celular foi lavado com meio RPMI contendo 10% de SFB (gelado) e ressuspendido neste mesmo meio para uma concentração de  $2 \times 10^6$  células por mL. Estas suspensões foram distribuídas em placas de poliestireno de fundo chato, em um volume de 100µL por poço e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C com meio (RPMI suplementado), peptídeo TEWETGQI (10 µg/mL) ou vírus YF 17DD inativado (10.000 PFU) por 5 dias ou com 4 µg de concanavalina A (ConA) por 2 dias, diluídos em meio RPMI / SFB 10% suplementado.

Após este período de incubação, as células foram transferidas para uma placa de fundo redondo, centrifugadas a 1700 rpm por 4 min a 4 ° C, posteriormente lavadas com PBS acrescido de 2% SFB e submetidas a uma nova centrifugação. Após o descarte do sobrenadante, adicionamos 50 µL dos anticorpos monoclonais anti-CD4 conjugado a R-Ficoeritrina (R-PE) e anti-CD8-PE-Cy5, já diluídos para 1:100, conforme orientações do fabricante (Invitrogen). Incubamos por 30 minutos a 4<sup>0</sup>C no escuro e após esse período, fixamos as células com 150 µL de paraformaldeído a 1% à temperatura ambiente. Transferimos as células fixadas para os tubos de polipropileno para FACS devidamente numerados e já contendo 150 µL de PBS 1X. Procedemos imediatamente com a leitura em citômetro de fluxo ou armazenamos a 4° C, no escuro, por no máximo 7 dias. Foram adquiridos 10.000 eventos, aproximadamente, de cada amostra no citômetro de fluxo FACS Calibur (BenctonDickinson, California, EUA) ou Accuri (Accuri Cytometers Ltda, UK) e os dados foram analisados utilizando o programa FlowJo (v.7.6.1). A marcação com CFSE foi detectada pela emissão de fluorescência, aproximadamente, no comprimento de onda 517 nm (verde), a marcação com R-PE foi detectada pela emissão de fluorescência no comprimento de onda 575 nm (laranja) e a marcação com PE-Cy5 foi detectada pela emissão no comprimento de onda 670 nm (vermelho).

A determinação das porcentagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ativados e proliferativos foi realizada da seguinte forma: selecionamos inicialmente um *gating* de linfócitos pelo tamanho (FSC- eixo X) e granulosidade (SSC – eixo Y) e a partir deste, selecionamos populações de células CD4<sup>+</sup> (eixo X) ou CD8<sup>+</sup> (eixo Y) através de dois novos *gatings*. A partir destes *gatings*, foi marcada a porcentagem das células CFSE<sub>low</sub> proliferativas CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup>.

#### 4. RESULTADOS

Neste trabalho, avaliou-se a capacidade do Vírus da Febre Amarela 17D de expressar antígenos do parasito *Trypanosoma cruzi* e de induzir resposta imune específica. Inicialmente, três vírus YF17D recombinantes foram obtidos, através da tecnologia do clone infeccioso (Rice *et al.*, 1989). Escolhemos expressar o peptídeo TEWETGQI por ter sido descrito como um indutor de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , tendo sido associado à indução de proteção induzida pela ASP-2, proteína de superfície de amastigota 2 de *T. cruzi*. Este peptídeo mapeia na posição 320-327 de ASP-2. Sequências codificadoras deste epítipo foram clonadas em duas regiões do genoma do vírus da febre amarela: (1) no gene E, na região correspondente à alça entre as fitas beta *f* e *g* da proteína E (domínio II) do Vírus da Febre Amarela (vírus YF 17D/E200/Tc), e (2) na região intergênica NS2B/NS3, onde a inserção heteróloga foi flanqueada por sequências codantes de motivos de clivagem pela protease viral NS2B/NS3 (vírus YF 17D/NS2B3/Tc). Vírus viáveis, com base nestas abordagens foram descritos anteriormente (Bonaldo *et al.*, 2002, 2005; McAllister *et al.*, 2000; Tao *et al.*, 2005). Estes resultados estão descritos na Parte I de resultados desta tese.

Utilizando uma terceira metodologia de clonagem (que permite a inserção de fragmentos maiores), decidimos inserir um trecho imunogênico de 120 aminoácidos de ASP-2 (posição 261-380) entre as proteínas E e NS1, originando o terceiro vírus (vírus YF 17D/ENS1/Tc). Esta abordagem foi estabelecida anteriormente (Bonaldo *et al.*, 2007). Posteriormente, utilizamos a formulação de dois dos vírus recombinantes desenvolvidos neste trabalho (YF17D/ENS1/Tc e YF17D/NS2B3/Tc) em ensaios de imunização, para avaliar a resposta imunológica de camundongos suscetíveis a uma dose letal de *Trypanosoma cruzi*. Estes resultados estão descritos na Parte II de resultados desta tese.

O esquema mostrado na Figura 4.1 apresenta as três regiões do genoma do Vírus da Febre Amarela que foram alvo das construções descritas neste trabalho.



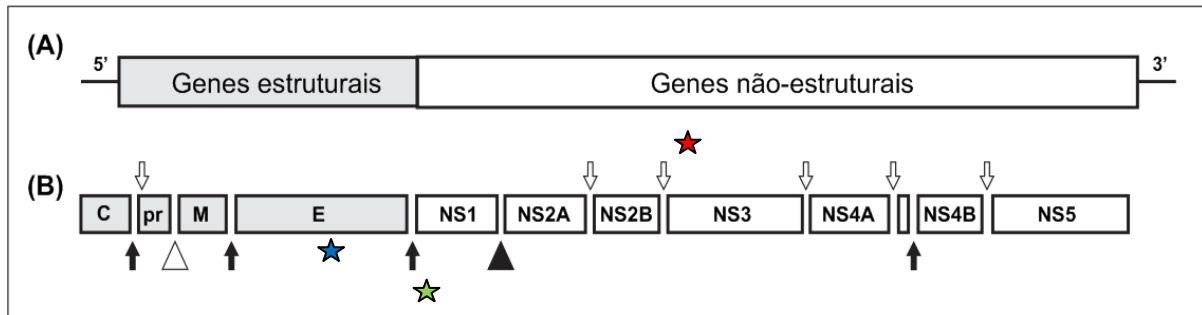


Figura 4.1 – Desenho esquemático do genoma do vírus YF17D e os sítios correspondentes às regiões de inserção dos antígenos da proteína ASP-2 de *T. cruzi*. O genoma do vírus da Febre Amarela (A) é traduzido em uma poliproteína precursora de 3.411 aminoácidos (B), a qual sofre um processamento proteolítico por proteases virais e do hospedeiro. Setas brancas indicam sítios de clivagem da protease viral NS2B/NS3, para geração de proteínas virais no lado citoplasmático da célula. Setas escuras indicam sítios de clivagem pela peptidase sinal (signalase) do hospedeiro. Outros motivos de processamento proteolítico da poliproteína viral são indicados pelo triângulo em aberto, que indica sítio de clivagem pela furina, e pelo triângulo escuro, que indica sítio de clivagem por protease desconhecida do hospedeiro. Epítipo TEWETGQI foi inserido em duas posições distintas: (★) no Domínio II da proteína de Envelope (E), originando o vírus YF17D/E200/Tc e (★) na região intergênica da protease viral NS2B/NS3, originando o vírus YF17D/NS2B3/Tc. Por ultimo, ASP-2<sub>261-380</sub> (*T. cruzi*) foi inserido entre as proteínas E e NS1 (★), originando o vírus YF17D/ENS1/Tc

## PARTE I - Obtenção e caracterização dos vírus YF 17D/E200/Tc e YF 17D/NS2B3/Tc

### 4.1. Obtenção dos vírus YF17D recombinantes para o epítopo TEWETGQI da proteína ASP-2 de *Trypanosoma cruzi*: vírus YF 17D/E200/Tc e YF 17D/NS2B3/Tc

#### 4.1.1. Construção do plasmídeo recombinante pE200/Tc

A construção deste vírus baseou-se na metodologia de inserção na região codante da alça *fg* da proteína E (Domínio II ou de dimerização) do vírus da febre amarela, descrita previamente por Bonaldo e equipe (2002, 2005). A clonagem neste sítio foi possível devido aos estudos que elucidaram a estrutura tridimensional da proteína de Envelope (E), conforme foi previamente descrito para o vírus TBEV, DENV2 e JEV (Rey *et al.*, 1995; Modis *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003). O epítopo TEWETGQI é de caráter hidrofílico e apresenta um índice de hidropaticidade (GRAVY ou *Grand average of hidropathicity index*) de -1,087, conforme calculado pelo programa ProtParam, disponível no site <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>. Esta análise preliminar indicou que o epítopo, devido ao seu caráter hidrofílico, poderia ser clonado e expresso na superfície da proteína E do vírus da febre amarela.

Para a inserção e expressão do epítopo TEWETGQI pelo vírus FA foi utilizado o sistema de dois plasmídeos do clone infeccioso, a partir do qual se obteve um molde de cDNA genômico viral que foi então submetido à transcrição *in vitro* para obtenção de RNA viral para ser utilizado na transfecção celular para geração de partículas virais infectivas. Este sistema tem por base dois plasmídeos: pYFE200 e pT3, derivados dos plasmídeos pYF5`3`IV e pYFM5.2, respectivamente, cujo cDNA viral foi obtido de um clone da sub-cepa YF17D 204 (Rice *et al.*, 1989). Neste trabalho, foi utilizado um derivado do plasmídeo pYFE200 (Bonaldo *et al.*, 2002), que além de possuir mutações no nucleotídeo 1.568 do genoma viral, que permitiram a criação do sítio *EcoRV* (GAT/ATC) para inserção de seqüências na região codante para a alça *fg* da proteína E, conforme descrito por Bonaldo *et al.*, 2002 (Figura 4.2A), possui um motivo de *N*-glicosilação na posição 154 da proteína E. A clonagem molecular da seqüência codante do epítopo TEWETQGI (posição de aminoácidos de 320 a 327) da proteína ASP-2 no pYFE200 foi feita pelo uso de um par de oligonucleotídeos sintéticos complementares, com freqüência de códons otimizada para a do vírus da febre amarela, que após pareamento e clonagem no sítio de restrição *EcoRV* de pYFE200

glicosilado, resultou em um plasmídeo recombinante denominado de pYFE200/Tc (Figura 4.2B).

A)

	<i>Fita f</i>	<i>Alça f g</i>	<i>Fita g</i>
YF 17D	NSYIAE	ME-----TES	WIV
YF 17D/E200/Tc	NSYIAE	MD---TEWETGQI---IES	WIV

B)

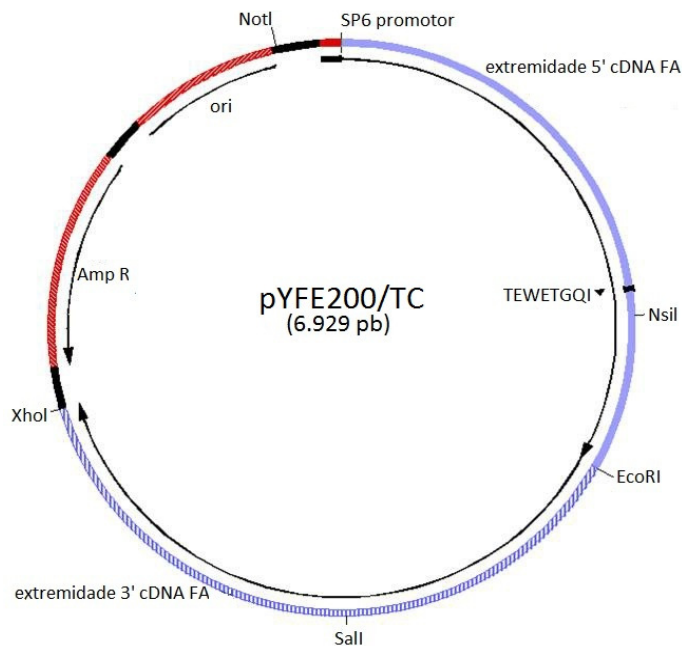


Figura 4.2 – Construção do plasmídeo pYFE200/Tc. (A) Alinhamento da região-alvo de expressão na proteína E nos vírus YF17D e no vírus recombinante YF17D/E200/Tc expressando epítipo TEWETGQI de ASP-2. As fitas  $\beta f$  e  $g$  são mostradas. Os resíduos de aminoácidos DI (presentes na seqüência do vírus recombinante YF17D/E200/Tc) representam mutações ocorridas na alça  $fg$  decorrentes da introdução do sítio de clonagem *EcoRV* no genoma viral. B) Mapa físico do plasmídeo pYFE200-Tc contendo a inserção correspondente ao epítipo TEWETGQI. Em azul sólido, extremidade 5' e em azul rachurado, extremidade 3' do cDNA de YF com marcação para os sítios de restrição das enzimas *NsiI* e *SallI*, respectivamente. Em vermelho rachurado, a origem de replicação do plasmídeo (*ori*) e região codificante para resistência a Ampicilina (*Amp<sup>R</sup>*). Em vermelho sólido, seqüência do promotor SP6 polimerase. Marcação de região de restrição para *NotI* (posição 6.682 nt). Imagem gerada em *Gene Construction Kit v. 2.5*.

Como parte dos procedimentos de pré-seleção dos plasmídeos recombinantes, realizamos uma digestão com as enzimas *EcoRV* e *NotI*. Como a clonagem dos oligonucleotídeos no sítio *EcoRV* promove sua extinção, e este sítio não está presente na inserção, identificamos os clones plasmidiais recombinantes pela digestão única com *NotI*, e que apresentaram uma banda única de tamanho de cerca de 7 kb, quando analisada por eletroforese em gel de agarose. Os clones plasmidiais não recombinantes apresentavam duas bandas, uma de tamanho correspondente ao fragmento de 1.815 pb e outra correspondente ao fragmento de 5.114 pb (Figura 4.3).

Cerca de 80% dos clones analisados pela dupla-digestão, apresentaram-se linearizados, sendo assim inicialmente considerados positivos para o inserto. Estes foram submetidos ao seqüenciamento nucleotídico da região genômica contendo a seqüência do sítio de inserção, correspondente à alça entre as fitas *f* e *g* da proteína E com o objetivo de se confirmar a integridade e a orientação do inserto. Verificamos que apenas um dos dez clones seqüenciados apresentou a seqüência em leitura de fase correta. Esta clonagem por não ser unidirecional, de fato permite a clonagem de inserto em fase de leitura invertida. O plasmídeo selecionado foi utilizado para a confecção do molde de cDNA viral.

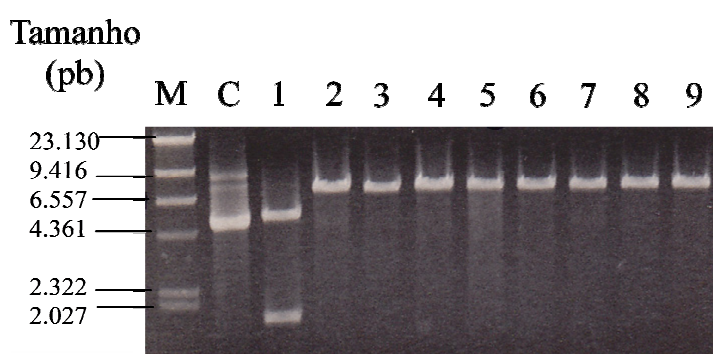


Figura 4.3 – Perfis de plasmídeos pYFE200 recombinantes submetidos à digestão por *EcoRV* e *NotI* em análise por eletroforese em gel de agarose. C- pYFE200 nativo (controle), 1- pYFE200 digerido não clonado e de 2 a 9 – colônias recombinantes de pYFE200. M- Marcador molecular *lambda/HindIII*.

#### 4.1.2. Construção do plasmídeo recombinante pT3NS2B3/Tc

A segunda estratégia foi a expressão do mesmo epítipo (TEWETGQI), franqueado pelo sítio de reconhecimento da protease viral NS2B/NS3, na região intergênica entre as proteínas não-estruturais NS2B e NS3 do genoma viral. Esta abordagem já foi descrita na literatura, para a clonagem e expressão de epítipos indutores de células T CD8<sup>+</sup>

em diferentes modelos vacinais, tendo sido eficiente na geração de vírus FA recombinantes viáveis (McAllister *et al.*, 2000; Tao *et al.*, 2005; Barba-Spaeth *et al.*, 2005).

Primeiramente, o plasmídeo pT3 (Figura 4.4A), contendo a porção central do genoma de FA, foi modificado para incluir uma seqüência adicional codificadora de seis aminoácidos (SPGARRS) entre os genes codantes das proteínas NS2B e NS3. Esta inserção, além de levar à duplicação do motivo de clivagem pela protease viral NS2B/NS3, contém um sítio para *SmaI* (CCC/GGG), que possibilita a clonagem direta de insertos heterólogos através de qualquer par de oligonucleotídeos pareados que possuam extremidades cegas. O plasmídeo modificado foi denominado pT3/*SmaI* (Figura 4.4B). Após a inserção da seqüência codificadora do epítipo TEWETGQI de *T. cruzi* em sítio *SmaI*, no plasmídeo pT3/*SmaI*, foram selecionadas colônias de *E. coli* transformadas, que foram submetidas à extração de DNA plasmidial. Os plasmídeos recombinantes foram então, denominados de pT3NS2B3/Tc (Figura 4.4C e 4.5).

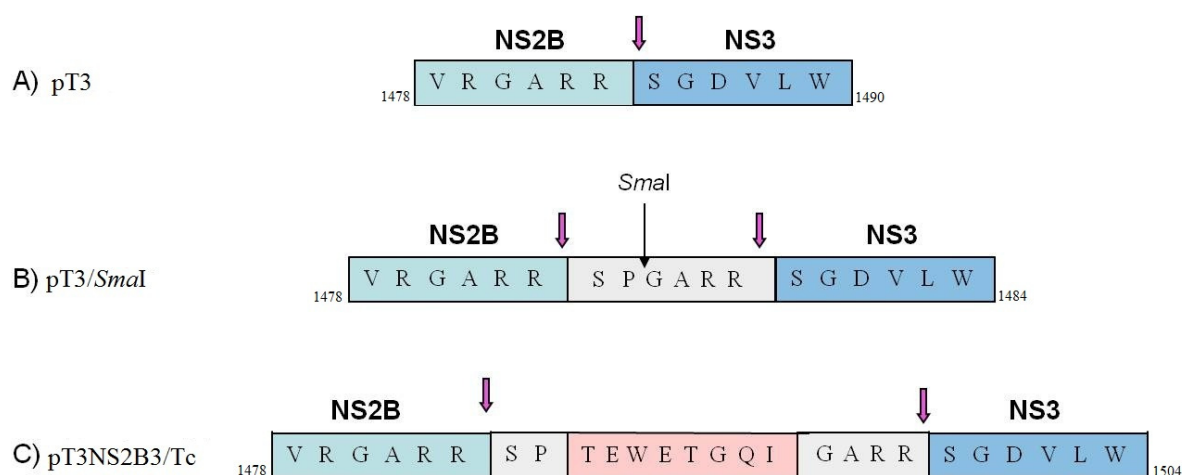


Figura 4.4 – Esquema representando as diferentes regiões intergênicas NS2B/NS3 codificadas pelos plasmídeos pT3, pT3/*SmaI* e pT3NS2B3/Tc, que correspondem a: (A) seqüência de aminoácidos do C-terminal de NS2B e N-terminal NS3 no genoma de YF 17D original, (B) seqüência duplicada de reconhecimento da protease viral (GARRS), na qual é indicada a posição que corresponde a inserção no genoma viral pelo sítio *SmaI* e (C) epítipo TEWETGQI inserido na seqüência GARRS de modo a ser flanqueado pelos dois motivos de clivagem da protease viral, para o seu correto processamento, assim como das proteínas virais NS2B e NS3.

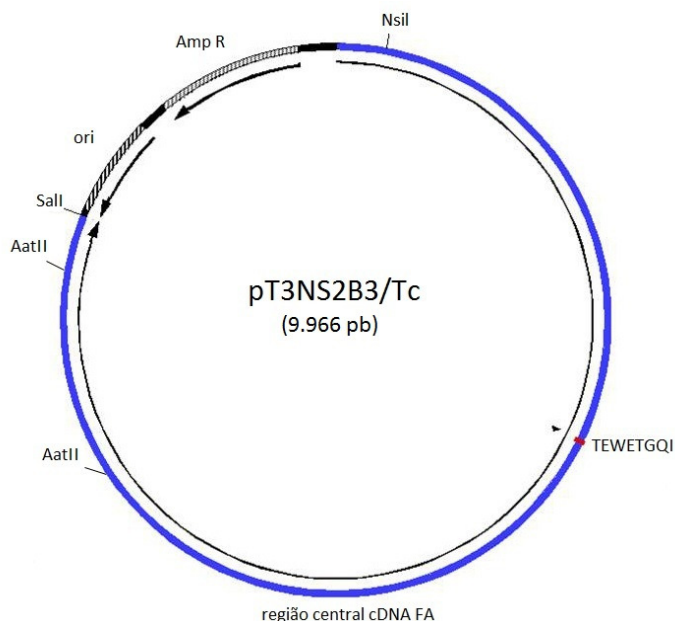


Figura 4.5 – Mapa físico do plasmídeo pT3NS2B3/Tc contendo inserto TEWETGQI (posição 3.213 nt) de *T. cruzi*. As regiões em azul correspondem à região central do genoma de FA, na qual estão sinalizados os sítios de restrição da enzima *AatII* (posições 9.897 e 7.085 nt). Em cinza rachurado, são mostrados a origem de replicação do plasmídeo (*ori*) e o gene de resistência a Ampicilina (*AmpR*). Imagem gerada em Gene Construction Kit v. 2.5.

Os plasmídeos recombinantes foram submetidos a uma clivagem com *Sma I* e *AatII*, e analisados por eletroforese em gel de agarose, o que possibilitou a identificação de seis clones plasmidiais recombinantes pela presença de bandas de 7.169 pb e 2.812 pb decorrentes da clivagem de *AatII* nas posições 7.085 e 9.897. A presença de um padrão de bandas 2.812, 3.297 e 3.872 pb indicou um plasmídeo não recombinante devido à presença do sítio *SmaI* na posição 3.213 nucleotídica (Figura 4.6). O seqüenciamento desta região revelou que duas das seis colônias analisadas possuíam o inserto na orientação correta. O plasmídeo selecionado foi utilizado para a confecção do molde de cDNA viral.

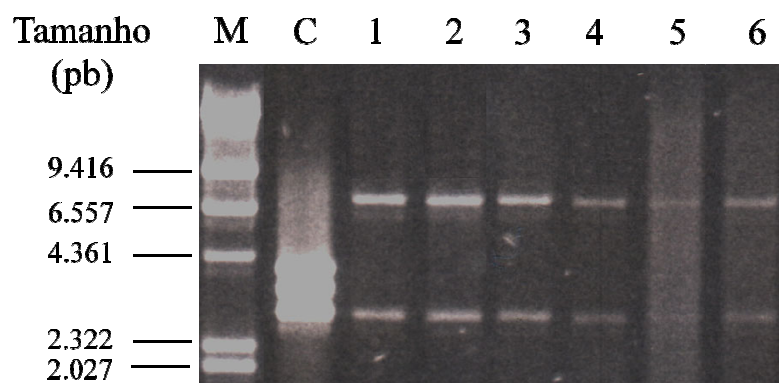


Figura 4.6 – Perfil de pT3NS2B3/Tc submetido à dupla-digestão por *Sma* I e *Aat* II, em análise por eletroforese em gel de agarose. C: plasmídeo pT3/*Sma*I não-recombinante; 1 – 6: plasmídeos recombinantes para TEWETGQI. M- Marcador molecular lambda/*Hind*III.

#### 4.1.3. Obtenção dos vírus recombinantes YF 17D

Os plasmídeos criados neste trabalho foram utilizados na geração de molde de cDNA viral para a síntese de RNA viral (Figura 4.7). Duas misturas contendo os plasmídeos pYFE200/Tc e pT3 parental ou pT3NS2B3/Tc e pYFE200 parental foram submetidas à digestão por *Nsi*I e *Sal*I (Figura 4.7A). Os produtos de digestão dos plasmídeos pE200T3/Tc e pT3NS2B3E200/Tc foram ligados pela enzima T4 DNA Ligase (Figura 4.7B) e posteriormente, linearizados com a enzima de restrição *Xho* I (Figura 4.7C). Dessa forma, os moldes de cDNA foram montados e a partir destes, as amostras de RNA viral foram obtidas através da reação de transcrição *in vitro* (Figura 4.7D). Devido à presença de estruturas secundárias e terciárias de RNA e ao fato do gel não ser desnaturante, a migração do RNA não foi utilizada para aferir o peso molecular do RNA transcrito, porém, podemos observar que as bandas correspondentes ao RNA infectivo migram entre 2 e 3 kb (Figura 4.7D). Outras bandas correspondem a RNAs com estruturas secundárias e terciárias ou a subprodutos de transcrição de moldes de cDNA viral incompletos.

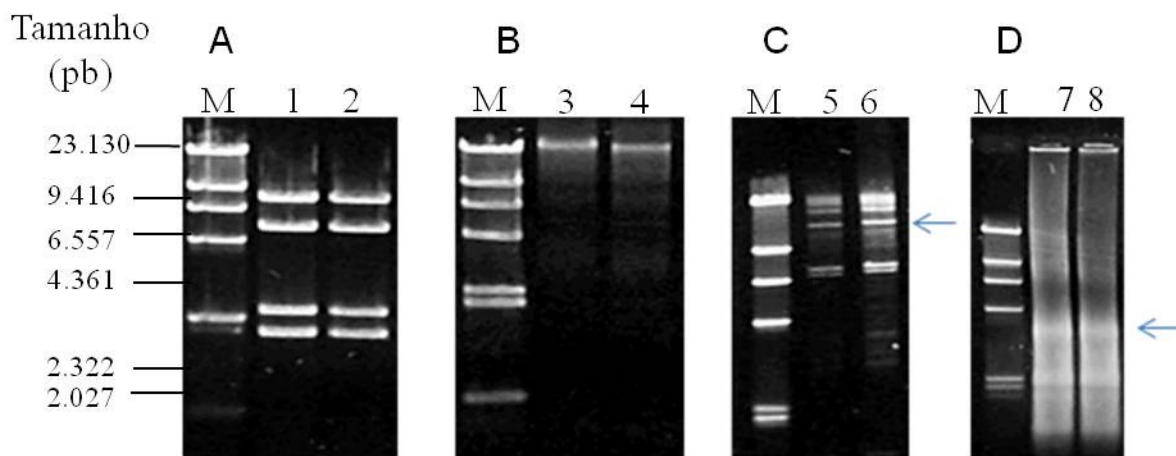


Figura 4.7 - Construção do molde de cDNA viral. A) Digestão por *NsiI* e *SalI* de plasmídeos recombinantes: 1 – pYFE200/Tc e pT3 parental; 2 – pT3NS2B3/Tc e pYFE200 parental. B) Ligação dos fragmentos utilizando T4 DNA Ligase: 3 – pYFE200T3/Tc; 4 - pT3NS2B3E200/Tc. C) Linearização das ligações plasmidiais com *XhoI*: 5 - pYFE200T3/Tc; 6 - pT3NS2B3E200/Tc. A seta indica fragmento de cerca de 16 kb, correspondente ao cDNA genômico viral. D) Preparação de RNA viral obtida através de transcrição *in vitro* dos seguintes moldes de cDNA: 7 - do vírus YF 17D/E200/Tc; 8 – do vírus YF 17D/NS2B3/Tc. Seta indica marcação de migração do RNA infectivo (entre 2 e 3 kb). M: lambda/*HindIII*.

Após a transfecção das preparações de RNAs dos vírus recombinantes de YF17D em células Vero, pudemos observar o aparecimento de efeito citopático (CPE) entre 72 h e 96 h de incubação. O vírus que contém o inserto de *T. cruzi* no Envelope do Vírus da Febre Amarela foi denominado YF17D/E200/Tc e o que contém o referido inserto na região intergênica NS2B/NS3 foi denominado YF17D/NS2B3/Tc.

## 4.2. Caracterização biológica dos vírus recombinantes YF 17D/E200/Tc e YF 17D/NS2B3/Tc

### 4.2.1. Produção de estoques virais e titulação

Os vírus recombinantes YF17D/NS2B3/Tc e YF17D/E200/Tc continham as inserções íntegras nas suas respectivas regiões genômicas, conforme pôde ser comprovado por seqüenciamento nucleotídico dos fragmentos de 720 pb e 859 pb obtidos por RT-PCR, respectivamente. Pôde-se então preparar estoques virais de segunda passagem celular (2P) que também continham inserções íntegras. As alíquotas dos estoques 2P foram usadas para



todos os subseqüentes estudos deste experimento. Os títulos virais obtidos nestas preparações são mostrados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Títulos dos vírus YF 17D recombinantes para o epítipo TEWETGQI de *T.cruzi*

Vírus	Título		Insero	Localização (nt)
	PFU / mL	log <sub>10</sub> PFU/mL		
<b>YF17D/NS2B3/Tc</b>	5,49 x 10 <sup>6</sup>	6,74	TEWETGQI	4.574 (NS2B/NS3)
<b>YF17D/E200/Tc</b>	6,26 x 10 <sup>6</sup>	6,80	TEWETGQI	1.568 (alça fg - E)

#### 4.2.2. Determinação da proliferação viral em células Vero e do fenótipo de placas de lise celular

Os vírus recombinantes YF 17D/NS2B3/Tc e YF 17D/E200/Tc foram analisados pelas suas propriedades de crescimento em células Vero em comparação com os vírus controles, o vírus vacinal da Febre Amarela 17DD e o vírus parental 17D/E200T3 (Bonaldo *et al.*, 2002). Três experimentos independentes foram realizados empregando uma MOI de 0,02. Na Figura 4.8A é mostrada a curva de replicação obtida pelos vírus de FA. O pico de crescimento para todos os vírus foi em 72 h após a infecção celular com a produção máxima para o vírus YF 17DD ( $6,79 \pm 0,34 \log_{10}$  PFU / mL). Os picos de crescimentos obtidos pelo vírus controle parental 17D/E200T3 ( $6,42 \pm 0,14 \log_{10}$  PFU / mL) ou pelos recombinantes YF17D/E200/Tc ( $6,38 \pm 0,12 \log_{10}$  PFU / mL) e YF17D/NS2B3/Tc ( $6,68 \pm 0,12 \log_{10}$  PFU / mL) foram próximos ao determinado para o vírus vacinal (Tabela 4.2; em negrito). Assim, as diferenças entre eles não foram estatisticamente significativas (teste *One-way* -ANOVA, P = 0,88). No entanto, o crescimento de YF17D/E200/Tc em 48h pós-infecção foi menor quando comparado aos outros vírus.

A Figura 4.8B mostra a redução do tamanho de placa de ambos os vírus recombinantes em comparação com YF 17DD. Trabalhos anteriores mostraram que YF 17D/E200T3 gerou um tamanho de placa intermediário, mais reduzido do que YF 17DD porém, maior do que as placas geradas pelos recombinantes (dados não mostrados).

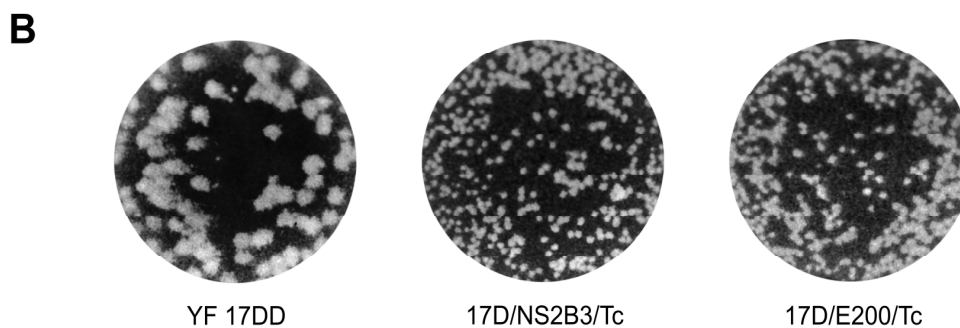
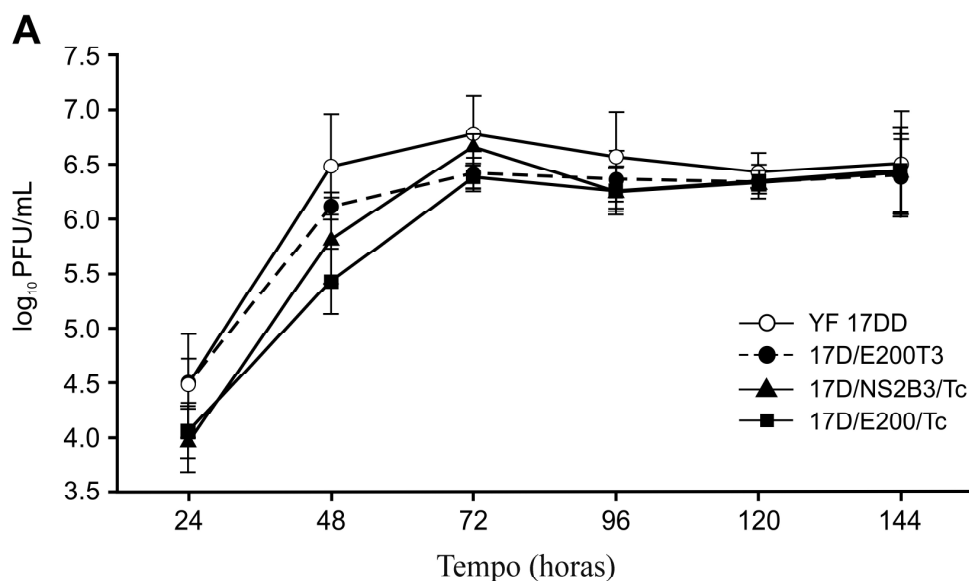


Figura 4.8 – Caracterização dos vírus YF 17D recombinantes. A) Curva de replicação dos vírus recombinantes e parentais em células Vero: YF 17D/NS2B3/Tc (triângulos) e YF 17D/E200/Tc (quadrados), parentais YF 17D/E200T3 (círculos em linha descontinua) e YF 17DD (círculos brancos, linha cheia). Cada ponto representa o título médio e o desvio-padrão, obtidos de três experimentos independentes. B) Morfologia de placas virais, em células Vero.

**Tabela 4.2** - Valores médios com desvio-padrão ( $\log_{10}$  PFU/mL) de títulos virais nos tempos coletados. Os títulos máximos obtidos em relação a cada vírus YF 17D são destacados em negrito.

Vírus	24h	48h	72h	96h	120h	144h
<b>YF17DD</b>	4,49±0,46	6,48±0,48	<b>6,79±0,34</b>	6,57±0,41	6,44±0,16	6,51±0,48
<b>YF17D/E200T3</b>	4,50±0,23	6,12±0,07	<b>6,42±0,14</b>	6,36±0,26	6,34±0,15	6,39±0,34
<b>YF17D/E200/Tc</b>	4,06±0,26	5,43±0,30	<b>6,38±0,12</b>	6,27±0,20	6,35±0,09	6,41±0,37
<b>YF17D/NS2B3/Tc</b>	3,98±0,30	5,83±0,42	<b>6,68±0,12</b>	6,26±0,22	6,33±0,09	6,43±0,41

### 4.2.3. Estabilidade genética da inserção heteróloga

Para avaliar a estabilidade da inserção heteróloga, expressa pelos dois vírus recombinantes YF17D, realizamos duas séries independentes de passagens seriadas dos vírus em células Vero infectando as células com um MOI de 0,02. A cada passagem seriada, realizamos titulações a partir do sobrenadante celular de cada duplicata (P1 e P2) a fim de se verificar e calcular a MOI, a qual foi mantida em valores até 0,02 por todo o experimento (Tabelas 4.3 e 4.4). Não observamos diferenças entre os títulos obtidos.

**Tabela 4.3** – Título em  $\log_{10}$  PFU/mL e MOI do vírus YF17D/NS2B3/Tc da terceira até a oitava passagem em células Vero

Passagem P1	Título ( $\log_{10}$ PFU/mL)	MOI	Passagem P2	Título ( $\log_{10}$ PFU/mL)	MOI
3P1	6,51	0,01	3P2	6,60	0,01
4P1	6,34	0,008	4P2	6,59	0,01
5P1	6,50	0,02	5P2	6,54	0,01
6P1	6,45	0,02	6P2	6,41	0,01
7P1	6,85	0,05	7P2	6,36	0,01
8P1	6,50	0,02	8P2	6,55	0,01

**Tabela 4.4** – Título em  $\log_{10}$  PFU/mL e MOI do vírus YF17D/E200/Tc da terceira até a oitava passagem em células Vero

Passagem P1	Título ( $\log_{10}$ PFU/mL)	MOI	Passagem P2	Título ( $\log_{10}$ PFU/mL)	MOI
3P1	6,70	0,01	3P2	6,41	0,008
4P1	6,58	0,01	4P2	6,73	0,01
5P1	6,43	0,01	5P2	6,50	0,01
6P1	6,58	0,02	6P2	6,89	0,07
7P1	6,45	0,02	7P2	6,60	0,02
8P1	6,50	0,02	8P2	6,55	0,01

Reações de RT-PCR foram feitas com o sobrenadante celular da 2<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> passagens seriadas em células Vero, utilizando-se dos mesmos oligonucleotídeos empregados para a análise da integridade da inserção no estoque viral (2P). Os vírus recombinantes YF17D/NS2B3/Tc e YF17D/E200/Tc geraram fragmentos de 720 pb e 859 pb, respectivamente, conforme esperado, e estes foram submetidos ao seqüenciamento nucleotídico para verificação da integridade da inserção heteróloga. Foi visto que a seqüência que codifica para TEWETGQI pôde ser detectada em todas as passagens, tanto na região intergênica NS2B / NS3 quanto na proteína E, indicando que ambos os vírus são geneticamente estáveis, pelo menos, até a 8<sup>a</sup> passagem.

#### **4.2.4. Expressão do epítipo TEWETGQI pelos recombinantes**

Para confirmarmos a expressão do epítipo de *T. cruzi* (TEWETGQI) pelos vírus recombinantes YF17D/E200/Tc e YF17D/NS2B3/Tc, realizamos um teste de imunofluorescência indireta utilizando como fonte de anticorpos primários um soro policlonal hiperimune direcionado a YF 17D (HIYF) ou um soro policlonal de camundongo anti-TEWETGQI. Como pode ser observado na Figura 4.9, o soro hiperimune anti-FA pôde detectar antígenos do Vírus da Febre Amarela em todas as condições de células Vero infectadas, enquanto que o anticorpo anti-TEWETGQI só foi capaz de marcar células Vero as quais foram infectadas, quer pelo YF17D/E200/Tc YF ou pelo vírus YF17D/NS2B3/Tc. Estes resultados demonstram que ambos os vírus recombinantes são capazes de expressar o epítipo TEWETGQI. As imagens sugerem que o vírus YF17D/NS2B3/Tc pode expressar o peptídeo heterólogo de forma pontual e dispersa pelo citoplasma da célula, quando comparado ao YF17D/E200/Tc, cuja marcação parece estar mais proximamente localizada à região perinuclear.

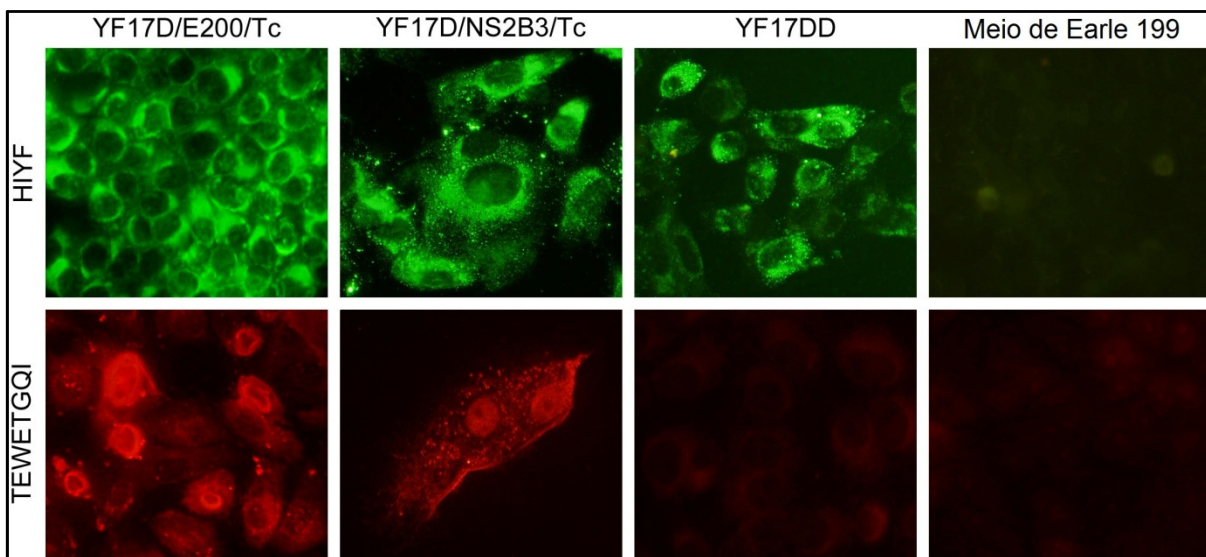


Figura 4.9 - Expressão do epítipo TEWETGQI da proteína ASP-2 de *T. cruzi* em células infectadas com os vírus YF17D/E200/Tc e YF17D/NS2B3/Tc. Imunofluorescência indireta de células Vero infectadas com os vírus recombinantes, vírus vacinal YF 17DD ou não infectados (Meio Earle 199) e marcadas com um soro policlonal hiperimune para YF 17D (HIYF) ou anticorpo policlonal dirigido para o epítipo TEWETGQI. Anticorpos secundários utilizados foram Alexa Fluor 488 anti-IgG e Alexa Fluor 546 anti-IgG para HIYF (cor verde) ou anti-TEWETGQI (cor vermelha), respectivamente.

#### 4.2.5. Grau de atenuação dos vírus em camundongos Suíços (neurovirulência)

É sabido que o vírus YF 17D apresenta um grau considerável de neurovirulência em camundongos (Monath, 1999). Ainda que o teste de neurovirulência em camundongos não seja preditivo da atenuação ou virulência do Vírus da Febre Amarela para o homem, este teste é adotado para avaliar o grau de atenuação do vírus recombinante em comparação com a vacina YF 17DD.

Esta característica fenotípica para os vírus YF17D/E200/Tc e YF17D/NS2B3/Tc foi verificada pela inoculação intracerebral de camundongos. Após 21 dias de acompanhamento diário, pôde-se estabelecer a taxa de mortalidade e tempo médio de sobrevivência (AST do inglês *Average survival time*) dos animais inoculados, conforme pode ser visto na Tabela 4.5 e Figura 4.10. Os vírus recombinantes foram significativamente menos letais do que o vírus vacinal YF 17DD, que matou 29 dos 30 animais com um tempo médio de sobrevivência (AST) de  $10 \pm 2$  dias, em contraste com 8 de 30 mortos, por YF17D/NS2B3/Tc e 1 de 30, por YF17D/E200/Tc, que apresentaram valores de AST de  $12 \pm 4$  dias e de  $13 \pm 0$  dias, respectivamente. As diferenças nas taxas de mortalidade entre os grupos após 21 dias

foram estatisticamente significativas (teste de *Log-Rank*,  $P < 0,0001$ ), conforme visto na Figura 4.10. Os animais inoculados com YF17D/E200/Tc experimentaram uma mortalidade significativamente menor em comparação com os inoculados com YF17D/NS2B3/Tc (teste de *Log-Rank*,  $P < 0,0001$ ). Estes resultados indicam que os vírus recombinantes apresentam um maior grau de atenuação, em contrapartida da vacina YF 17DD.

Tabela 4.5. Neurovirulência dos vírus YF 17D em camundongos Suíços

Inóculo	Dose ( $\log_{10}$ PFU)	% mortalidade (morto/testado)	Tempo Médio de Sobrevida $\pm$ SD (dias)
Controle (Mock)	-	0 (0/30)	-
YF 17DD (vacinal)	1,0	97 (29/30)	10 $\pm$ 2
YF17D/NS2B3/Tc	1,0	27 (8/30)*	12 $\pm$ 4
YF17D/E200/Tc	1,0	3 (1/30)*	13 $\pm$ 0

<sup>b</sup> O grupo controle foi inoculado via intra-cerebral com apenas Meio Earle 199.

\*  $P < 0,05$ , teste *Log-Rank* (Mantel-Cox)

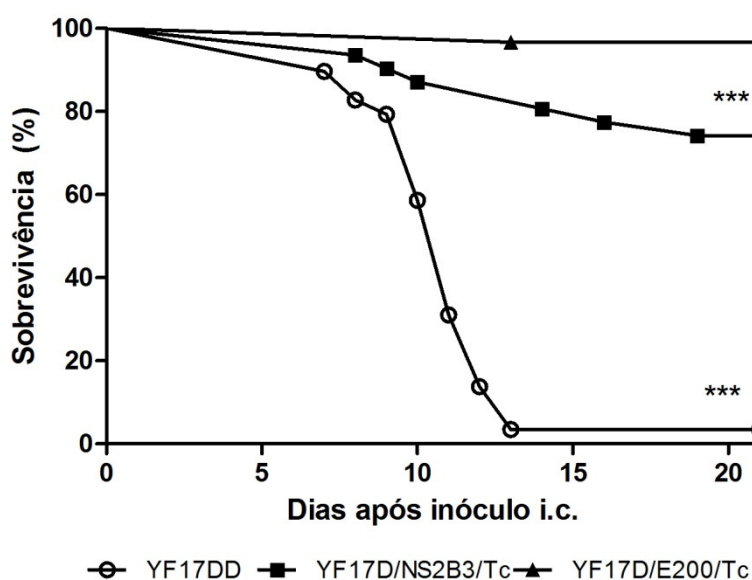


Figura 4.10 – Curva de sobrevivência de camundongos Suíços inoculados pela via intra-cerebral com 1.000 PFU de cada vírus. O acompanhamento de sobrevivência foi feito até 21 dias após inóculo. \*\*\*  $P < 0,0001$ , teste *Log-Rank* (Mantel-Cox). A diferença estatística entre os dois vírus recombinantes foi de  $P = 0,01$ .

### 4.3. Estabelecimento do modelo experimental murino de haplótipo H2-K<sup>k</sup> de MHC classe I para avaliação da imunogenicidade dos vírus YF 17D recombinantes para *T. cruzi*

Sabemos que a resposta imunológica celular está restrita ao repertório genético do complexo de histocompatibilidade (MHC), o qual envolve diferentes alelos, assim como o HLA em humanos. Como em nosso trabalho, o enfoque é dado à indução de resposta celular T CD8<sup>+</sup> gerada pela apresentação do peptídeo TEWETGQI, optamos por utilizar o sistema murino para o qual, TEWETGQI é imunodominante, que foi o de haplótipo H2-K<sup>k</sup> de MHC classe I (Araújo *et al.*, 2005). Este dado também foi confirmado neste trabalho ao realizarmos uma análise computacional pelo programa SYFPEITHI de predição de epítomos do fragmento de 120 resíduos de aminoácidos da proteína ASP-2 (ASP-2<sub>261-380</sub>) que foi clonado e expresso pelo vírus recombinante YF17D/ENS1/Tc, descrito na parte II de resultados. A análise feita utiliza algoritmos que podem predizer epítomos com maior probabilidade de ligação a um determinado alelo de MHC. A tabela 4.6 apresenta a lista dos seis primeiros octâmeros de maior probabilidade de processamento e apresentação via MHC classe I a linfócitos T do haplótipo H2-K<sup>k</sup>, presente na linhagem A/J. O epítopo TEWETGQI teve nesta análise o maior score de probabilidade de ligação.

Tabela 4.6 – Predição de epítomos (octâmeros) no fragmento de 120 aminoácidos de ASP-2 (ASP-2<sub>261-380</sub>) em ligação ao MHC murino H2-K<sup>k</sup>

Colocação*	Octâmeros H2-K <sup>k</sup>	Pontuação (score)**	Posição ASP-2 (aminoácidos)
1	T <b>E</b> W E T G Q <b>I</b>	22	320 - 327
2	T <b>D</b> K G N T W <b>V</b>	19	297 - 304
3	T <b>E</b> A I G T L <b>S</b>	16	350 - 357
4	I <b>F</b> R V G A L <b>I</b>	14	372 - 379
5	V <b>T</b> A G G S G <b>I</b>	13	263 - 270
6	T <b>A</b> G G S G I <b>V</b>	13	264 - 271

\*\*Pontuação baseada na força de ligação de cada seqüência de aminoácidos a um MHC específico, considerando-se o grau de conservação dos motivos de ancoramento.

Fonte: SYFPEITHI Site: <http://www.syfpeithi.de> – Rammensee *et al.*, 1999.

#### 4.3.1. Susceptibilidade das linhagens C3H/HeJ e A/J à infecção por *Trypanosoma cruzi* cepa Y

Nesta etapa do trabalho, estabelecemos o grau de suscetibilidade das linhagens C3H/HeJ e A/J à infecção por formas tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*. Decidimos por comparar porcentagens de sobrevivência após um desafio letal, testando dois inóculos (100 e 250 tripomastigotas sanguíneas) em duas linhagens H2-K<sup>k</sup> (Figura 4.11). A linhagem C3H/HeJ foi uma opção testada pelo fato desta linhagem também apresentar uma alta susceptibilidade à *T. cruzi*. No entanto, verificamos que 100% dos animais da linhagem A/J morrem após 25 dpi, tanto com um inóculo de 100 ou 250 parasitos, ao contrário de C3H/HeJ, que teve uma mortalidade de apenas 75% dos animais com um inóculo de 100 parasitos e uma mortalidade de 100%, porém observada somente após 29 dpi, quando os animais foram inoculados com uma quantidade maior de *T. cruzi*, equivalente a 250 parasitos.

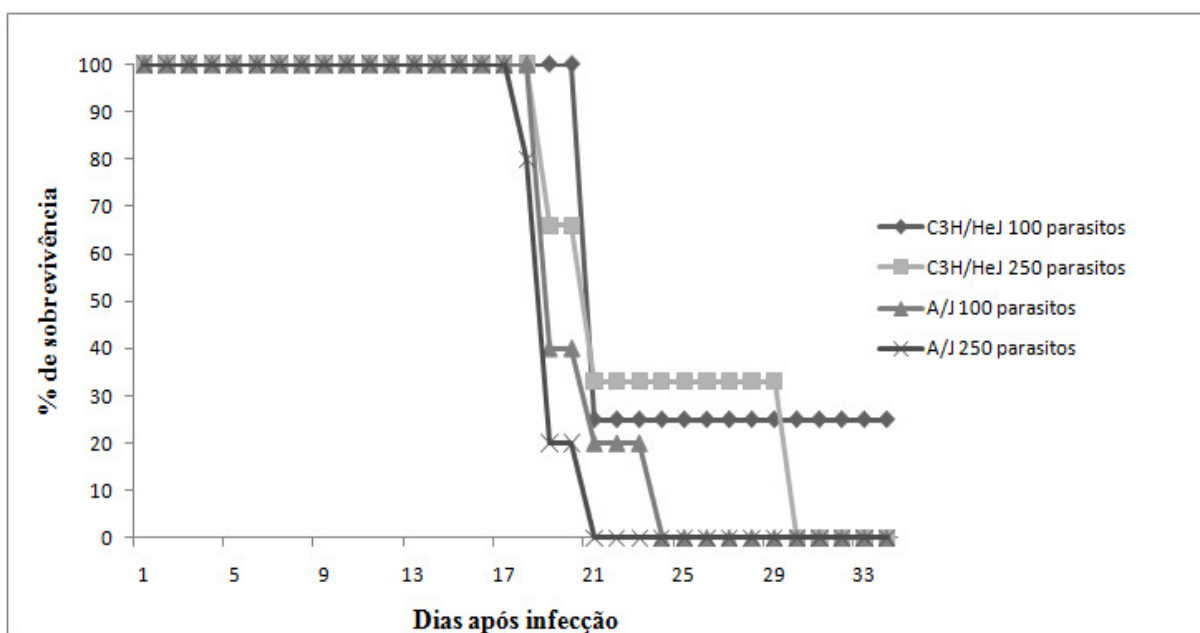


Figura 4.11 – Curva de sobrevivência (%) em camundongos C3H/HeJ e A/J infectados com inóculos de tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). Os animais foram infectados com 100 parasitos ou 250 parasitos e avaliados diariamente por até 35 dpi (dias após infecção).

Decidimos por avaliar em A/J os níveis parasitêmicos obtidos pela infecção de 250 tripomastigotas de *T. cruzi*. As figuras 4.12A e 4.12B mostram que esta linhagem produz um pico médio parasitêmico de  $407 \times 10^4$  parasitos / mL  $\pm$  196 em torno do 10º dia após infecção (dpi), acompanhado de perda de peso (Figura 4.12C). O nível parasitêmico decresce



até o 17º dpi, atingindo  $17 \times 10^4$  parasitos / mL  $\pm 25$ , coincidindo com o início da mortalidade dos camundongos infectados (Figura 4.12D) que prossegue até o 19º ou 20º dpi, em que 100% dos camundongos infectados por *T. cruzi* morrem. Avaliamos também que a mortalidade cumulativa de camundongos submetidos ao ensaio de parasitemia (G1) pouco se alterou em comparação com o grupo de camundongos que não foi submetido ao ensaio de parasitemia (G2) (Figura 4.12D).

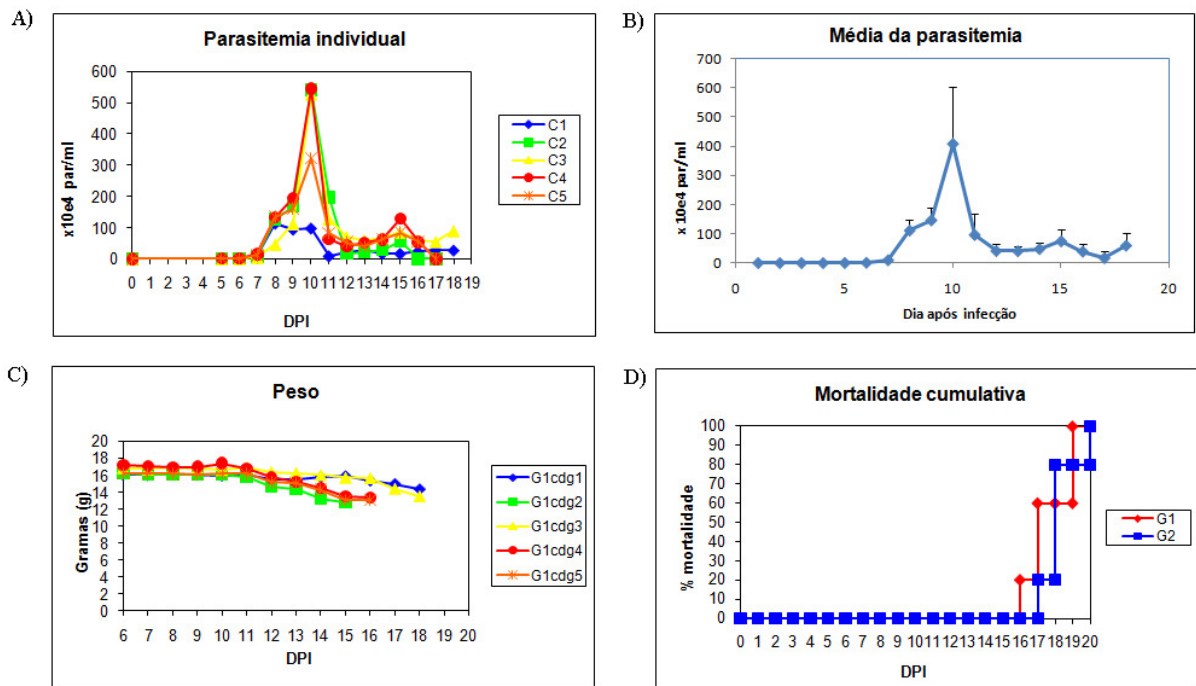


Figura 4.12 – Avaliação da infecção por *T. cruzi* (cepa Y) de camundongos A/J frente a um inóculo intraperitoneal de 250 tripomastigotas. (A) Parasitemia individual de 5 animais, B) Média da parasitemia (n=5), (C) Peso dos animais ao longo da infecção por *T. cruzi*, e (D) Mortalidade cumulativa (%) de grupos de camundongos infectados e avaliados pelo ensaio de parasitemia (G1) ou não (G2).

### 4.3.2. Susceptibilidade dos camundongos A/J ao Vírus YF 17DD

Apesar de sabermos sobre a susceptibilidade da linhagem A/J frente à infecção por *T. cruzi*, não sabíamos se esta linhagem era de fato suscetível à infecção pelo vírus YF 17DD. Para este propósito, os camundongos foram vacinados ou não com duas doses de YF 17DD ou vírus recombinante YF17D/NS2B3/Tc e desafiados, duas semanas após, com um inóculo intracerebral (i.c.) do mesmo vírus. Utilizamos o vírus YF17D/NS2B3/Tc por ter sido o vírus que se mostrou menos atenuado quando inoculado i.c. (ensaio de neurovirulência).

Tanto os camundongos A/J imunizados com YF 17DD quanto com o vírus recombinante YF17D/NS2B3/Tc ficaram completamente protegidos contra o desafio letal i.c. pelo YF 17DD (Figura 4.13, Tabela 4.7). Em contraste, o grupo não-imunizado (Mock), não protegido, morreu entre o 9º e o 13º dias (AST = 11,4) após desafio com YF 17DD.

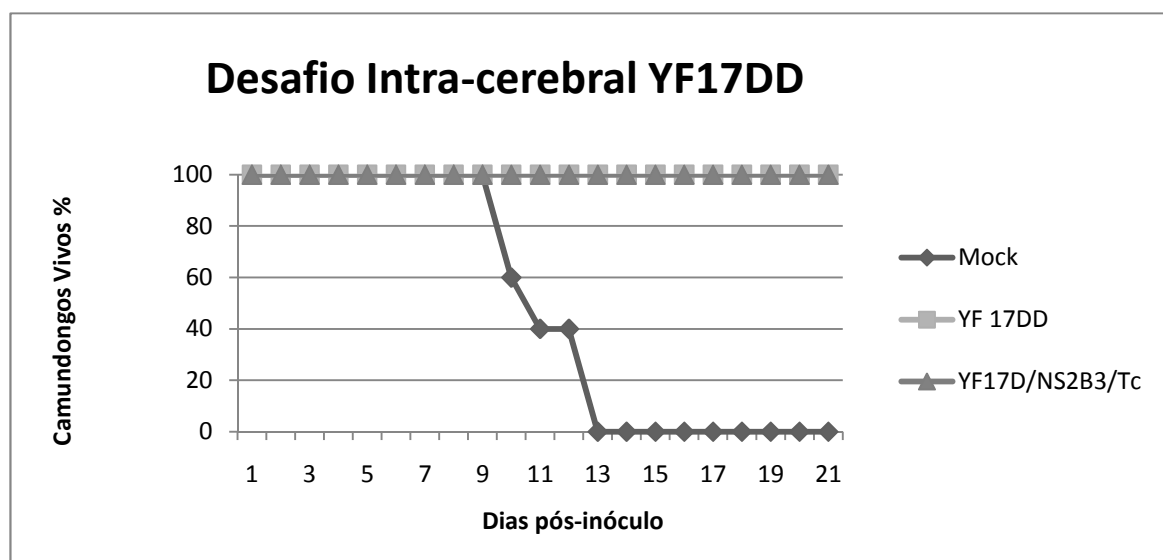


Figura 4.13- Curva de percentagem de sobrevivência de camundongos vacinados A/J frente a um desafio intracerebral com o vírus YF17DD. Camundongos foram imunizados ou não com o vírus vacinal YF17DD ou com o vírus YF17D/NS2B3/Tc. Duas semanas após, os animais foram desafiados com um inóculo i.c. de 5.000 PFU/mL do vírus YF17DD. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

#### 4.3.3. Determinação da indução de anticorpos neutralizantes para o Vírus da Febre Amarela em camundongos A/J

A próxima etapa foi a de examinar se os vírus recombinantes YF17D, contendo o epítipo de *T. cruzi*, seriam capazes de induzir anticorpos neutralizantes ao vírus da FA. A imunização de camundongos A/J com o vírus YF 17DD ou com qualquer um dos vírus recombinantes foi capaz de induzir após dose única anticorpos neutralizantes para o vírus da FA (Tabela 4.7). Após duas doses, observamos que o título de anticorpos aumentou com relação à primeira dose, em animais imunizados com YF 17DD ( $P < 0,05$ , teste de Tukey). Após duas doses, os títulos de anticorpos neutralizantes induzidos pelos vírus recombinantes (1:124 para o vírus YF17D/E200/Tc e 1:274 para o vírus YF17D/NS2B3/Tc) foram inferiores ao obtido pelo vacinal 17DD ( $P < 0,05$ , teste de Tukey), o que pode refletir uma menor capacidade de replicação *in vivo* dos vírus recombinantes.

Tabela 4.7. Indução de anticorpos neutralizantes dirigido ao vírus FA em camundongos A/J

Imunógeno <sup>a</sup>	Animais (n)	PRNT <sub>50</sub> <sup>a</sup>		Proteção após desafio i.c. com YF 17D (%)
		1 dose	2 doses	
YF 17DD	15	358 ± 119	1007 ± 243**	100
YF17D/E200/Tc	15	41 ± 12**	124 ± 67**	NT <sup>b</sup>
YF17D/NS2B3/Tc	15	90 ± 20**	274 ± 240*	100
Meio Earle 199	15	<10	<10	-

<sup>a</sup> Recíproco da diluição em que se encontra 50% de redução de plaques virais devido a anticorpos neutralizantes nos soros analisados. Valores representam a média geométrica de 3 experimentos independentes (soros em “pool”) ± DP. \*\*, \* Títulos significativos estatisticamente ( $P < 0,05$ , teste Tukey).

<sup>b</sup> NT; Não testado

#### 4.4. Avaliação da imunogenicidade viral em camundongos vacinados e/ou desafiados com *T. cruzi*

Tendo mostrado anteriormente que os vírus recombinantes foram capazes de gerar títulos significantes de anticorpos neutralizantes para o vírus FA, o próximo passo foi avaliar se os vírus FA recombinantes expressando o epítopo TEWETGQI poderiam induzir resposta imune celular específica ao vírus FA e para *T. cruzi* através da detecção de células produtoras de IFN- $\gamma$  (interferon-gama) em baço de camundongos vacinados. Os protocolos de imunização foram definidos com base no estudo da literatura para vírus YF17D (Figura 3.8, seção Metodologia).

##### 4.4.1. Determinação do número de células de baço produtoras de IFN- $\gamma$ específicas ao epítopo TEWETGQI e ao Vírus FA

Nós tivemos um empenho inicial em padronizar a técnica de ELISPOT, a qual é atualmente empregada em nosso laboratório para todas as análises com os YF 17D recombinantes gerados. Alguns procedimentos foram incorporados de protocolos de ELISPOT disponíveis na literatura (Power *et al.*, 1999; Boscardin *et al.*, 2003), no entanto, alguns fatores necessitaram de testes de padronização, os quais foram: 1) tempo para a análise de esplenócitos após imunização com os vírus YF 17D recombinantes, 2) concentração de

células responsivas *in vitro* e 3) concentração do peptídeo *T. cruzi* específico e do vírus YF17DD, a serem utilizados como estímulos *in vitro*. Inicialmente, realizamos a coleta de células do baço quatro dias após vacinação, porém verificamos que este tempo poderia ser curto para avaliação já que poucos *spots* específicos foram visualizados pelo ELISPOT. Decidimos por coletar estas células no sétimo dia após a vacinação, conforme outros trabalhos prévios com YF 17D (McAllister *et al.*, 2000; Maciel *et al.*, 2008), tendo sido o tempo de escolha para todas as subseqüentes análises.

Ao testarmos diferentes concentrações de células de baço ( $5 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ) na resposta ao estímulo de ConA, verificamos que a quantidade de  $2 \times 10^5$  de células era suficiente para induzir *spots* específicos e com pouco fundo (*background*). Em relação à concentração de peptídeo específico, ao testarmos as concentrações de 10 µg/mL e 20 µg/mL em  $2 \times 10^5$  de células oriundas de camundongos imunizados com peptídeo emulsificado em Adjuvante de Freund, vimos que a concentração de 10 µg/mL foi suficiente para uma resposta específica. Quanto ao uso do vírus inteiro YF 17DD, inativado, como estímulo *in vitro*, testamos duas concentrações: 10.000 PFU/mL e 1.000 PFU/mL. Visto que ambas as concentrações induziram números de células produtoras de IFN- $\gamma$  similares, optamos por utilizar a concentração de 1.000 PFU/mL. Este tipo de análise (utilizando-se do vírus inativado) deve avaliar a resposta imune celular direcionada à epitopos presentes nas proteínas estruturais do vírus.

De posse desses dados, realizamos o ensaio de ELISPOT a partir de células de baço recuperadas de camundongos imunizados ou não sete dias após a segunda dose (dia 22) e quinze dias após desafio (dia 58). O 15º dia pós-desafio foi escolhido com base na cinética de ativação celular após desafio com *T. cruzi* (Tzelepis *et al.*, 2006).

Verificamos que a imunização com os vírus YF 17DD e YF17D/NS2B3/Tc induziram células produtoras de IFN- $\gamma$  especificamente para o vetor vacinal, em comparação com o grupo Mock ( $P < 0,05$ , teste de Tukey) (Fig.4.14A). No entanto, o vírus YF17D/E200/Tc induziu menos do que  $52 \pm 41$  células produtoras de IFN- $\gamma$ , enquanto que a do vírus YF17D/NS2B3/Tc foi capaz de induzir  $119 \pm 108$  células responsivas, semelhante ao grupo imunizado com YF 17DD ( $136 \pm 88$  células produtoras de IFN- $\gamma$ ). Embora as diferenças entre os grupos imunizados com os vírus YF17D/E200/Tc e YF 17DD não tenham sido estatisticamente significantes, YF17D/E200/Tc parece ser um vírus limítrofe, que apresenta uma resposta específica ao vetor vacinal, porém ainda indistinguível estatisticamente do grupo Mock. Nós observamos que a imunização com o peptídeo TEWETGQI (emulsificado em adjuvante de Freund) não foi capaz de induzir um número de

células produtoras de IFN- $\gamma$  ( $6 \pm 1$ ) responsivas a YF 17DD, sendo que a diferença entre este grupo e os grupos imunizados com o vacinal YF 17DD e YF17D/NS2B3/Tc, que geraram forte resposta celular responsiva ao vírus da FA, foram significativas ( $P < 0,05$ , teste de Tukey).

Quando avaliamos a resposta de células T CD8<sup>+</sup> específicas ao estímulo TEWETGQI, detectamos diferenças significativas no número de *spots* obtidos para o grupo vacinado com o vírus YF17D/NS2B3/Tc em comparação com o grupo YF 17DD ( $P < 0,05$ , teste de Tukey) (Figura 4.14.B). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre as condições YF17D/E200/Tc e YF 17DD. O vírus YF17D/NS2B3/Tc provocou a ocorrência de  $151 \pm 119$  células produtoras de IFN- $\gamma$ , enquanto que o vírus YF17D/E200/Tc induziu  $57 \pm 44$  células produtoras de IFN- $\gamma$ . A diferença entre os grupos recombinantes foi significativa,  $P < 0,05$ , teste de Tukey. A imunização com somente o peptídeo TEWETGQI emulsificado em adjuvante de Freund (controle positivo) foi capaz de induzir cerca de  $68 \pm 27$  células produtoras de IFN- $\gamma$ , ainda que este valor não tenha sido estatisticamente diferente das outras imunizações.

Em seguida, foi avaliada a expansão de células T CD8<sup>+</sup> depois de um desafio com tripomastigotas de *T. cruzi* (Fig.4.14.C). Houve um aumento significativo nos níveis de produção de IFN- $\gamma$  para ambos os vírus recombinantes, com a detecção de  $1077 \pm 490$  células responsivas ao peptídeo TEWETGQI para o grupo imunizado com YF17D/NS2B3/Tc e de  $1240 \pm 514$  células para YF17D/E200/Tc, em contraste com o grupo YF 17DD, com a indução de  $105 \pm 64$  células produtoras de IFN- $\gamma$  ( $P < 0,05$ , teste de Tukey). Apesar de ter havido uma baixa indução de células pelo vírus YF17D/E200/Tc em ensaios pré-desafio ( $57 \pm 44$ ), este vírus foi capaz de induzir níveis similares aos induzidos por YF17D/NS2B3/Tc, após o desafio ( $1240 \pm 514$ ) (diferenças não estatisticamente significativas). Quanto ao controle positivo, nós observamos que este induz  $899 \pm 527$  células responsivas a TEWETGQI, estatisticamente diferente de YF 17DD ( $P < 0,05$ , teste de Tukey). Todos os grupos imunizados apresentaram-se estatisticamente diferentes de Mock, exceto o grupo controle negativo, imunizado com YF 17DD.

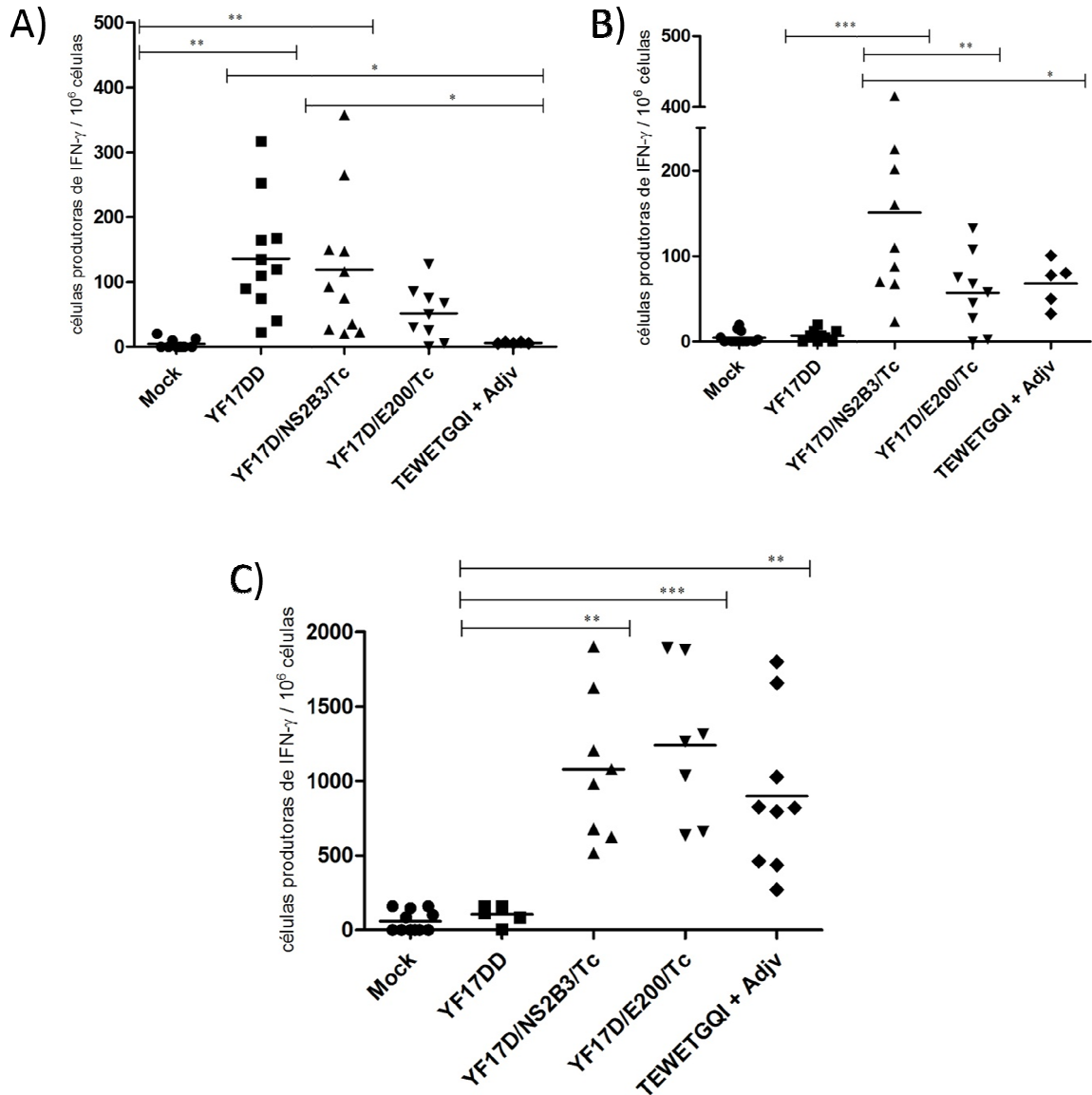


Figura 4.14 - Análise da produção de IFN- $\gamma$  por esplenócitos de camundongos imunizados com vírus recombinantes 17D e desafiados com *T. cruzi*. Ensaios de ELISPOT realizados em grupos de camundongos A/J que foram imunizados com *Mock* (Meio Earle 199), YF 17DD ou vírus recombinante (YF17D/E200/Tc e YF17D/NS2B3/Tc) uma semana após a última dose ou duas semanas após o desafio. (A) Resposta celular após estímulo com YF 17DD de esplenócitos obtidos após uma semana da última dose vacinal; (B) Resposta celular após estímulo com TEWETGQI de esplenócitos obtidos após uma semana da última dose vacinal. C) Resposta celular ao estímulo com TEWETGQI após o desafio com *T. cruzi*. Os resultados representam células produtoras de IFN- $\gamma$  por  $10^6$  células do baço. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$ , diferenças significativas pelo teste de Tukey.

#### 4.4.2. Ensaios de proteção em camundongos vacinados com vírus YF 17D recombinantes e desafiados com tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*

A fim de se estabelecer o grau de proteção induzido pela imunização com os vírus os YF 17D recombinantes, desafiámos os animais imunizados com 250 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Em camundongos A/J não vacinados, ocorreu uma taxa de mortalidade de 100% 24 dias pós-inoculação (dpi). No entanto, a imunização com os vírus YF17D/E200/Tc ou YF17D/NS2B3/Tc retardou a mortalidade dos camundongos em relação ao vacinal YF 17DD ( $P < 0,0001$ , teste de *Log-Rank*) (Figura 4.15). A imunização com peptídeo TEWETGQI emulsificado em adjuvante de Freund foi capaz de retardar a mortalidade em comparação com YF 17DD ( $P < 0,0001$ , teste de *Log-Rank*), gerando uma curva de sobrevivência que não foi diferente estatisticamente da obtida pelo vírus YF17D/NS2B3/Tc, mas sim da curva de sobrevivência induzida por YF17D/E200/Tc ( $P = 0,03$ , teste de *Log-Rank*).

Não pudemos observar uma proteção completa, já que apenas 2 de 15 (13% de proteção), do grupo imunizado com YF17D/NS2B3/Tc, sobreviveram até 60 dpi (Figura 4.15, Tabela 4.8). De fato, as imunizações com os vírus recombinantes aumentaram o tempo de sobrevida (AST) em relação à imunização controle com o vírus YF 17DD (AST de  $20 \pm 1$ ), assim, o grupo vacinado com o vírus YF17D/NS2B3/Tc teve uma AST de  $25 \pm 6$  dias ( $P = 0,0005$ , Mann-Whitney) e o vacinado com YF17D/E200/Tc exibiu uma AST de  $24 \pm 3$  dias ( $P = 0,001$ , Mann-Whitney). O grupo imunizado com peptídeo TEWETGQI emulsificado em adjuvante de Freund obteve uma AST de  $30 \pm 8$  dias ( $P = 0,0008$ , Mann-Whitney, em relação a YF 17DD). Embora tenha havido uma diferença estatisticamente significativa entre os tempos médios de sobrevida gerados pela imunização com o peptídeo TEWETGQI e YF17D/E200/Tc ( $P = 0,03$ , Mann-Whitney), não foram encontradas diferenças significativas entre os tempos médios de sobrevida induzidos por YF17D/NS2B3/Tc e YF17D/E200/Tc, ainda que a imunização com YF17D/NS2B3/Tc tenha protegido um número maior de animais em comparação com YF17D/E200/Tc (Figura 4.15, Tabela 4.8).

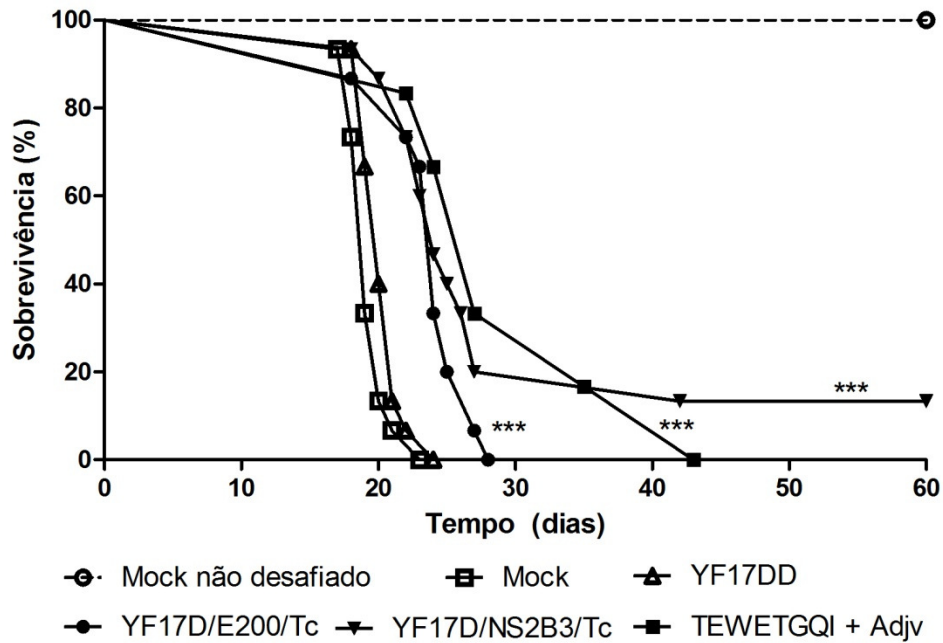


Figura 4.15 - Curva de sobrevivência (%) de camundongos A/J vacinados e desafiados por *T. cruzi*. Os animais foram imunizados com meio (Mock), YF 17DD, peptídeo TEWETGQI / adjuvante de Freund ou um dos dois vírus recombinantes e infectados ou não, intraperitonealmente, com 250 tripomastigotas de *T. cruzi*. As diferenças estatísticas assinaladas no gráfico (\*\*\*)  $P < 0,0001$ , teste de *Log-Rank*) mostram as comparações entre as curvas de sobrevivência com relação à obtida pelo vacinal YF 17DD. Representação de pelo menos dois experimentos independentes (número de animais descritos na Tabela 4.8).



Tabela 4.8 – Percentuais de sobrevivência e tempo médio de sobrevivência de camundongos A/J vacinados com os vírus recombinantes e desafiados com *T. cruzi*

Imunógeno	Dias após desafio vivos / total de animais (%) <sup>a</sup>			AST ± DP
	23dpi	40dpi	60 dpi	
<b>Mock</b>	0 / 15 (0)	0 / 15 (0)	0 / 15 (0)	19 ± 1
<b>YF 17DD</b>	1 / 15 (6)	0 / 15 (0)	0 / 15 (0)	20 ± 1
<b>YF17D/E200/Tc</b>	10 / 15 (66)	0 / 15 (0)	0 / 15 (0)	24 ± 3**
<b>YF17D/NS2B3/Tc</b>	9 / 15 (60)	3 / 15 (20)	2 / 15 (13)	25 ± 6***
<b>TEWETGQI + Adjuv</b>	5 / 6 (83)	1 / 6 (16)	0 / 6 (0)	30 ± 8***

<sup>a</sup> Camundongos foram imunizados com Meio (Mock), YF 17DD, peptídeo TEWETGQI emulsificado em adjuvante de Freund ou com os vírus recombinantes. Quatro semanas após a segunda dose, camundongos foram desafiados i.p. com 250 tripomastigotas sanguíneos. Diferenças entre os tempos médios de sobrevivência e desvio-padrão (AST ± DP) dos grupos imunizados com os vírus recombinantes, TEWETGQI e com o vacinal YF 17DD foram estatisticamente significativos (\*\*\*  $P < 0.0005$ , \*\*  $P < 0.001$ , teste Mann Whitney).

## PARTE II - Obtenção e caracterização do vírus YF 17D/ENS1/Tc

### 4.5. Construção e recuperação do vírus YF 17D/ENS1/Tc recombinante para o fragmento de 120 aminoácidos de ASP-2 de *Trypanosoma cruzi*

Nós observamos que a imunização com vírus recombinantes expressando o epítopo TEWETGQI da proteína ASP-2 de amastigotas induziu níveis parcialmente protetores em camundongos infectados com *T. cruzi*. Nós decidimos, portanto, continuar a explorar a questão de se utilizar os vírus YF 17D recombinantes para expressar peptídeos imunogênicos de ASP-2, visando a indução de imunidade protetora contra um desafio por *T. cruzi*. Para tal finalidade, montamos um cassete de expressão heterólogo contendo uma seqüência codificadora de 120 aminoácidos da proteína ASP-2, que compreende os aminoácidos da posição 261 a 380 (ASP-2<sub>261-380</sub>), a ser clonado na região intergênica dos genes E e NS1. Este fragmento foi previamente correlacionado à proteção de camundongos desafiados com *T. cruzi* (Araújo *et al.*, 2005). O sítio de inserção escolhido para esta terceira abordagem levou em conta a propriedade desta região em tolerar inserções maiores.

Esta metodologia é similar conceitualmente à inserção na região de clivagem pela protease NS2B/NS3, no entanto, a clivagem entre E e NS1 é realizada pela signalase celular, presente na membrana do retículo endoplasmático (RE), local de maturação viral. Assim, a montagem deste cassete levou em consideração a presença de motivos funcionais que permitem a secreção e processamento de proteínas virais bem como o grau de conservação de seqüências das estruturas que flanqueiam o inserto heterólogo (Bonaldo *et al.*, 2007).

No presente trabalho, foi construído um cassete de expressão, em que o fragmento de ASP-2<sub>261-380</sub> foi fusionado, no seu extremo 5', a uma seqüência duplicada de nove aminoácidos do amino-terminal de NS1 do vírus da FA e no seu extremo 3', ao carboxi-terminal (haste-âncora) duplicado da proteína E correspondente ao do Vírus da Dengue 4 (Figura 4.16A). A formação desta estrutura possibilita a correta orientação das proteínas E e NS1 virais ao lúmen do RE e do ancoramento da proteína E nesta organela, bem como a clivagem no N-terminal de NS1. A inserção de uma haste-âncora duplicada, oriunda do Vírus da Dengue 4, teve como finalidade reduzir a identidade entre as seqüências de haste-âncora presentes no cassete durante a replicação viral.

O fragmento de ASP-2<sub>261-380</sub>, clonado no cassete heterólogo foi primeiramente analisado quanto às suas características físico-químicas, incluindo o grau de hidrofobicidade na proteína pelo programa ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>). O fragmento

recombinante de ASP-2<sub>261-380</sub> é composto de 120 aminoácidos, possui um peso molecular esperado de 13,19 kDa e é ligeiramente hidrofóbico, apresentando um índice de GRAVY (do inglês Grand Average of hidropathicity) de 0.065 (Tabela 4.9). Em uma segunda etapa, o fragmento ASP-2<sub>261-380</sub>, fusionado aos segmentos de N-terminal de NS1 e à região haste-âncora da proteína E do vírus DENV4, em um total de 227 aminoácidos, foi analisado pelo programa TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), que previu a existência de duas regiões transmembranas (175 a 195 e de 204 a 226 aminoácidos), que deveriam acarretar no ancoramento à membrana do RE e que são correspondentes às regiões TM1 e TM2, respectivamente (Figura 4.16B).

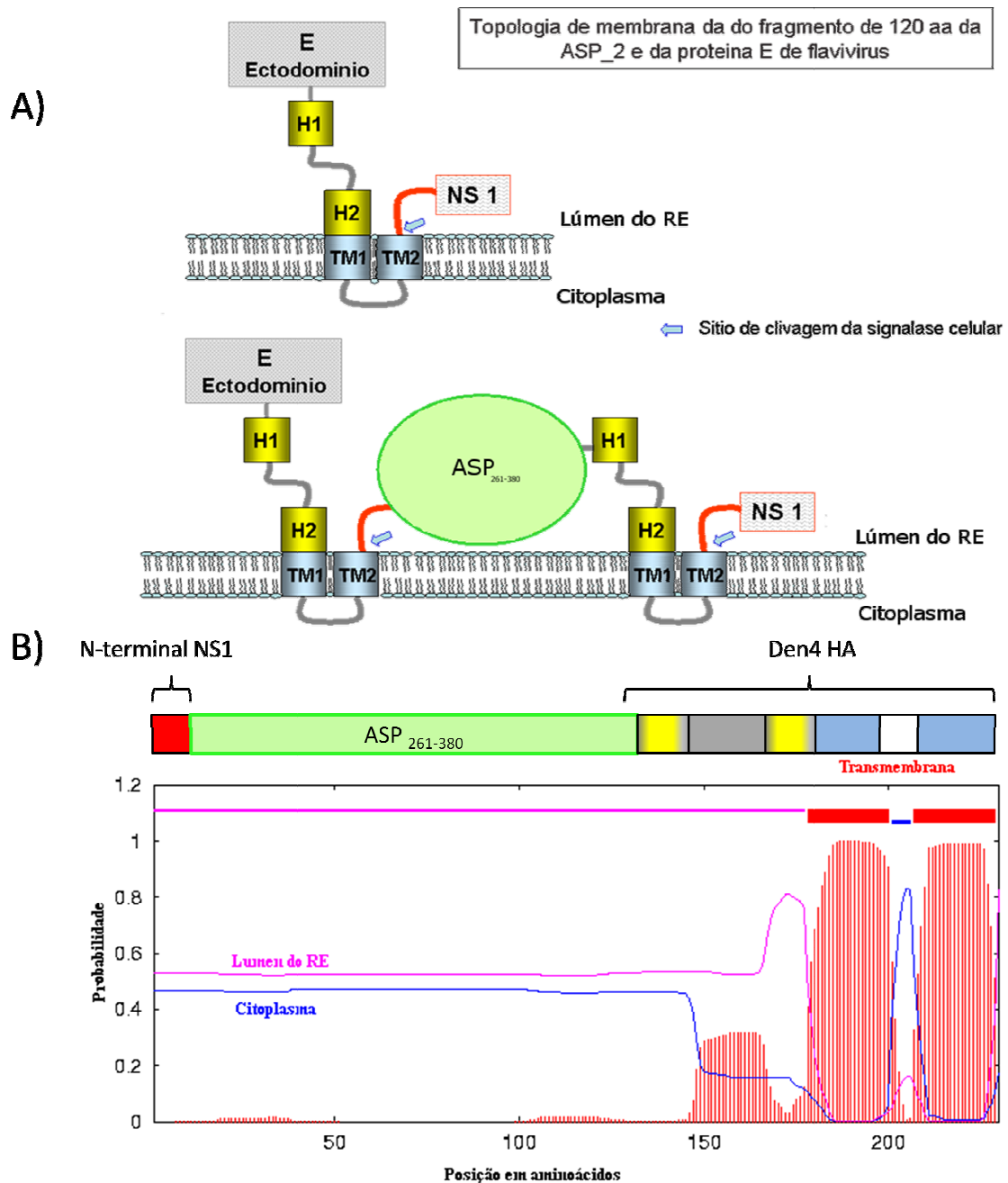


Figura 4.16. Diagrama esquemático do cassete de expressão de fragmento de ASP-2<sub>261-380</sub> (*T. cruzi*) no genoma de YF17D. A) Arranjo topológico do cassete heterólogo que expressa fragmento de ASP-2<sub>261-380</sub> entre as proteínas E e NS1 no lúmen do retículo endoplasmático (RE). Proteína E consiste de um ectodomínio seguido de região de haste-âncora (H1 e H2; TM1 e TM2). O amino-terminal do fragmento de ASP-2<sub>261-380</sub> encontra-se fusionado aos nove primeiros aminoácidos de NS1 e o seu carboxi-terminal, está fusionado à haste-âncora completa de DENV4. As setas em azul indicam sítios de clivagem pela signalase celular. Adaptado de Bonaldo *et al.*, 2007. B) Cassete recombinante de ASP-2<sub>261-380</sub> fusionado aos terminais 5' e 3' do VFA indicando o N-terminal de NS1 (em vermelho), seguido da seqüência de ASP-2<sub>261-380</sub> (em verde), e região da haste-âncora (HA): H1 e H2 (em amarelo), CS (em cinza), e TM1 e TM2 (em azul). Abaixo, predição de hélices transmembranas no

cassete heterólogo usando programa TMHMM. A seqüência foi posicionada dentro ou fora da membrana do retículo endoplasmático (RE) de acordo com a topologia da poliproteína. Regiões transmembranas correspondem a TM1 e TM2.

Tabela 4.9 – Parâmetros físico-químicos deduzidos a partir da seqüência de aminoácidos do fragmento de ASP-2<sub>261-380</sub> e do cassete recombinante de ASP-2<sub>261-380</sub>

<b>Propriedades físico-químicas</b>	<b>ASP-2<sub>261-380</sub></b>	<b>Cassete recombinante de ASP-2<sub>261-380</sub></b>
<b>N° de aminoácidos</b>	120	227
<b>Peso molecular (kDa)</b>	13,19	24,68
<b>Ponto isoelétrico (pI)</b>	4,55	7,83
<b>Índice alifático</b>	85,92	86,65
<b>GRAVY</b>	0.065	0.292

O cassete heterólogo foi todo montado por reações de PCR, que compreenderam três etapas distintas. A primeira, consistiu na amplificação de região correspondente ao fragmento de ASP-2<sub>261-380</sub> a partir do plasmídeo pIgSPclone9 (Boscardin *et al.*, 2003), fusionada no seu terminal 5' aos 27 primeiros nucleotídeos de NS1 do VFA e no seu terminal 3' aos 27 primeiros nucleotídeos que codificam para haste-âncora de DENV4, gerando um fragmento de 406 pb. A segunda etapa compreendeu a amplificação de região correspondente a haste-âncora completa de clone de cDNA oriundo do vírus DENV4, fusionada no seu terminal 5' aos 21 últimos nucleotídeos de ASP-2<sub>261-380</sub> e no seu terminal 3' aos 27 primeiros nucleotídeos de NS1 do VFA, gerando uma banda de 336 pb (Figura 4.17). Por sua vez, uma terceira amplificação uniu estes fragmentos, produzindo um fragmento de 708 pb, que contém os seguintes elementos: os 27 primeiros nucleotídeos de NS1, a porção ASP-2<sub>261-380</sub>, a região que codifica para haste-âncora de DENV4 e os 27 primeiros nucleotídeos de NS1 (Figura 4.17). Todos os iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 3.3 (seção Metodologia).

O cassete de expressão é flanqueado por dois sítios de restrição que foram usados nas subseqüentes etapas de clonagem: *EagI*, cuja inserção originou uma modificação na seqüência de aminoácidos do N-terminal de NS1 (original do VFA: DQGCAINFGK para seqüência modificada: DQGCAINFGR) e *NarI*, sítio localizado no final da seqüência correspondente ao C-terminal da Haste-âncora de DENV4.

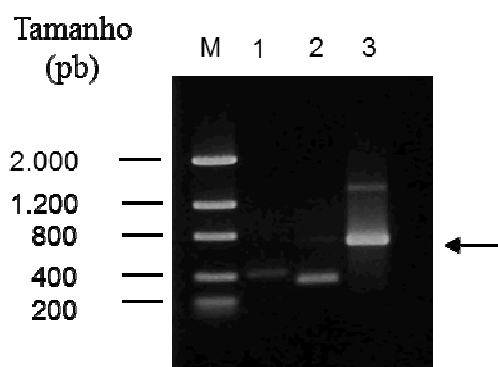


Figura 4.17 – Obtenção de produto de PCR contendo seqüência correspondente ao cassete heterólogo. 1- primeiro fragmento (406 pb) amplificado a partir do plasmídeo pIgSPclone9 (ASP-2); 2- segundo fragmento (336 pb) amplificado a partir de clone completo de dengue-4 (haste-âncora) e 3- fragmento fusionado (708 pb) de ASP-2<sub>261-380</sub> a 27 aminoácidos de NS1 (VFA) em sua porção N-terminal e à região de haste-âncora da proteína E do vírus da dengue 4 em sua porção C-terminal. M- marcador molecular *Low Mass* DNA.

A clonagem do produto fusionado de PCR (de 708 pb) foi realizada em duas etapas: a primeira, foi a de clonagem em vetor comercial de extremidades cegas, com a finalidade de se obter uma massa maior de DNA correspondente ao cassete, e a segunda etapa, foi a de retirada do cassete a partir do vetor comercial para uma subclonagem unidirecional, no plasmídeo pT3, o qual contém a porção central do genoma do Vírus da Febre Amarela.

Para a primeira etapa, testamos inicialmente o vetor de expressão pGEM-T (Promega), o qual possui na região de clonagem do inserto, terminais de timidina nas duas extremidades 3', o que impede a re-circularização do vetor. O plasmídeo pGEM-T (3.0 Kb) não possui sítios de restrição para *NarI*, sendo que apenas as preparações recombinantes iriam ser clivadas quando submetidas à digestão por esta enzima (pela presença do sítio *NarI* no inserto), gerando um fragmento de 3.708 pb (Figura 4.18A). Após transformação em bactérias *E. coli* MC1061, conseguimos apenas um clone recombinante. O baixo número de clones recombinantes utilizando pGEM-T, foi devido, provavelmente, à etapa anterior necessária de adenilação das extremidades porque utilizamos para a reação de fusão dos fragmentos por PCR, a enzima *Platinum Pfx* DNA Polimerase (Invitrogen), que possui atividade exonucleotídica 3'- 5' ("*Proof-reading*" ou revisora), no que foram geradas extremidades cegas, não clonáveis diretamente no pGEM-T.

Testamos a clonagem, então, do fragmento de PCR em um vetor comercial de terminações cegas, o TOPO-pCR-BluntII (Invitrogen) cujo tamanho é de 3.519 pb e permite uma ligação eficaz através da ação da Topoisomerase I, além de utilizar a seleção positiva de

colônias recombinantes pelo nocaute do gene letal *ccdB* de *E. coli*. Após transformação em *E. coli* DH5- $\alpha$ , dez preparações plasmidiais foram submetidas ao seqüenciamento nucleotídico da região e verificamos que cinco foram identificadas como positivas. A partir destas, selecionamos uma preparação para ser submetida à digestão por *EagI* seguido de *NarI* com a finalidade de retirada do inserto de 708 pb. Como TOPO-ASP2 possuía múltiplos sítios para ambas as enzimas, preferimos digerir primeiramente o plasmídeo recombinante com *EagI*, no que geraria quatro bandas dos seguintes tamanhos moleculares: 1298, 1258, 901 e 770 pb. A eletroforese em gel de agarose nos permitiu distinguir pelo menos três bandas: 1258 (ou 1298), 901 e 770 pb (Figura 4.18B). No caso, extraímos e purificamos a banda de 770 pb através do *Gel Extraction kit* (QIAGEN) por ser o fragmento que continha a seqüência do cassete heterólogo, e procedemos à digestão deste fragmento por *NarI*, o que liberaria o inserto recombinante do fragmento excedente de 62 pb, situado entre o sítio *NarI* (1013 nt) do C-terminal da HA de DENV4 e o sítio *EagI* (1078 nt) do próprio vetor (Figura 4.18C). O tamanho obtido do vetor recombinante (TOPO-ASP2) foi de 4.227 pb (Figura 4.19).

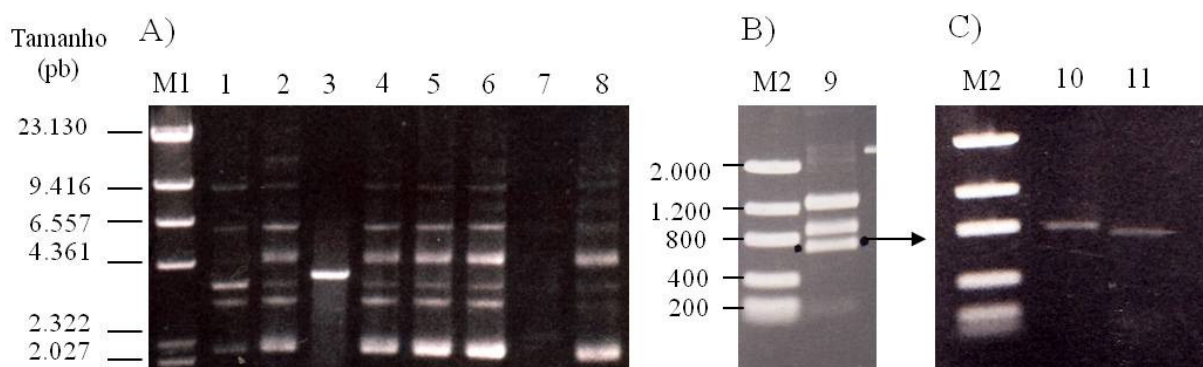


Figura 4.18 – Clonagem em pGEM-T e TOPO-pCR-BluntII. A) Preparações plasmidiais de *E. coli* MC1061 transformadas com pGEM-T após ligação ou não com inserto recombinante: pGEM-T nativo, *NarI* negativo (1), colônia não-digerida (2), colônia recombinante *NarI* positiva (3) e colônias não-recombinantes *NarI* negativas (4 – 8). B) Preparações plasmidiais de *E. coli* DH5- $\alpha$  transformadas com TOPO-pCR-BluntII após ligação com inserto recombinante: plasmídeo recombinante digerido com *EagI* (9) e C) fragmento de 770 pb extraído de TOPO-ASP2, digerido por *NarI* (11) ou não-digerido (10). M1 – marcador molecular  $\lambda$ /*HindIII* e M2- marcador molecular *Low Mass DNA*

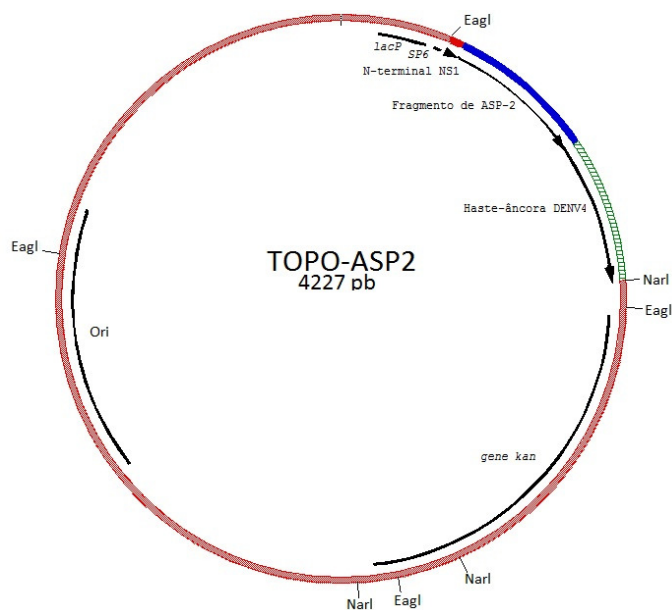


Figura 4.19 – Mapa do plasmídeo TOPO-ASP2 contendo a região do cassete heterólogo. O cassete está flanqueado por *EagI* (308 nt) e *NarI* (945 nt): em vermelho, o N-terminal de NS1, em azul, ASP-2<sub>261-380</sub> e em verde, rachurado, a região de haste-âncora de DENV4. Marcação mostrando os sítios *EagI* (posições: 308, 1078, 1979 e 3277 nt), *NarI* (1013, 1825 e 2073 nt), origem de replicação pUC (*ori*), promotor *lacP* e SP6 e gene que codifica para resistência a kanamicina. Imagem gerada em *Gene Construction Kit v. 2.5*.

Para a segunda etapa, utilizamos um derivado do plasmídeo pT3, previamente mutagenizado para conter os sítios de restrição *EagI* / *NarI* (pT3*EagI/NarI*). Utilizamos a cepa de *E. coli* SURE para transformarmos pT3*EagI/NarI* com o fragmento recombinante. Experimentos prévios em nosso laboratório mostraram que ocorreram plasmídeos pT3 de grande instabilidade (com deleções) quando isolados de clones bacterianos recombinantes. Após transformação em *E. coli* SURE, submetemos dez colônias à digestão por *NarI* e foi possível selecionar dois plasmídeos pT3*EagI/NarI* recombinantes pela menor migração quando comparados ao plasmídeo pT3*EagI/NarI* não-recombinante em análise por eletroforese em gel de agarose (Figura 4.20). Os plasmídeos foram seqüenciados para confirmação do cassete heterólogo e posteriormente, utilizados em preparações plasmidiais de larga-escala, conforme descrito anteriormente. O plasmídeo pT3*EagI/NarI* contendo o cassete de expressão para ASP-2<sub>261-380</sub> foi denominado pT3-ASP2 (Figura 4.21).

As etapas posteriores de confecção do molde de cDNA foram realizadas com a digestão de *NsiI/SalI* tanto do pT3-ASP2 quanto de pYFE200, reconstituindo o genoma viral do VFA, conforme descrito nos itens anteriores. Após etapa de transcrição *in vitro*, transfectamos o RNA viral em monocamada de células Vero. Noventa e seis horas após a



transfecção, em CPE intensa, coletamos o sobrenadante das culturas (1P) e realizamos reação de RT-PCR, o que gerou um fragmento de 1.694 pb. Este fragmento foi submetido ao seqüenciamento da região. Os iniciadores utilizados estão listados nas Tabelas 3.1 e 3.4 (seção Metodologia). O vírus expressando cassete heterólogo foi denominado YF 17D/ENS1/Tc.

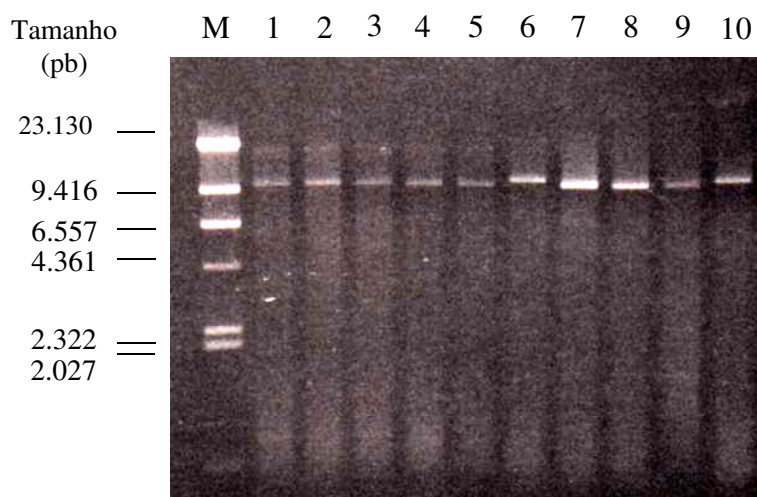


Figura 4.20 – Análise por eletroforese em gel de agarose dos preparados plasmidiais oriundos de pT3*EagI/NarI* digeridos por *NarI*. Clones não recombinantes (1 – 5; 7 – 9) apresentando fragmento de 9.942 pb e clones recombinantes (6 e 10), apresentando fragmento de 10.650 pb. M - marcador molecular *lambda/HindIII*

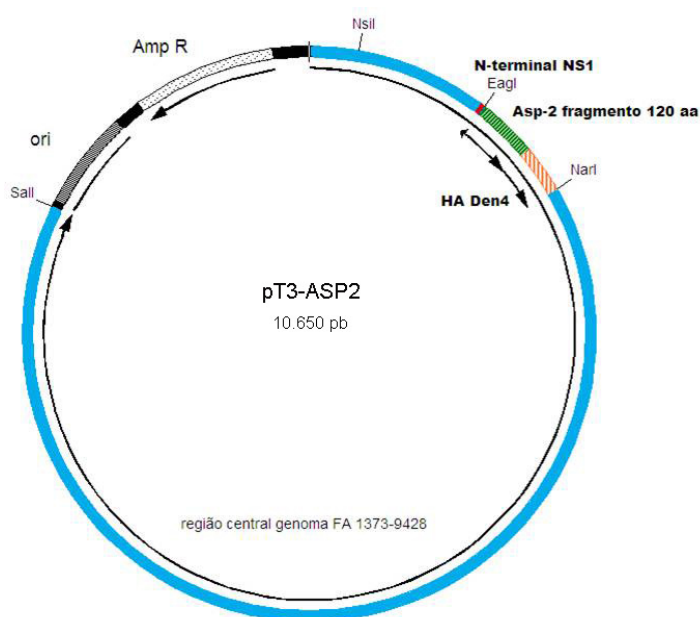


Figura 4.21 - Mapa do plasmídeo pT3-ASP2 contendo a região do cassete heterólogo. O cassete está flanqueado por *EagI* (1113 nt) e *NarI* (1799 nt): o N-terminal de NS1 de Febre Amarela, seguido do

fragmento de 120 aminoácidos de ASP-2 e os domínios C-terminais (haste-âncora) da proteína E de Dengue 4. Em azul, região central do genoma de FA com marcação para os sítios de restrição das enzimas *NsiI* e *SalI*. Regiões em cinza mostrando origem de replicação (*ori*) e gene que codifica para resistência a Ampicilina. Imagem gerada em *Gene Construction Kit v. 2.5*.

## **4.6. Caracterização biológica do vírus YF 17D/ENS1/Tc**

### **4.6.1. Obtenção do vírus recombinante**

O sobrenadante de pós-transfecção do vírus foi submetido a uma segunda passagem em células Vero, originando o estoque viral (2P), conforme descrito no item acima. As alíquotas de 2P foram usadas para todos os subseqüentes estudos deste experimento. A integridade da seqüência do cassete contendo ASP-2 foi confirmada por seqüenciamento nucleotídico da região, salvo uma única mutação pontual localizada na região de Haste-âncora, que trocou o códon de GGT para GAT, ocasionando uma substituição do aminoácido Glicina (G) para Ácido Aspártico (D), na região correspondente à da seqüência conservada (CS) da haste-âncora de DENV-4. No entanto, esta mutação não pareceu afetar a viabilidade do vírus. O título viral obtido para o estoque de YF 17D/ENS1/Tc foi de  $2,5 \times 10^6$  PFU/mL (ou 6,40  $\log_{10}$  PFU/mL), similar aos títulos obtidos pelos outros dois vírus recombinantes, construídos neste trabalho.

### **4.6.2. Proliferação do vírus YF 17D/ENS1/Tc em células Vero e determinação do fenótipo de placas de lise celular**

O vírus recombinante YF 17D/ENS1/Tc foi analisado quanto à sua capacidade de proliferação em monocamada de células Vero, comparativamente ao controle YF 17DD, conforme descrito anteriormente. Os resultados apresentados na Tabela 4.10 e na Figura 4.22A são provenientes de três experimentos independentes. O pico de crescimento do vírus YF 17DD ocorreu em 72 h após a infecção, com a produção máxima de  $7,56 \pm 0,07 \log_{10}$  PFU / mL, enquanto que o pico de crescimento do vírus recombinante ocorreu em 96 h com a produção máxima de  $6,76 \pm 0,35 \log_{10}$  PFU / mL (Figura 4.22A).

Apesar dos títulos virais obtidos para o vírus recombinante ou YF17DD apresentarem-se similares em 48 h pós-infecção, nós observamos uma diferença mais pronunciada no crescimento destes a partir de 48 h, perdurando até 120 h pós-infecção. No

entanto, estas diferenças não são estatisticamente significativas em 72 h ou 96 h ( $P = 0,1$ , teste  $t$  não pareado).

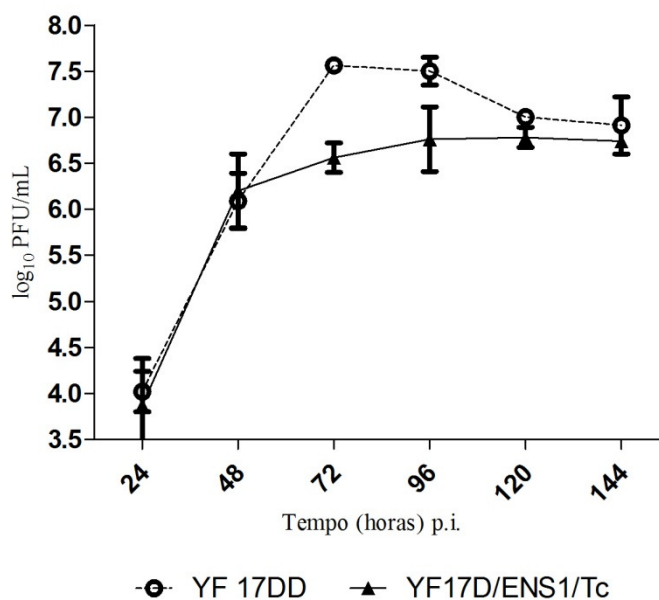
Quando analisamos a morfologia da placa de lise do vírus YF17D/ENS1/Tc, verificamos que este, assim como os outros recombinantes descritos acima, apresenta um tamanho de placas de lise reduzido em comparação com YF 17DD (Figura 4.22B).

Tabela 4.10 - Valores médios com desvio-padrão ( $\log_{10}$  PFU/mL) de títulos virais nos tempos coletados

Vírus	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
<b>YF 17DD</b>	4,02±0,22	6,09±0,30	<b>7,56±0,07</b>	7,50±0,15	7,00±0,06	6,91±0,31
<b>YF17D/ENS1/Tc</b>	3,87±0,51	6,20±0,40	6,56±0,16	6,76±0,35	<b>6,78±0,11</b>	6,74±0,01

Em negrito: picos dos títulos virais obtidos para os vírus avaliados

A)



B)

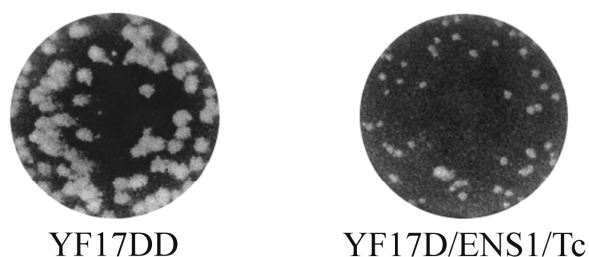


Figura 4.22 – Caracterização do vírus recombinante YF17D/ENS1/Tc. A) Cinética de replicação em células Vero de YF17D/ENS1/Tc (triângulos, linha completa) e YF 17DD (círculo, linha pontilhada). Cada ponto representa o título médio e o desvio-padrão, obtidos em seis tempos diferentes (horas) após infecção de monocamada de células Vero. B) Morfologia das placas de lise de YF 17DD e YF17D/ENS1/Tc obtidas a partir de sobrenadante coletado após 120 h de infecção.

#### 4.6.3. Estabilidade genética do vírus recombinante YF 17D/ENS1/Tc

Com a finalidade de se verificar a integridade do cassete heterólogo clonado na região E/NS1 do Vírus da Febre Amarela, realizamos passagens independentes sucessivas em monocamada de células Vero, a partir do estoque viral (2P). A cada passagem seriada, realizamos titulações a partir do sobrenadante celular de cada duplicata (P1 e P2) a fim de se verificar e calcular a MOI, a qual foi mantida em 0,02 por todo o experimento (Tabela 4.11).

Tabela 4.11 – Título em  $\log_{10}$  PFU/mL e MOI do vírus YF17D/ENS1/Tc da terceira até a sexta passagem em células Vero

Passagem	Título ( $\log_{10}$ PFU/mL)	MOI	Passagem	Título ( $\log_{10}$ PFU/mL)	MOI
P <sub>1</sub>			P <sub>2</sub>		
3P <sub>1</sub>	6,44	0,02	3P <sub>2</sub>	6,10	0,009
4P <sub>1</sub>	6,85	0,05	4P <sub>2</sub>	6,36	0,01
5P <sub>1</sub>	6,19	0,01	5P <sub>2</sub>	6,01	0,009
6P <sub>1</sub>	6,56	0,02	6P <sub>2</sub>	6,62	0,03

Reações de RT-PCR foram feitas a partir de RNA viral extraído do sobrenadante celular da 6<sup>a</sup> passagem seriada (6P1), utilizando-se dos mesmos oligonucleotídeos empregados nas reações da 2<sup>a</sup> passagem. No caso, utilizamos a passagem P1 por ter se aproximado melhor do MOI desejado (0,02) do que P2. Uma banda de 1.681 pb seria gerada, caso o inserto estivesse íntegro no vírus recombinante, ou bandas inferiores a este tamanho

molecular poderiam ser encontradas, caso houvesse algum tipo de deleção no cassete. Uma banda de 1.000 pb foi gerada a partir da reação de RT-PCR, realizada com os mesmos oligonucleotídeos, a partir de sobrenadante celular do estoque viral de YF 17DD (Figura 4.23).

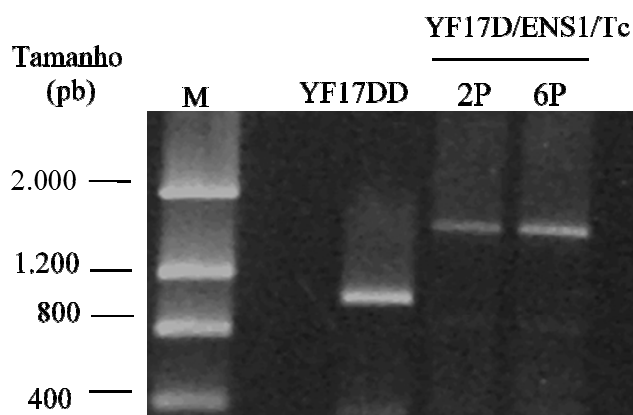


Figura 4.23 –RT-PCR realizado a partir de RNA extraído de sobrenadantes celulares de YF 17DD ou vírus recombinante YF17D/ENS1/Tc (2P e 6P). Água livre de RNase foi utilizada como controle negativo na reação de RT-PCR. Marcador de peso molecular: *Low Mass DNA Ladder*.

#### 4.6.4. Expressão do inserto heterólogo pelo vírus recombinante YF 17D/ENS1/Tc

Para verificarmos se a infecção celular pelo vírus recombinante YF17D/ENS1/Tc direcionava a expressão do fragmento de ASP-2, empregou-se o teste de imunofluorescência indireta, no qual se utilizou para detecção de antígenos virais um soro policlonal hiperimune de YF17D (HIYF) e para a proteína recombinante um soro policlonal de camundongo anti-TEWETGQI (Figura 4.24). Enquanto o que o soro hiperimune anti-FA pôde detectar antígenos do Vírus da Febre Amarela em todas as condições de células Vero infectadas, o anticorpo anti-TEWETGQI só foi capaz de especificamente marcar células Vero infectadas com YF17D/ENS1/Tc.

Observamos que a marcação com anti-TEWETGQI está claramente associada à região perinuclear, podendo indicar a retenção do inserto nas proximidades do retículo endoplasmático (RE). Verificamos também uma marcação perinuclear similar quando células infectadas com o mesmo vírus são marcadas com anticorpos do próprio soro de camundongos A/J imunizados pelo vírus YF17D/ENS1/Tc. Estes resultados mostram que o vírus

YF17D/ENS1/Tc é capaz de expressar corretamente o fragmento clonado, possivelmente no lúmen do RE, conforme observado anteriormente (Bonaldo *et al.*, 2007).

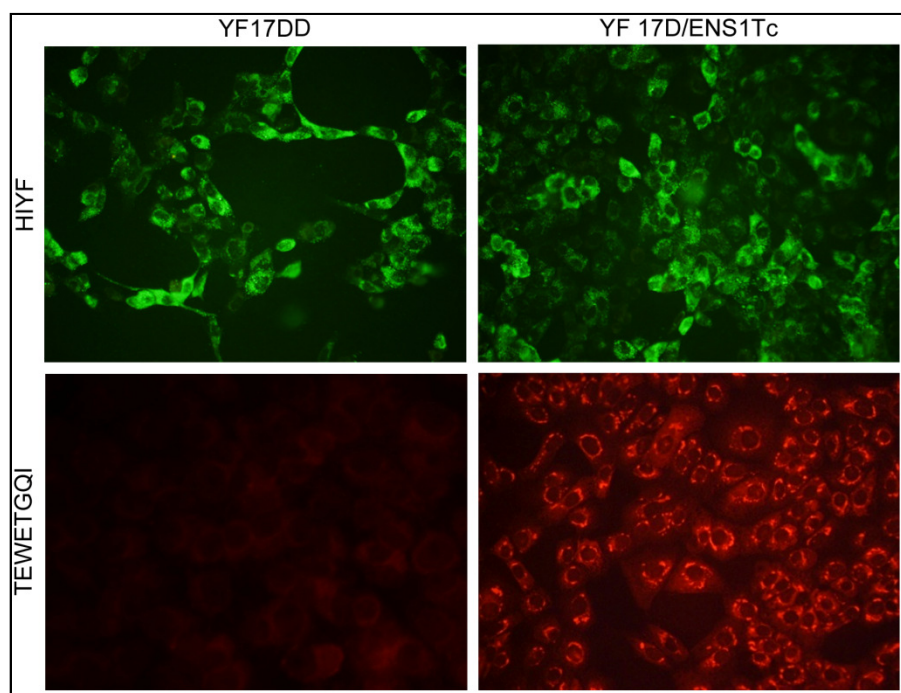


Figura 4.24 - Expressão do epítopo TEWETGQI pelo vírus recombinante YF17D/ENS1/Tc em ensaio de imunofluorescência indireta. Células Vero infectadas com o vírus recombinante ou vírus vacinal YF 17DD foram marcadas com soro hiperimune para YF 17DD (HIYF) ou anti-TEWETGQI. Anticorpos secundários utilizados foram Alexa Fluor 488 anti-IgG (em verde) e Alexa Fluor 546 anti-IgG (em vermelho).

#### **4.7. Avaliação da capacidade de indução de anticorpos neutralizantes específicos ao Vírus da Febre Amarela em camundongos A/J**

Com a finalidade de avaliarmos a imunogenicidade do vírus recombinante YF17D/ENS1/Tc, analisamos soros de camundongos imunizados com este vírus recombinante para a detecção e anticorpos neutralizantes para o vírus FA. Todos os grupos de animais foram negativos para a presença de anticorpos neutralizantes para YF 17DD antes da imunização. O grupo controle imunizado com meio Earle 199 apresentou faixa de título menor ou igual a 1:10. A porcentagem de soroconversão foi determinada pelo total de camundongos que geraram títulos acima de 1:10 (Tabela 4.12).

Os camundongos imunizados com YF 17DD apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes de  $559 \pm 410$ , superior ao valor obtido pelos imunizados com o vírus

recombinante YF17D/ENS1/Tc, que foi de  $69 \pm 76$  ( $P < 0,0001$ ; teste Tukey). YF17D/ENS1/Tc induz títulos diferentes também de YF17D/NS2B3/Tc ( $P < 0,05$ ; teste Tukey). Ainda que todos os camundongos imunizados com YF17D/ENS1/Tc tenham soroconvertido (100%), similarmente ao resultado obtido pelo vacinal, encontramos baixos títulos de anticorpos neutralizantes, variando em uma faixa de 1:18 a 1:235. A faixa de diluição de anticorpos detectada no grupo imunizado com YF 17DD variou de 1:99 a  $\geq 1:1280$ .

Estes resultados indicam que o vírus recombinante YF17D/ENS1/Tc é menos imunogênico que o controle vacinal, pelo menos em relação a sua capacidade de induzir anticorpos neutralizantes dirigidos ao vírus FA. Com o intuito de se tentar aumentar a imunogenicidade viral, decidiu-se por testar novas formulações virais, nas quais seriam administrados dois vírus recombinantes simultaneamente (Tabela 4.12).

As formulações foram compostas de uma mistura dos vírus YF17D/NS2B3/Tc e YF17D/ENS1/Tc, sendo que duas concentrações virais distintas foram testadas, compondo as formulações 1 e 2 (Tabela 3.5, seção Metodologia). Observamos que o título de anticorpos neutralizantes contra FA em camundongos imunizados com a formulação 1 ( $51 \pm 25$ ), a qual continha 50% de cada vírus, não diferiu do título obtido pelo vírus YF17D/ENS1/Tc, mas foi estatisticamente diferente da imunização com YF17D/NS2B3/Tc ( $P < 0,05$ ; teste Tukey). Já a formulação 2, a qual foi administrada em inóculos contendo 75% do vírus YF17D/ENS1/Tc em relação a 25% de YF17D/NS2B3/Tc, apresentou títulos ainda mais baixos do que todas as outras imunizações ( $37 \pm 26$ ) ( $P < 0,05$ ). Não se observou diferenças significativas entre YF17D/ENS1/Tc e as Formulações virais.

Tabela 4.12 – Imunogenicidade dos vírus recombinantes em A/J

<b>Imunógeno<sup>a</sup></b>	<b>Animais (n)</b>	<b>Soroconversão (%)</b>	<b>GMT <math>\pm</math> SD<sup>b</sup></b>	<b>Faixa de título<sup>**</sup></b>
<b>YF 17DD</b>	15	100	$\geq 559 \pm 410$	99 - $\geq 1280$
<b>YF17D/NS2B3/Tc</b>	10	100	$\geq 277 \pm 465^*$	47 - $\geq 1280$
<b>YF17D/ENS1/Tc</b>	10	100	$69 \pm 76^{***}$	18 - 235
<b>Formulação 1<sup>c</sup></b>	10	90	$51 \pm 25^{***}$	18 - 86
<b>Formulação 2<sup>d</sup></b>	10	50	$37 \pm 26^{***}$	$\leq 10$ - 82
<b>Meio Earle 199</b>	10	0	$\leq 10$	$\leq 10$

<sup>a</sup>Recíproco da diluição em que se encontra 50% de redução das placas virais

<sup>b</sup>Valores representam média geométrica (GMT)  $\pm$  desvio-padrão (SD).

<sup>c</sup>50% de vírus YF17D/ENS1/Tc e 50% de vírus YF17D/NS2B3/Tc

<sup>d</sup>75% de vírus YF17D/ENS1/Tc e 25% de vírus YF17D/NS2B3/Tc

\*  $P < 0.05$ , diferença de YF17D/NS2B3/Tc em comparação com YF17D/ENS1/Tc, Formulação 1 e Formulação 2 pelo teste ANOVA, Tukey

\*\*\*  $P < 0.0001$ , diferenças entre YF 17DD e os demais grupos, pelo teste ANOVA, Tukey.

Dados foram obtidos de dois experimentos independentes.

#### **4.8. Avaliação da resposta imune específica para proteína ASP-2<sub>261-380</sub> de *T.cruzi***

##### **4.8.1. Reatividade de anticorpos induzidos pela imunização de camundongos pelo vírus recombinante YF17D/ENS1/Tc com formas amastigotas de *T. cruzi***

Após a determinação da capacidade dos vírus recombinantes de induzirem anticorpos neutralizantes para o vírus FA, era importante determinar se ocorria a indução de resposta imune humoral específica para a proteína recombinante ASP-2<sub>261-380</sub>. Assim, soros de camundongos A/J imunizados com o vírus recombinante YF17D/ENS1/Tc foram testados em ensaio de imunofluorescência indireta com células Vero infectadas pela cepa Y de *T. cruzi*. Utilizamos como controle positivo, soro de animais que haviam sido imunizados via s.c. com o peptídeo TEWETGQI emulsificado em adjuvante de Freund. Verificamos que soros de animais imunizados com YF17D/ENS1/Tc, são capazes de reagir com amastigotas intracelulares (Figura 4.25). Observamos que células não infectadas (sem ninhos de amastigotas) não apresentam marcação específica. Desse modo, pôde se demonstrar que o vírus YF17D/ENS1/Tc induz resposta imune humoral específica a proteína ASP-2 de *T. cruzi* cepa Y.



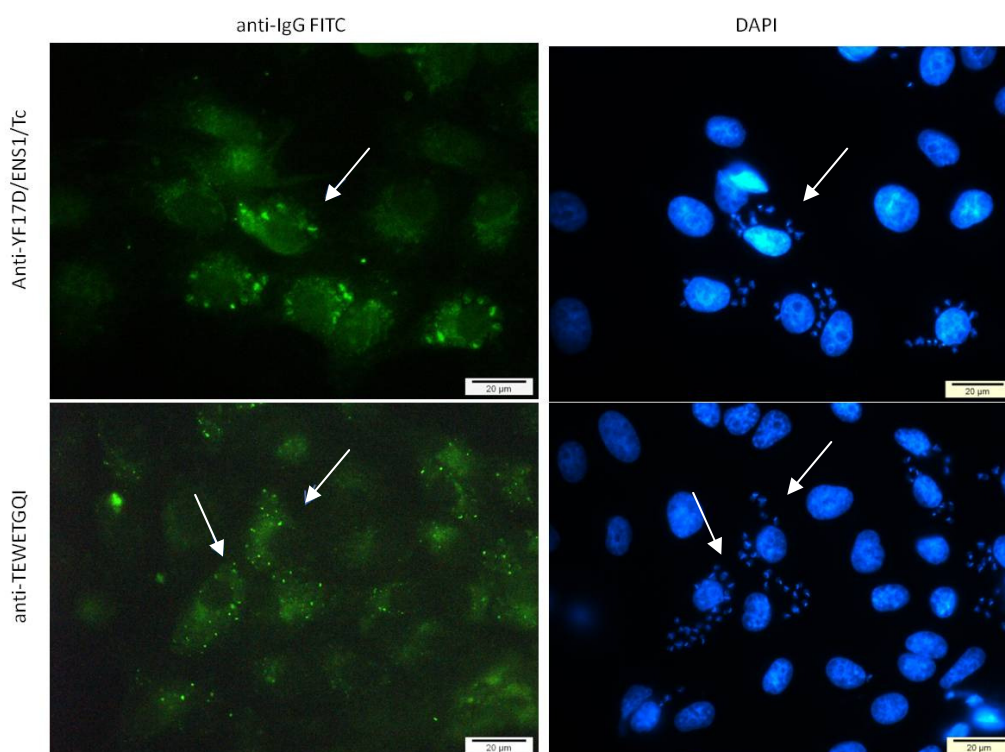


Figura 4.25- Detecção de anticorpos específicos contra amastigotas em células infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Camundongos A/J foram imunizados com duas doses de vírus recombinante YF17D/ENS1/Tc ou peptídeo TEWETGQI (em adjuvante de Freund). As células Vero foram fixadas e posteriormente processadas para imunofluorescência indireta. Setas indicam formação de ninhos de amastigota no citoplasma celular. Observação em microscópio Zeiss Axioplan equipado com epifluorescência e ao microscópio confocal Zeiss com objetiva de 63X.

#### 4.8.2. Proteção contra a infecção por *T. cruzi* cepa Y em camundongos vacinados com YF17D/ENS1/Tc ou formulações virais

Para averiguarmos se a resposta imune induzida pela vacinação com o vírus YF17D/ENS1/Tc ou formulações virais seria capaz de proteger camundongos A/J, realizamos ensaios de desafio com *T. cruzi*. Verificamos que a imunização com o vírus YF17D/ENS1/Tc foi capaz de retardar a morte dos camundongos infectados, sendo que a porcentagem de sobrevivência foi de 25% (3 / 12) em 30 dpi, enquanto que neste tempo, todos os animais controles Mock e YF 17DD haviam sucumbido (Tabela 4.13). Em 60 dpi, este valor caiu para 16% de sobrevivência (2 / 12), porém os camundongos imunizados com YF17D/ENS1/Tc apresentaram um tempo médio de sobrevivência ( $26 \pm 3$  dpi) superior aos imunizados com YF

17DD ( $21 \pm 3$  dpi;  $P < 0,001$ , teste Mann-Whitney). Embora tenham morrido mais camundongos imunizados com YF17D/NS2B3/Tc (8% de sobrevivência em 60 dpi), a

imunização com este mesmo vírus induziu uma AST de  $27 \pm 6$  dpi, similar ao obtido por YF17D/ENS1/Tc (sem diferenças estatísticas).

No intuito de se verificar se a administração de formulações vacinais dos dois vírus recombinantes YF17D/NS2B3/Tc e YF17D/ENS1/Tc (Formulação 1 ou 2), poderia levar a um aumento da proteção ao desafio com *T. cruzi*, os dois vírus foram inoculados simultaneamente em um mesmo inóculo via subcutânea em camundongos A/J. A escolha destes dois vírus baseou-se em alguns pressupostos analisados nesta tese, dentre eles, uma relativa maior capacidade imunogênica e menor atenuação de YF17D/NS2B3/Tc em relação a YF17D/E200/Tc. Além disso, YF17D/ENS1/Tc poderia suscitar uma resposta imune potencialmente mais abrangente, pois além de conter o epítipo TEWETGQI, o fragmento ASP-2<sub>261-380</sub> contém outros determinantes antigênicos, conforme os determinados pelo *software* de predição de epítopos (octâmeros) em ligação ao MHC murino H2-K<sup>k</sup> (Tabela 4.6).

Nesse contexto, realizamos os ensaios de imunização, conforme descrito anteriormente, e verificamos que ambas as formulações virais são capazes de elevar os níveis de proteção, sendo que a Formulação 1 consegue proteger até 58% (7 / 12) dos camundongos infectados por *T. cruzi*, aumentando também a AST para  $29 \pm 6$  dpi em relação aos grupos controles (Tabela 4.13,  $P < 0,05$ , teste Mann-Whitney).

Curvas de sobrevida (Método Kaplan-Meyer) foram determinadas para todos os grupos de camundongos A/J (Figura 4.26). Verificamos que tanto as imunizações realizadas com os vírus recombinantes sozinhos quanto as com a Formulação 1 ou 2 geraram taxas de sobrevivência estatisticamente diferentes das dos grupos controles: mock e YF 17DD (teste de *Log-Rank*;  $P < 0,0001$ ), indicando que estas imunizações ao menos retardam o aparecimento da sintomatologia. No entanto, somente a Formulação 1 induz níveis de sobrevivência diferentes, significativamente, tanto em relação a YF17D/NS2B3/Tc quanto a YF17D/ENS1/Tc ( $P = 0,006$  e  $P = 0,01$ ; respectivamente), quando imunizados isoladamente. Não observamos diferenças significativas entre a Formulação 2 com os demais vírus.

Devido aos resultados obtidos com as formulações contendo os vírus YF17D/NS2B3/Tc e YF17D/ENS1/Tc, decidimos por testar duas outras hipóteses: 1) se a imunização com dois vírus consecutivamente (YF17D/ENS1/Tc com reforço dado por YF17D/NS2B3/Tc), ao invés de simultaneamente (Formulação 1 e 2), poderia levar ao mesmo nível de proteção que estas, e 2) se uma terceira formulação viral, agora contendo os dois vírus que expressam somente o epítipo TEWETGQI, isto é, contendo os vírus

YF17D/NS2B3/Tc e YF17D/E200/Tc (Formulação 3) poderia também induzir níveis similares de proteção ou sobrevida.

Verificamos que a imunização consecutiva dos vírus (YF17D/ENS1/Tc com reforço dado por YF17D/NS2B3/Tc) não induz o mesmo nível de proteção do que a Formulação 1 (imunização simultânea com dois vírus), obtendo-se uma sobrevida de apenas 9% (1 / 11) em relação a uma sobrevida de 58% de camundongos imunizados pela Formulação 1 (Tabela 4.13, Figura 4.26). Quanto à formulação 3, a imunização simultânea dos vírus que expressam somente TEWETGQI não aumentou a proteção de camundongos desafiados, sendo que todos morreram em até 30 dpi (Tabela 4.13, Figura 4.26). Além disso, esta formulação, diferentemente de todas as outras imunizações testadas, não foi capaz de induzir um aumento na AST ( $22 \pm 3$ ), quando comparada ao grupo imunizado com YF 17DD (estatisticamente insignificante). Portanto, a vacinação com a formulação 3, onde um único determinante antigênico é expresso em distintas localizações no genoma de YF 17D e talvez em diferentes compartimentos celulares não forneceu proteção comparável à Formulação 1 testada anteriormente, a mais eficaz, protegendo 58% dos camundongos ( $P = 0,0001$ , *Log-Rank*).

Tabela 4.13 - Percentuais de sobrevivência e tempo médio de sobrevivência de camundongos A/J vacinados com formulações virais e desafiados com *T.cruzi*

Imunógeno	Dias após desafio		AST ± SD
	vivos / total de animais (%)		
	30dpi	60 dpi	
Mock	0 / 12 (0)	0 / 12 (0)	21 ± 3
YF 17DD	0 / 12 (0)	0 / 12 (0)	20 ± 2
YF17D/NS2B3/Tc	2 / 12 (16)	1 / 12 (8)	27 ± 6***
YF17D/ENS1/Tc	3 / 12 (25)	2 / 12 (16)	26 ± 3***
YF17D/ENS1/Tc + YF17D/NS2B3/Tc	3 / 11 (27)	1 / 11 (9)	25 ± 6**
Formulação 1 <sup>a</sup>	9 / 12 (75)	7 / 12 (58)	29 ± 6**
Formulação 2 <sup>b</sup>	3 / 7 (43)	3 / 7 (43)	24 ± 4**
Formulação 3 <sup>c</sup>	0 / 10 (0)	0 / 10 (0)	22 ± 3

Diferenças entre os tempos médios de sobrevivência (AST) ± desvio-padrão (SD) dos grupos recombinantes quando comparados com YF 17DD (\*\*\*)  $P < 0,0001$ ; \*\*  $P < 0,05$ , teste Mann Whitney)

<sup>a</sup>50% de vírus YF17D/ENS1/Tc e 50% de vírus YF17D/NS2B3/Tc

<sup>b</sup>75% de vírus YF17D/ENS1/Tc e 25% de vírus YF17D/NS2B3/Tc

<sup>c</sup>50% de vírus YF17D/E200/Tc e 50% de vírus YF17D/NS2B3/Tc

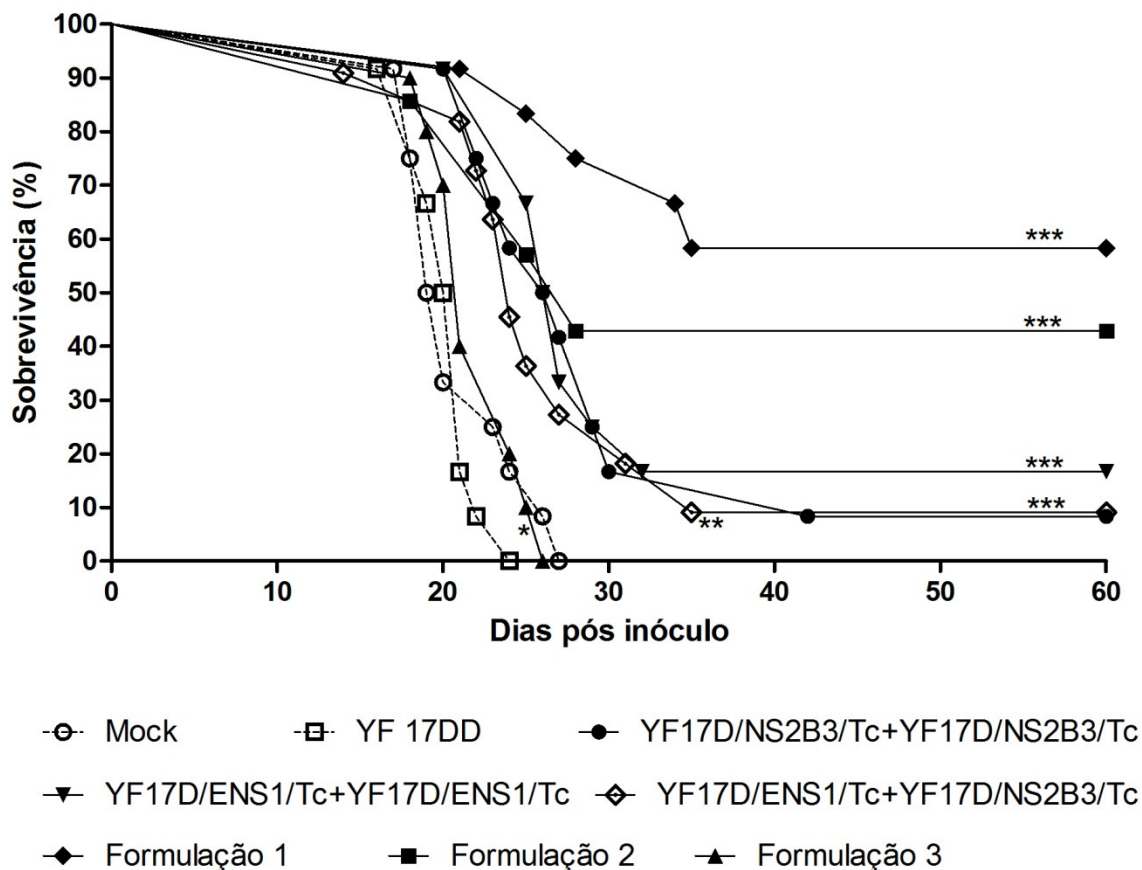


Figura 4.26 - Curva de sobrevivência (%) de camundongos A/J vacinados e desafiados por *T. cruzi*. Os camundongos foram imunizados com duas doses de meio (Mock), YF 17DD, vírus recombinantes ou formulação destes (em uma imunização simultânea) e desafiados com 250 tripomastigotas de *T. cruzi*. Diferenças significativas em comparação com YF 17DD (\*\*\*)  $P < 0,0001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$ ; teste *Log-Rank*). Formulação 1: 50% de vírus YF17D/ENS1/Tc e 50% de vírus YF17D/NS2B3/Tc; Formulação 2: 75% de vírus YF17D/ENS1/Tc e 25% de vírus YF17D/NS2B3/Tc e Formulação 3: 50% de vírus YF17D/E200/Tc e 50% de vírus YF17D/NS2B3/Tc. Os dados foram obtidos de dois experimentos independentes.

#### 4.8.3. Avaliação da parasitemia em camundongos vacinados e infectados por *T. cruzi*

Os níveis de parasitemia são frequentemente empregados em estudos de vacinação para Chagas, visto que níveis reduzidos de parasitas no sangue correlacionam-se com proteção de camundongos vacinados e desafiados por *T. cruzi*. Resultados preliminares mostraram que enquanto o grupo controle Mock apresentou um pico de  $407 \pm 196 \times 10^4$

parasitas / mL (média) no 10º dia pós-infecção (dpi), YF17D/ENS1/Tc e Formulação 1 apresentaram cargas parasitárias menores, de  $185 \pm 64$  parasitas / mL e de  $138 \pm 107$  parasitas / mL, respectivamente, em 9 dpi (Figura 4.27). Já YF17D/NS2B3/Tc induziu uma carga parasitária alta, similar ao controle, de  $360 \pm 139 \times 10^4$  parasitas / mL em 9 dpi. Apesar dos animais imunizados com YF17D/ENS1/Tc terem apresentado níveis parasitêmicos reduzidos em relação a YF17D/NS2B3/Tc e ao grupo controle Mock, somente a imunização com a Formulação 1 foi capaz de reduzir o pico de parasitemia de forma significativa em relação a Mock ( $P < 0,05$ ; teste de Tukey).

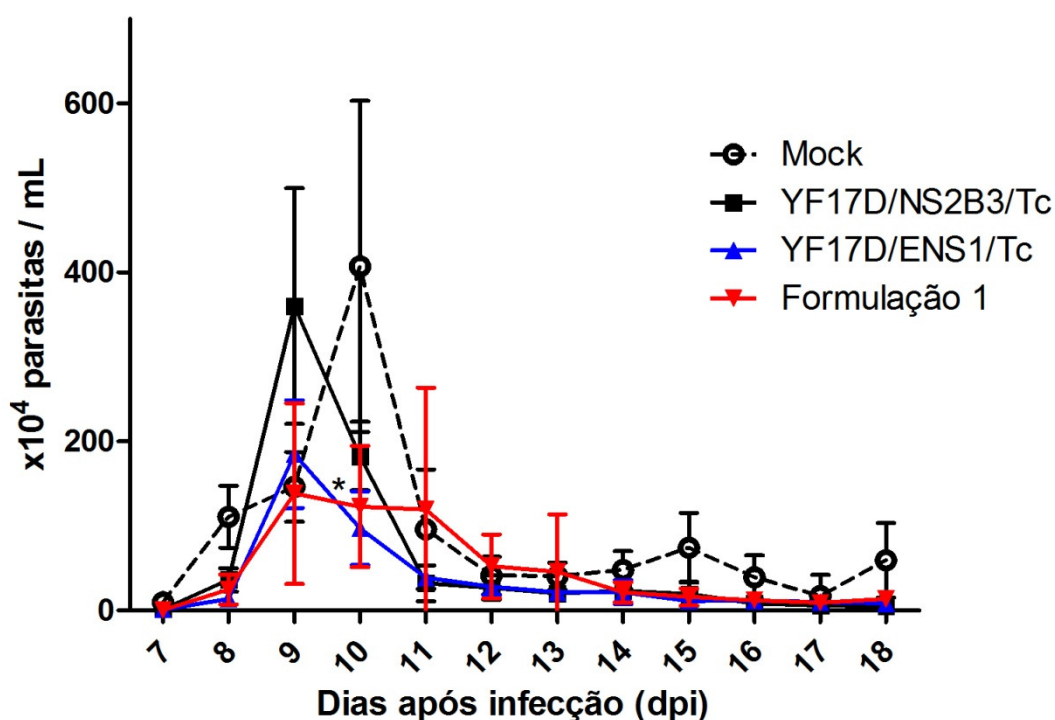


Figura 4.27 – Média dos níveis parasitêmicos obtidos de camundongos imunizados. Após duas doses de meio (Mock), YF17D/NS2B3/Tc, YF17D/ENS1/Tc e Formulação 1, os camundongos foram desafiados com *T. cruzi* (cepa Y), conforme descrito anteriormente. Formulação 1: 50% de vírus YF17D/ENS1/Tc e 50% de vírus YF17D/NS2B3/Tc. \*  $P < 0,05$ ; teste de Tukey.

#### 4.8.4. Determinação da indução de células de baço produtoras de interferon-gama específicas a TEWETGQI ou ao Vírus da Febre Amarela nos animais imunizados

A secreção de IFN- $\gamma$  é particularmente importante tanto na sobrevivência de camundongos atuando como um mediador da resposta adaptativa, quanto na evolução da

infecção de *T. cruzi* na doença de Chagas no homem (Tzelepis *et al.*, 2006, 2007; Martin *et al.*, 2006). Assim, nesta parte do trabalho, avaliamos se a imunização com os vírus recombinantes sozinhos ou com a Formulação 1 viral induz uma resposta de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  específicas para o epítipo TEWETGQI, conforme descrito por Araújo e equipe (2005) em outros tipos de vacinas estudadas em camundongos.

Os esplenócitos de camundongos A/J foram analisados em sete dias após a primeira ou segunda dose e quinze dias após o desafio com *T. cruzi*. Além disso, com o objetivo de melhor avaliarmos a indução de células específicas durante o protocolo de vacinação, bem como o aumento da resposta celular (secundária) após o reforço (segunda dose) de vírus YF 17D recombinantes, decidimos por determinar o número de células produtoras de IFN- $\gamma$  em camundongos vacinados com uma dose e duas doses (Figura 4.28A-D).

Verificamos que, após uma dose, a resposta específica para o vírus YF 17DD não diferiu entre os grupos de imunizações, sendo que a imunização com YF 17DD gerou uma média de  $55 \pm 48$  células produtoras de IFN- $\gamma$ , em comparação com a Formulação 1 e YF17D/NS2B3/Tc, as quais geraram em torno de 40 células produtoras de IFN- $\gamma$  (Figura 4.28A). Já o vírus YF17D/ENS1/Tc induziu uma média menor, de  $21 \pm 28$  células produtoras de IFN- $\gamma$ . No entanto, este valor não diferiu de forma significativa de YF 17DD (teste de Tukey). Quando avaliamos células estimuladas com o vírus YF 17DD, obtidas após duas doses, observamos que todos os grupos imunizados com vírus recombinantes ou Formulação 1 são capazes de induzir o mesmo nível de IFN- $\gamma$  que o grupo imunizado com o vacinal YF 17DD (não há diferenças estatísticas) (Figura 4.28C). No entanto, há diferenças significativas entre todos os grupos imunizados com vírus recombinantes em relação ao grupo Mock ( $P < 0,05$ ; teste de Tukey).

Em relação a células secretoras de IFN- $\gamma$  que respondem especificamente ao estímulo com o peptídeo TEWETGQI de ASP-2 de *T. cruzi*, a administração de uma única dose da Formulação 1 induziu  $104 \pm 44$  células produtoras de IFN- $\gamma$ , enquanto que o controle vacinal YF 17DD levou à detecção de apenas  $4 \pm 6$  células produtoras de IFN- $\gamma$  ( $P < 0,0001$ ; teste de Tukey) (Figura 4.28B). A imunização com dose única do vírus YF17D/ENS1/Tc gerou poucas células secretoras de IFN- $\gamma$  ( $41 \pm 23$ ) em relação aos outros grupos, sendo essa diferença estatisticamente significativa quando comparada ao grupo imunizado com a Formulação 1 ( $P < 0,05$ , teste de Tukey). Além da Formulação 1, o vírus YF17D/NS2B3/Tc também se mostrou significativo na indução de células secretoras de IFN- $\gamma$  ( $P < 0,05$ , teste de

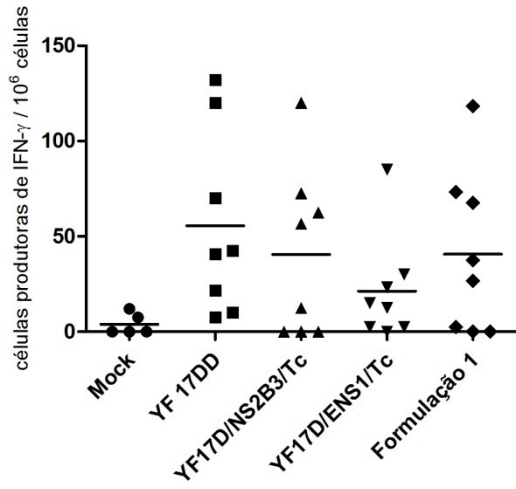
Tukey), embora não na mesma magnitude do que a Formulação 1, tendo gerado uma média de  $58 \pm 53$  células produtoras de IFN- $\gamma$ .

Em relação à dose reforço, administrada em um intervalo de 15 dias, nós vemos que os grupos de vírus recombinantes são capazes de expandir o número de células produtoras de IFN- $\gamma$ , mediante estímulo com o vetor vacinal ( $P < 0,007$ , teste  $t$ , Mann-Whitney) (Figura 4.29A). O mesmo ocorre nas análises efetuadas em esplenócitos isolados de grupos de animais vacinados com vírus recombinantes mediante estímulo com o peptídeo TEWETGQI ( $P < 0,05$ , teste  $t$ , Mann-Whitney) (Figura 4.29B). Observamos que a resposta anamnésica específica para o vetor vacinal é similar para todos os grupos, enquanto que para o peptídeo-específico, tanto YF17D/ENS1/Tc quanto a Formulação 1 são capazes de induzir um aumento significativo de células respondedoras após a 2ª dose, gerando médias de  $254 \pm 158$  e  $255 \pm 129$  células secretoras de IFN- $\gamma$ , respectivamente (Figuras 4.28D e 4.29B). Assim, vemos que a Formulação 1 induz mais do que o dobro da resposta inicial ( $P = 0,007$ , teste  $t$ , Mann-Whitney) e YF17D/ENS1/Tc é capaz de induzir até seis vezes mais com o reforço da dose ( $P = 0,001$ , teste  $t$ , Mann-Whitney).

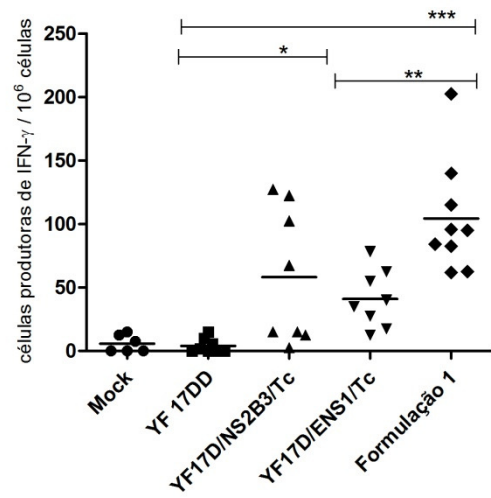
Células de baço, recuperadas de camundongos desafiados com uma dose letal de *T. cruzi*, mostraram que tanto as imunizações dos dois vírus recombinantes (YF17D/NS2B3/Tc ou YF17D/ENS1/Tc), separadamente, quanto simultaneamente (Formulação 1) são capazes de induzir a expansão de níveis mais elevados de células responsivas ao peptídeo TEWETGQI pós-desafio, aumentando em até seis vezes o n° de células produtoras de IFN- $\gamma$ , quando comparado com a 2ª dose ( $P < 0,001$ , teste  $t$ , Mann-Whitney). YF17D/ENS1/Tc e Formulação 1 foram capazes de induzir células produtoras de IFN- $\gamma$  ( $1689 \pm 497$  e  $1728 \pm 1029$ , respectivamente) maiores do que YF17D/NS2B3/Tc ( $1091 \pm 476$ ).



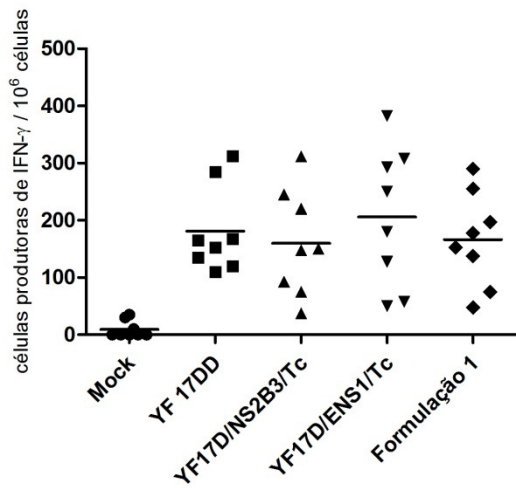
A) células responsivas a YF 17DD – 1 dose



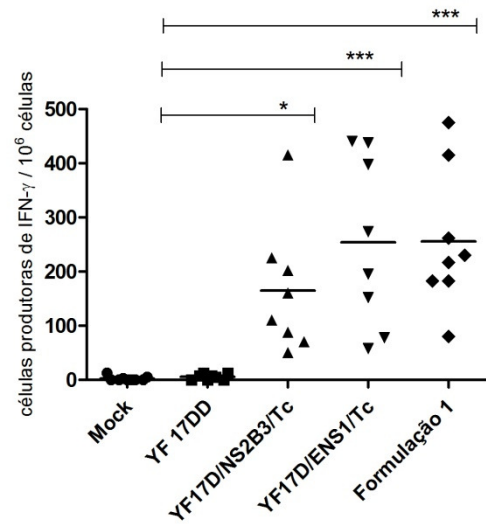
B) células responsivas a TEWETGQI - 1 dose



C) células responsivas a YF 17DD – 2 doses



D) células responsivas a TEWETGQI - 2 doses



E) células responsivas a TEWETGQI - pós-desafio *T. cruzi*

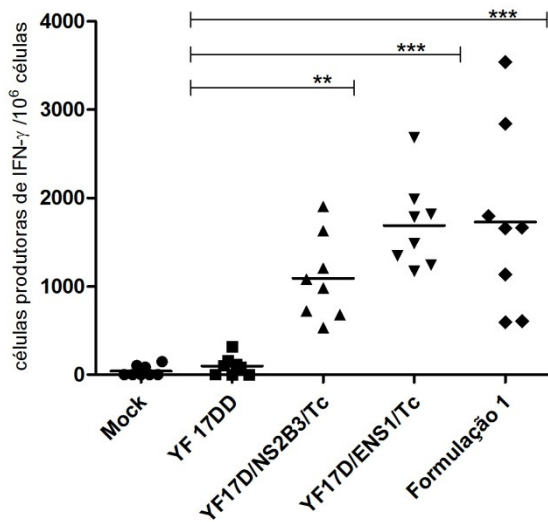
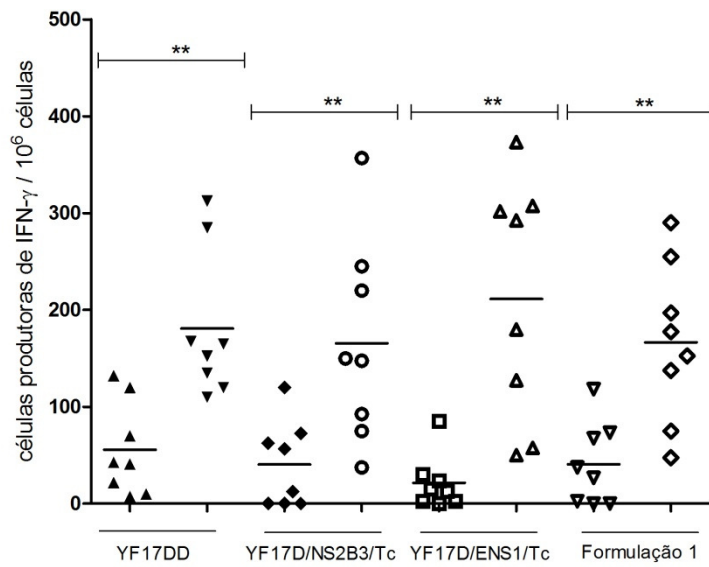
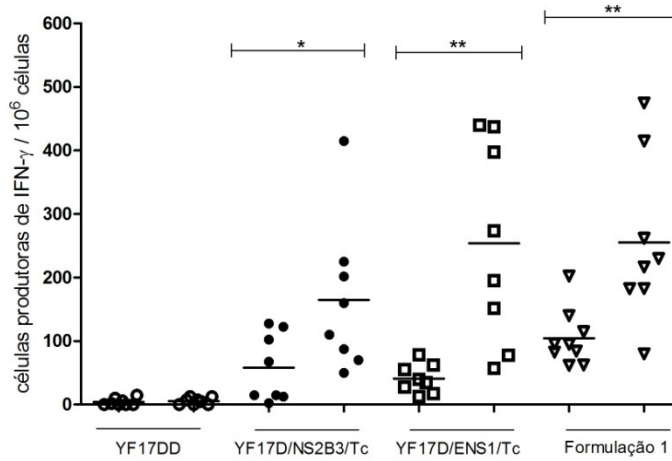


Figura 4.28 – Análise da produção de IFN- $\gamma$  por esplenócitos de camundongos imunizados com YF17D/ENS1/Tc e desafiados com *T. cruzi*. Os animais foram imunizados com Meio Earle 199 (Mock), vírus YF 17DD, vírus recombinantes (YF17D/NS2B3/Tc e YF17D/ENS1/Tc) ou Formulação 1 (50% de YF17D/NS2B3/Tc e 50% de YF17D/ENS1/Tc). Os gráficos representam o número de células produtoras de IFN- $\gamma$  específicas para: (A) o vírus YF 17DD inativado, após 1 dose vacinal; (B) o peptídeo TEWETGQI, após 1 dose vacinal; (C) o vírus YF 17DD inativado, após 2 doses vacinais; (D) o peptídeo TEWETGQI, após 2 doses; (E) o peptídeo TEWETGQI, após o desafio com *T. cruzi*. Os resultados representam n° de *spots* produzidos por células produtoras de IFN- $\gamma$  por  $10^6$  células do baço. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$ , diferenças significativas pelo teste de Tukey. Os dados foram obtidos de pelo menos dois experimentos independentes.

A) células responsivas a YF 17DD – 1 e 2 doses



B) células responsivas a TEWETGQI - 1 e 2 doses



C) células responsivas a TEWETGQI – 2 doses e pós-desafio

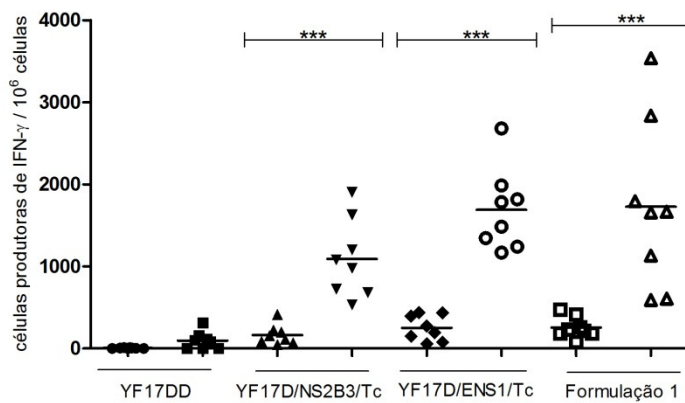


Figura 4.29 – Quantificação da expansão do número de células produtoras de IFN- $\gamma$  antes e após desafio com *T. cruzi*. Camundongos A/J foram imunizados com Meio Earle 199 (Mock), com os vírus YF 17DD, YF17D/NS2B3/Tc, YF17D/ENS1/Tc ou com a Formulação 1 (50% de YF17D/NS2B3/Tc e 50% de YF17D/ENS1/Tc). Os gráficos representam as análises comparativas entre a primeira e segunda dose do regime de vacinação nos camundongos A/J, em relação a: (A) esplenócitos estimulados com vírus YF 17DD inativado; (B) esplenócitos estimulados com peptídeo TEWETGQI e (C) esplenócitos estimulados com TEWETGQI após o desafio com *T. cruzi*. Os resultados representam números de *spots* produzidos por células produtoras de IFN- $\gamma$  por  $10^6$  células do baço e são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. \* $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$ , teste *t*, Mann-Whitney. Estes valores descrevem diferenças estatisticamente significativas.

#### **4.8.5. Ensaios de linfoproliferação de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> por marcação com CFSE**

Os ensaios de linfoproliferação foram empregados neste trabalho com o intuito de se determinar a ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> em células do baço secretoras de IFN- $\gamma$  de animais vacinados com o vírus vacinal YF 17DD, com os vírus recombinantes e, em especial, com a Formulação 1, condição que gerou os mais satisfatórios resultados de proteção ao desafio com *T. cruzi* e de secreção de IFN- $\gamma$ . Além disso, queríamos determinar a presença de linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos ao epítipo TEWETGQI de *T. cruzi* ativados pela vacinação com a Formulação 1 em camundongos A/J, de modo a compararmos estes resultados com os descritos anteriormente por outros autores sobre a correlação positiva entre proteção e ativação de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  específicas ao epítipo TEWETGQI (Araújo *et al.*, 2005). Pretendia-se também com esta análise estabelecer se esta vacinação estaria induzindo um repertório linfocitário diferenciado quando comparado aos outros grupos virais, controle e demais recombinantes. Além disso, o repertório de linfócitos induzido pela vacinação com YF17DD por si só, constitui um ponto de interesse (Querec *et al.*, 2009).

Para realizarmos estas análises, utilizamos o marcador vital intracelular CFSE (*carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester*) que após difusão intracelular, se torna fluorescente e cujos agrupamentos livres de amina reagem com proteínas intracelulares, formando complexos de CFSE-proteínas, de longa-duração (principalmente os formados com componentes do citoesqueleto), que são monitorados durante várias divisões celulares. Esplenócitos foram recuperados de grupos de três camundongos A/J vacinados ou não com uma ou duas doses (seguindo o mesmo cronograma realizado para as análises anteriores) e

foram incubados ou não na presença de estímulos (YF 17DD inativado, TEWETGQI ou *ConA*) com CFSE e marcados com anti-CD8-PE-Cy5 e anti-CD4-R-PE em cada poço. Posteriormente, estas células foram fixadas e lidas em citômetro de fluxo (FACSCalibur).

Empregando-se esta condição de marcação, lançamos mão de uma análise que pode ser visualizada no esquema representativo apresentado na Figura 4.30, na qual selecionamos inicialmente um *gating* de linfócitos pelo tamanho (FSC - eixo X) e granulosidade (SSC – eixo Y) (Figura 4.30A), a partir deste, selecionamos populações de células CD4<sup>+</sup> (eixo X) ou CD8<sup>+</sup> (eixo Y) (Figura 4.30B) e analisamos para cada uma destas populações separadamente, a porcentagem de células proliferativas (visualizadas pela redução na intensidade de marcação com CFSE ou deslocamento para esquerda) (Figura 4.30C – D).

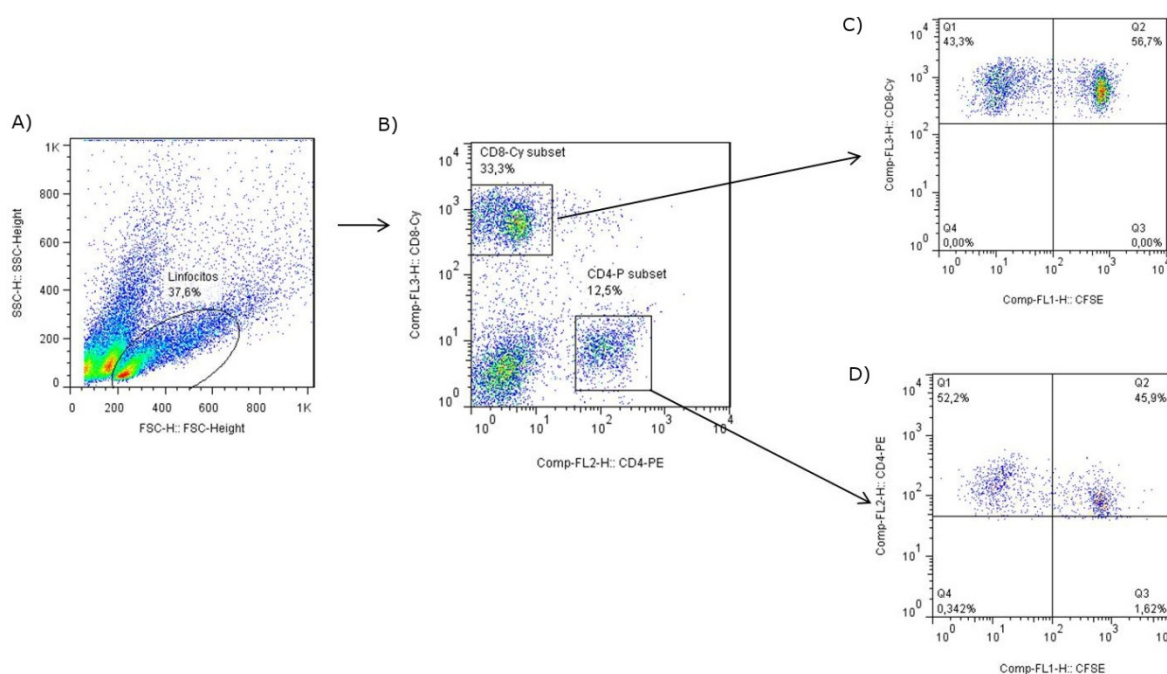


Figura 4.30 – Esquema representativo do tipo de análise realizada para determinação de ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> presentes em esplenócitos de camundongos A/J imunizados com diferentes composições vacinais. A) *Gating* de linfócitos definido por tamanho (eixo X- FSC) e granulosidade (eixo Y - SSC). B) *Gating* nos sub-conjuntos de CD4-PE e CD8-Cy. C) Marcação e porcentagem das células CD8<sup>+</sup> CFSE<sub>low</sub> proliferativas. D) Marcação e porcentagem das células CFSE<sub>low</sub> proliferativas CD4<sup>+</sup>.

A redução na intensidade de marcação pelo CFSE, indicando a proliferação das sub-populações CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (deslocamento para a esquerda do gráfico) está mostrada no esquema representativo da Figura 4.31, na qual a porcentagem de células do baço que proliferaram após uma dose é diferenciada dependendo do estímulo empregado. Enquanto que

o estímulo inespecífico por *ConA* induz a proliferação da maior parte dos linfócitos (Figura 4.31D), a maioria das amostras analisadas demonstra que o próprio vírus YF 17DD como estímulo é um bom indutor de linfoproliferação (Figura 4.31B), além de TEWETGQI (Figura 4.31C).

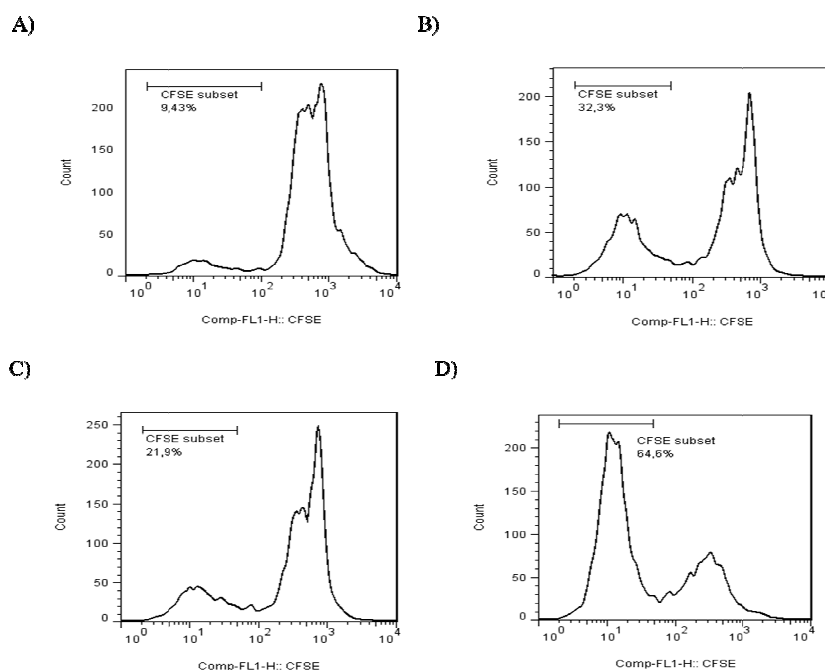


Figura 4.31 – Linfoproliferação *in vitro* por CFSE após uma única dose da Formulação Viral 1. Gráficos representativos mostrando picos e porcentagens de linfoproliferação a partir de esplenócitos recuperados de camundongos A/J imunizados. As células foram estimuladas *in vitro* com: A) meio de cultura, B) YF 17DD inativado, C) TEWETGQI e D) *ConA*.

Mediante estímulo com peptídeo TEWETGQI, confirmamos que células oriundas de camundongos imunizados com uma única dose de vírus recombinantes (YF17D/NS2B3/Tc e YF17D/ENS1/Tc) ou formulação destes (50% de YF17D/NS2B3/Tc e 50% de YF17D/ENS1/Tc – Formulação 1) são capazes de proliferar (Figura 4.32A) e que os percentuais de células CFSE<sub>low</sub> T CD8<sup>+</sup> TEWETGQI-específicas são maiores em animais que foram vacinados com a Formulação 1 (29%) seguido dos animais imunizados com o vírus YF17D/NS2B3/Tc (12%) em relação aos animais que receberam o vírus YF17D/ENS1/Tc (1%). Este resultado está de acordo com os percentuais de células produtoras de IFN- $\gamma$  obtidos por ELISPOT, em que a Formulação 1 e YF17D/NS2B3/Tc mostraram-se capazes de apresentar uma resposta melhor do que YF17D/ENS1/Tc após uma dose, dentro dos parâmetros analisados. A figura 4.32B mostra gráficos representativos dos percentuais de

células T CD8<sup>+</sup> CFSE<sub>low</sub> estimuladas ou não com TEWETGQI a partir de camundongos vacinados com YF17D/NS2B3/Tc, YF17D/ENS1/Tc ou Formulação 1.

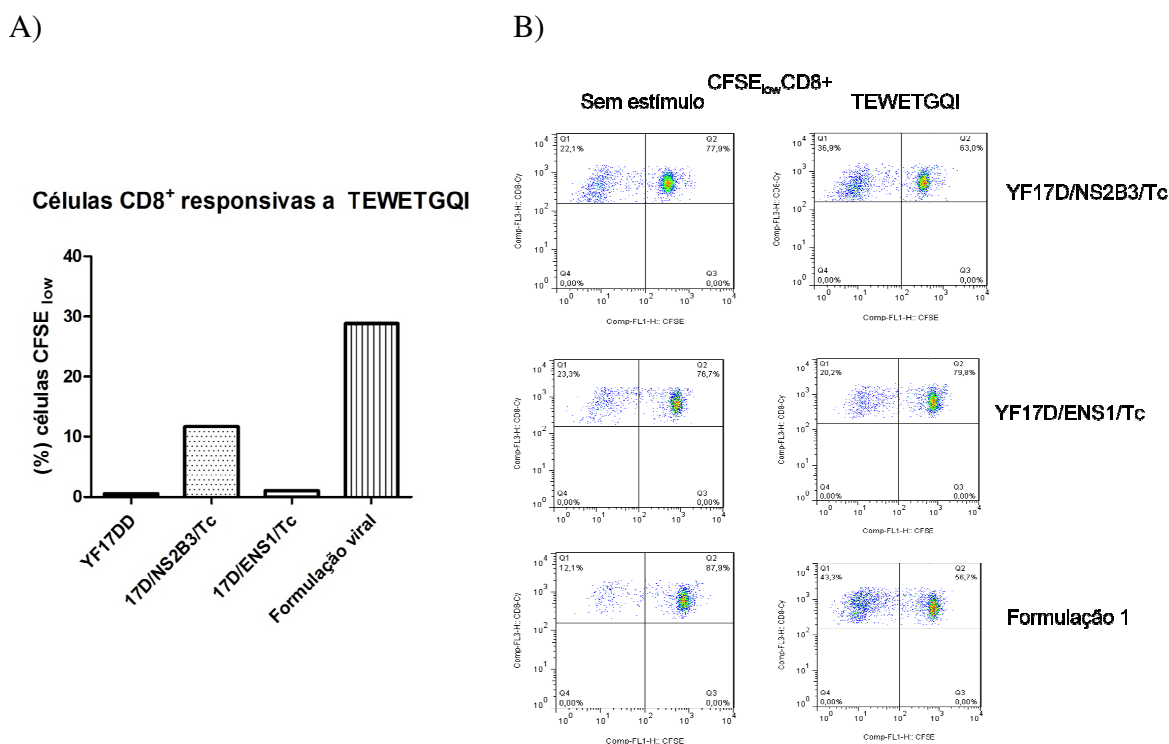


Figura 4.32 - Células CFSE<sub>low</sub> CD8<sup>+</sup> responsivas a TEWETGQI após uma dose de YF 17DD vacinal, vírus recombinantes ou Formulação viral 1. A) Média dos percentuais de células T CD8<sup>+</sup> CFSE<sub>low</sub> responsivas a TEWETGQI para cada imunização. Os valores específicos (células estimuladas) foram descontados dos não-específicos (células não-estimuladas) para cada grupo. B) Representativo de análise realizada para cada grupo de camundongos imunizados com YF17D/NS2B3/Tc, YF17D/ENS1/Tc ou Formulação 1, indicando os percentuais de células CFSE<sub>low</sub> T CD8<sup>+</sup> estimuladas ou não com TEWETGQI. Os percentuais foram contabilizados para a montagem do gráfico A.

Quando células oriundas de camundongos imunizados com as diferentes composições vacinais são estimuladas com o próprio vírus vacinal YF 17DD inativado, verificamos um balanço na resposta celular de T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, com uma ou duas doses, que não parece diferir dentre os grupos imunizados com YF 17DD ou com os vírus recombinantes (Figura 4.33). Verificamos que a segunda imunização (2<sup>a</sup> dose) com os vírus recombinantes e o vacinal é capaz de induzir um aumento de pelo menos duas vezes mais o percentual de linfoproliferação, tanto de T CD4<sup>+</sup> quanto de T CD8<sup>+</sup>.

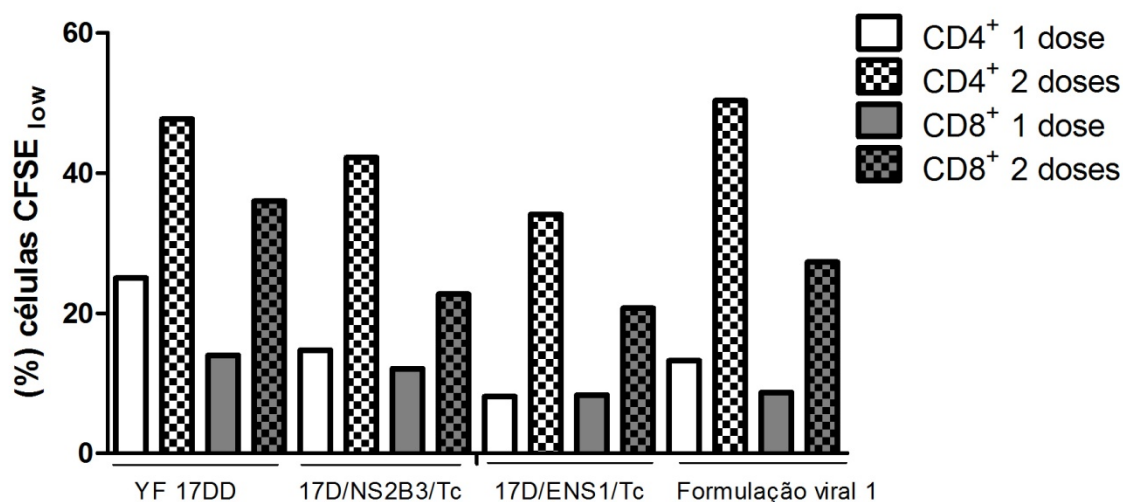


Figura 4.33 – Porcentagens de células CFSE<sub>low</sub> responsivas ao Vírus da Febre Amarela vacinal. Os gráficos mostram resposta celular T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> após uma ou duas doses com o vírus YF 17DD, 17D recombinantes ou Formulação Viral 1.

Resumidamente, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que apesar dos vírus recombinantes de FA terem se mostrado imunogênicos e capazes de aumentar o tempo médio de sobrevivência de camundongos desafiados por *T. cruzi*, o uso destes foi mais eficaz quando combinados em formulações virais, apresentando antígenos de ASP-2, os quais são expressos em diferentes compartimentos celulares – citoplasma e RE e possivelmente se complementam. Essas características podem ter contribuído para um maior grau de proteção, conforme avaliado em ensaios de desafio com camundongos A/J.

Para resumir os resultados apresentados nesta tese, demonstramos na tabela 4.14 uma análise comparativa das imunizações realizadas e seus respectivos percentuais de proteção após desafio pelo *T. cruzi*, enquanto que os parâmetros de imunogenicidade induzidos pelos vírus recombinantes 17D e Formulação 1 avaliados neste trabalho para o Vírus da Febre Amarela e para *T. cruzi* estão descritos nas tabelas 4.15 e 4.16, respectivamente.



**Tabela 4.14** – Comparação do grau de proteção aferido pelos diferentes vírus YF 17D recombinantes adotados neste trabalho

<b>Imunizações consecutivas</b>		
<b>Vírus recombinantes</b>		<b>Proteção (60 dpi)</b>
<b>1 dose</b>	<b>2 doses</b>	
YF17D/E200/Tc	YF17D/E200/Tc	0%
YF17D/NS2B3/Tc	YF17D/NS2B3/Tc	8 – 13%
YF17D/ENS1/Tc	YF17D/ENS1/Tc	16%
YF17D/ENS1/Tc	YF17D/NS2B3/Tc	9%
<b>Imunizações simultâneas</b>		
<b>Formulações virais</b>		<b>Proteção (60 dpi)</b>
YF17D/NS2B3/Tc e YF17D/ENS1/Tc	50% cada	58%
YF17D/NS2B3/Tc e YF17D/ENS1/Tc	1:4, respectivamente	43%
YF17D/NS2B3/Tc e YF17D/E200/Tc	50% cada	0%

**Tabela 4.15** – Resumo dos parâmetros de imunogenicidade dos vírus recombinantes para o Vírus da Febre Amarela avaliados neste trabalho

	Anticorpos neutralizantes de FA (PRNT 50%)		Nº de células produtoras de IFN- $\gamma$ / 10 <sup>6</sup> esplenócitos (ELISPOT)		Linfoproliferação (% CFSE <sub>low</sub> )			
	1 dose	2 doses	1 dose	2 doses	CD4 <sup>+</sup>		CD8 <sup>+</sup>	
					1 dose	2 doses	1 dose	2 doses
<b>YF 17DD</b>	358	1007	55	180	25	48	14	36
<b>17D/E200/Tc</b>	41	124	ND	52	ND	ND	ND	ND
<b>17D/NS2B3/Tc</b>	90	277	40	160	15	42	12	23
<b>17D/ENS1/Tc</b>	ND	69	21	206	8	34	8	21
<b>Formulação 1</b>	ND	51	41	166	13	50	9	27

ND, não determinado

**Tabela 4.16** – Resumo dos parâmetros de imunogenicidade dos vírus recombinantes para *T. cruzi* avaliados neste trabalho

	Nº de células produtoras de IFN- $\gamma$ / 10 <sup>6</sup> esplenócitos (ELISPOT)			Linfoproliferação (% CFSE <sub>low</sub> )	Proteção (%)	Parasitemia X 10 <sup>4</sup> / mL
	TEWETGQI			CD8 <sup>+</sup>	60 dpi	9 – 10 dpi
	1 dose	2 doses	Pós desafio	1 dose		
<b>YF 17DD / Mock</b>	4	7	105	0	0%	407
<b>17D/E200/Tc</b>	ND	57	1240	ND	0%	ND
<b>17D/NS2B3/Tc</b>	58	165	1091	12	8 – 13%	360
<b>17D/ENS1/Tc</b>	41	254	1689	1	16%	185
<b>Formulação 1</b>	104	255	1728	29	58%	138
<b>TEWETGQI / Adj</b>	ND	68	899	ND	0%	ND

ND, não determinado

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Imunidade protetora contra *T. cruzi* e relação com a imunidade induzida pela vacinação com 17D, escolha dos antígenos heterólogos

Na última década, vários antígenos do parasita intracelular *Trypanosoma cruzi* foram testados em ensaios de vacinação em camundongos. Estes estudos incluíram DNA plasmidial, proteínas recombinantes associadas com adjuvantes, além de bactérias ou vetores virais (Garg & Tarleton, 2002, Boscardin *et al.*, 2003; Araújo *et al.*, 2005; Cazorla *et al.*, 2008; Miyahira *et al.*, 2005; De Alencar *et al.*, 2009). No entanto, alguns destes foram somente associados à proteção quando em conjunto com adjuvantes Th 1 ou em regimes de dose-reforço que utilizava diferentes vetores (*prime-boost* heterólogo) (Hoft & Eickhoff, 2005; Hoft *et al.*, 2007; Vasconcelos *et al.*, 2003; De Alencar *et al.*, 2009). Além disso, a imunogenicidade da vacina de DNA ainda não está bem estabelecida no homem, e ainda, o uso de proteínas recombinantes ou vacinas de subunidades podem exigir o uso de formulações com adjuvantes certificados para uso humano (Vasconcelos *et al.*, 2003). Ensaios clínicos com novos candidatos virais recombinantes para malária, tuberculose ou AIDS mostraram bons níveis de imunidade celular em comparação com outras vacinas de subunidades ou de DNA. No caso, o vírus YF 17D possui algumas vantagens como vetor, que incluem a indução de imunogenicidade de longa-duração e a não-incorporação de material genético ao genoma do hospedeiro.

Vacinas que utilizaram antígenos de *T. cruzi* provenientes das formas extracelulares tripomastigotas (trans-sialidases), não mostraram a mesma magnitude de proteção, em camundongos altamente suscetíveis, quanto às realizadas com antígenos de amastigotas ASP-2 (Vasconcelos *et al.*, 2003; 2004). É possível que antígenos provenientes de formas intracelulares de amastigotas sejam melhores alvos de uma resposta imune protetora. Além disso, os ninhos de amastigotas estão criticamente envolvidos na patologia crônica de Chagas (Tarleton *et al.*, 2001).

Neste trabalho, decidimos por expressar um peptídeo e um fragmento imunogênico, ambos provenientes da proteína de superfície de amastigotas 2 (ASP-2) de *T. cruzi*, em três regiões distintas do genoma de YF17D, originando três vírus recombinantes. A escolha desta proteína baseou-se nos resultados sobre sua imunogenicidade, anteriormente descritos, para os antígenos expressos por amastigotas, formas intracelulares do parasita (Boscardin *et al.*, 2003; Araújo *et al.*, 2005; Silveira *et al.*, 2008). Tínhamos a intenção de avaliar se antígenos da

proteína ASP-2 de *T. cruzi* ao serem expressos em três estratégias diferentes - e que também envolviam a presença de um ou mais epítomos desta proteína - poderiam induzir resposta imunológica específica e se estas, em função do tipo e intensidade poderiam proteger camundongos vacinados frente ao desafio com formas tripomastigotas de *T. cruzi*, cepa Y. Esta foi a primeira descrição de vírus recombinantes YF17D expressando antígenos de *T. cruzi*.

A escolha do epítopo TEWETGQI de ASP-2 foi baseada na sua capacidade de indução de linfócitos T CD8<sup>+</sup> restritos ao MHC classe I (Araújo *et al.*, 2005). O epítopo TEWETGQI, extensivamente utilizado em nosso trabalho, foi caracterizado como um epítopo indutor de células T citotóxicas, imunodominante e demonstrou ser capaz de induzir células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  de forma mais robusta do que outros epítomos presentes em ASP-2 (Araújo *et al.*, 2005). Outros epítomos de ASP-2, reconhecidos por MHC classe I (H-2K<sup>d</sup>) foram testados em ensaios de ELISPOT após vacinação de camundongos BALB/c com plasmídeo de DNA contendo gene de ASP-2 (Boscardin *et al.*, 2003). Nenhum dos 14 peptídeos testados foi capaz de induzir produção de IFN- $\gamma$ . Em outro trabalho, utilizando camundongos A/Sn, de sete peptídeos MHC classe I testados, apenas TEWETGQI foi capaz de induzir um aumento nos níveis de IFN- $\gamma$  (Araújo *et al.*, 2005).

Durante o desenvolvimento do ciclo intracelular de *T. cruzi*, ASP-2, ancorada na membrana por âncoras de GPI, é naturalmente liberada pelo parasito no citoplasma da célula infectada entrando na via de processamento por MHC classe I (Low *et al.*, 1998). Células T CD8<sup>+</sup> específicas para amastigotas são capazes de lisar células não-fagocíticas infectadas por *T. cruzi* ou secretar potentes mediadores como IFN- $\gamma$ , auxiliando a eliminação de parasitas intracelulares como *T. cruzi* (Rodrigues *et al.*, 2003). Assim, a imunidade gerada pela imunização com a proteína ou de fragmentos peptídicos provenientes da ASP-2 mostrou-se associada com uma resposta tipo Th1, com produção de IFN- $\gamma$  por células T CD8<sup>+</sup> (Rodrigues *et al.*, 2003). Altos níveis de IFN- $\gamma$  têm sido associado à proteção de muitas infecções por agentes intracelulares parasitários e virais (Martin & Tarleton, 2004). A produção de IFN- $\gamma$  pelas células T CD8<sup>+</sup> é um dos mecanismos envolvidos na resposta imune contra *T. cruzi*, atuando na célula infectada do hospedeiro ativando mecanismos de indução de óxido nítrico/sintase (iNOS) (Hoft & Eickhoff, 2005). Além disso, as células T CD8<sup>+</sup> ativadas podem possuir atividade citolítica através de granzimas ou perforinas, com a habilidade de formar poros na membrana do parasita (Nickell & Sharma, 2000).

Sabemos que o vírus YF 17D apresenta como propriedades imunológicas a capacidade de gerar resposta celular Th1, induzindo linfócitos T citotóxicos específicos e uma produção

precoce de IFN- $\gamma$  após vacinação (Querec *et al.*, 2006; Franco *et al.*, 2010). Nesse sentido, buscamos avaliar se as vacinações com os vírus YF 17D recombinantes seriam capazes de induzir resposta celular, através da produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD8<sup>+</sup>, estimulados *in vitro* com epítipo de ASP-2, TEWETGQI, o que será melhor discutido adiante.

## 5.2 Influência do local genômico de expressão

A primeira abordagem de expressão do epítipo TEWETGQI deu-se na proteína de Envelope viral, originando o vírus YF17D/E200/Tc. A escolha do sítio de inserção na alça *fg* da proteína E do vírus YF 17D foi baseada em metodologia previamente estabelecida por nosso grupo de pesquisa, na qual uma “deleção” natural de seis aminoácidos na alça *fg* de YFV, JEV e DENV2 em relação a esta região do TBE tornou possível à acomodação de insertos nesta região (Bonaldo *et al.*, 2002, 2006). No entanto, a viabilidade do vírus recombinante YF17D/E200/Tc está também relacionada a determinadas características do epítipo TEWETGQI, o qual segue alguns critérios físico-químicos importantes, que foram previamente estabelecidos por nosso grupo (Bonaldo *et al.*, 2002 ; Bonaldo, MC comunicação pessoal). Uma das características diz respeito ao tamanho do inserto, que deve ser preferencialmente em torno 50 pb ou 15 aminoácidos. O epítipo TEWETGQI é de 8 resíduos de aminoácidos ou uma seqüência codante de 24 pb.

Outro fator seria a hidrofobicidade da alça *fg*, pois esta se encontra na superfície da proteína E exposta ao meio. Assim, a alça *fg* recombinante deve ser hidrofílica, mas de modo a conter certo grau de hidrofobicidade para sua estabilidade, isto é, não mais que 30% de resíduos hidrofóbicos, intercalados na sua seqüência. O epítipo TEWETGQI é de caráter hidrofílico e contém também resíduos hidrofóbicos (Ile e Trp) que contribuem para a estabilidade da alça. Isto permite, potencialmente, que esta alça recombinante seja expressa na superfície da partícula viral.

O peptídeo TEWETGQI, expresso na alça *fg*, deve encontrar-se exposto na superfície da partícula viral, conforme demonstrado previamente para outro epítipo parasitário (Bonaldo *et al.*, 2002). A partícula viral infectiva do vírus da febre amarela contém na sua superfície cerca de 180 monômeros de proteína E, o mesmo número que se espera do epítipo TEWETGQI. Este epítipo recombinante presente na superfície do vírion estaria exposto no meio extracelular e após infecção celular estaria associado a novas moléculas de monômeros de proteína E, sintetizados na célula infectada. Após a tradução e o processamento da poliproteína do vírus da FA, a proteína E é translocada ao lúmen do RE, permanecendo

ancorada na membrana desta organela até o empacotamento do RNA recém-sintetizado e a montagem do vírus imaturo que vai ser transportado pela via secretora ao aparato de Golgi e secretado para o meio extracelular por exocitose.

A proteína E do vírus de FA é a principal proteína indutora de anticorpos neutralizantes e tem um papel central no mecanismo de imunidade protetora gerada pela vacina (Heinz *et al.*, 1986; Monath *et al.*, 2007). De fato, demonstrou-se que a imunização de camundongos com vírus FA recombinante que expressava neste sítio de inserção um epítipo humoral imunodominante da proteína CS de *P. falciparum*, o epítipo (NANP)<sub>3</sub> foi capaz de induzir anticorpos específicos a este mesmo epítipo (Bonaldo *et al.*, 2002). Entretanto, alguns estudos demonstraram um importante papel da proteína E do vírus da FA na indução também de resposta celular em humanos e em camundongos (Co *et al.*, 2002; Akondy *et al.*, 2009; Maciel *et al.*, 2008). Foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa que a imunização de camundongos com vírus FA recombinante expressando inserto imunodominante, SYVPSAEQI, da proteína CS de *P. yoelli* seguido de uma dose do vírus vaccínia recombinante para a mesma proteína promoveu proteção estéril em cerca de 70% dos animais vacinados frente ao desafio com esporozoítas de *P. yoelli*, o que foi relacionado à indução de linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos ao epítipo heterólogo SYVPSAEQI (R. Nussenzweig e M. Bonaldo, resultados não publicados).

De fato, já se sabia que a proteína E é um dos alvos preferenciais na indução de resposta celular T contra o vírus da dengue (Rothman *et al.*, 1996) e outros flavivírus (Hill *et al.*, 1992). Alguns epítipos T CD8<sup>+</sup> puderam ser inicialmente mapeados na proteína E do vírus da FA utilizando diferentes protocolos de imunização em camundongos experimentais (Van der Most *et al.*, 2002) e em vacinados humanos (Co *et al.*, 2002). É provável que ocorra o processamento de epítipos da proteína E via MHC classe I através de fagocitose de vírions maduros liberados no meio extracelular ou pela ingestão de células infectadas pelas DC's, que apresentam epítipos virais às células T CD8<sup>+</sup> virgens de forma cruzada (*cross-presentation*).

Além de induzir células T CD8<sup>+</sup>, a proteína E alberga também epítipos capazes de induzir células T CD4<sup>+</sup> em ensaios experimentais com camundongos (Maciel *et al.*, 2008), demonstrando que esta proteína é capaz de induzir uma resposta imune tanto via MHC classe I quanto classe II. No entanto, estes autores demonstraram que os epítipos T CD8<sup>+</sup>, presentes na proteína E foram capazes de induzir uma maior produção de IFN- $\gamma$  por estas células do que os epítipos imunogênicos T CD4<sup>+</sup>, embora estes epítipos possam estar presentes em um repertório mais vasto. Em um estudo recente, Akondy e equipe (2009) caracterizaram a indução de células T CD8<sup>+</sup> em indivíduos vacinados ao utilizar um conjunto de peptídeos

contendo toda a poliproteína viral, tendo sido verificado que mais de 10% das células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  provenientes dos indivíduos vacinados eram específicas a epítomos da proteína E. Por sua vez, Mudd e equipe (2010), verificaram que a resposta de T CD8<sup>+</sup> de maior magnitude em macacos *rhesus* vacinados com YF 17D correlacionou-se a peptídeos presentes no ectodomínio da proteína E.

Este conjunto de trabalhos aponta para o fato de que a expressão de epítomos na proteína E pode levar à ativação de células T CD8<sup>+</sup>.

A segunda metodologia de expressão consistiu na expressão do epítomo TEWETGQI na região intergênica da protease viral NS2B/NS3, que gerou o vírus YF17D/NS2B3/Tc. Esta abordagem tinha sido anteriormente empregada para a obtenção de vírus viáveis que expressavam corretamente epítomos heterólogos curtos, no contexto das moléculas de MHC classe I (McAllister *et al.*, 2000; Barba-Spaeth *et al.*, 2005; Tao *et al.*, 2005). De uma maneira geral, estes trabalhos caracterizaram a ativação de células T CD8<sup>+</sup> específicas a epítomos clonados na região NS2B/NS3. McAllister e equipe (2000) confirmaram que a apresentação do epítomo heterólogo, clonado no vírus recombinante, ocorria via MHC classe I e que em um modelo de desafio, a imunização com vírus recombinante YF 17D expressando proteína de melanoma entre NS2B/NS3 foi capaz de proteger 100% camundongos de uma dose letal de células tumorais que levaria ao crescimento de um tumor local ou à morte. No caso do epítomo de proteína de circunsporozoíta (CS) de *Plasmodium yoelii* (SYVSAEQI), clonado na mesma região do genoma de YF17D, a imunização foi capaz de inibir cerca de 67% de parasitas no fígado após o desafio com esporozoítas (Tao *et al.*, 2005).

Assim, substanciado por estes resultados prévios, utilizamos esta mesma metodologia de clonagem, que mais refletiria a via de indução natural da resposta imune do hospedeiro vertebrado à proteína ASP-2 de amastigotas intracelulares para a expressão de epítomo TEWETGQI de *T. cruzi*, indutor de linfócito T CD8<sup>+</sup>. O vírus recombinante construído neste trabalho, YF17D/NS2B3/Tc tem o peptídeo SP/TEWETGQI/GARR liberado no citosol devido à dupla clivagem pela protease viral. Nós podemos dizer que os resíduos (SP e GARR), que flanqueiam o epítomo TEWETGQI, não interferem no reconhecimento pelo MHC de classe I murino de H2-K<sup>k</sup>, pois uma predição com base em algoritmos (ver Resultados, Tabela 4.6) mostrou que a força de ligação de determinados resíduos do epítomo TEWETGQI (Glu e Ile) ao MHC classe I é que determina a alta afinidade e reconhecimento deste epítomo pelo haplótipo H2-K<sup>k</sup>.

A terceira estratégia consistiu da construção de um cassete heterólogo expressando um fragmento proteico e imunogênico, maior, de 120 aminoácidos da proteína ASP-2

(compreendido entre os aminoácidos 261 e 380). A escolha deste fragmento (ASP-2<sub>261-380</sub>) foi substanciada por estudos anteriores que mapearam determinantes protetores em ASP-2, através da expressão e purificação de diferentes domínios proteicos em *E. coli*, usados em imunizações de camundongos altamente suscetíveis. Os dados obtidos revelaram que fragmentos compreendendo os terminais amino ou carboxi de ASP-2 não foram capazes de induzir uma resposta protetora em camundongos desafiados com *T. cruzi*, enquanto que o fragmento de 120 aminoácidos (ASP-2<sub>261-380</sub>) mostrou-se promissor, protegendo 100% dos camundongos infectados, com redução significativa da parasitemia, o que se correlacionou com o número de células produtoras de IFN- $\gamma$  específicas ao epítipo TEWETGQI, epítipo presente em ASP-2<sub>261-380</sub> (Araújo *et al.*, 2005). Devido a estas boas características imunogênicas, este fragmento de ASP-2 foi escolhido para a clonagem e expressão no genoma do vírus FA.

Apesar dos vírus recombinantes que expressam TEWETGQI na alça da proteína E e na região NS2B/NS3 terem sido imunogênicos e estáveis geneticamente, decidimos por obter um vírus recombinante que expressasse o fragmento imunogênico de 120 aminoácidos de ASP-2, pois a clonagem de insertos maiores teriam um potencial de aumentar a imunogenicidade viral, devido à provável presença de outros determinantes antigênicos neste mesmo fragmento, conforme foi pressuposto por De Alencar e equipe (2007). Além disso, a clonagem e expressão deste fragmento no envelope viral ou entre NS2B e NS3 não produziria vírus viáveis devido ao grande tamanho da inserção, que teria um efeito negativo na estrutura da proteína E ou afastaria as duas proteínas componentes do complexo proteolítico viral, não permitindo assim o correto enovelamento de NS2B e NS3 nestas regiões. Foi visto que a atividade de protease do complexo proteolítico requer a presença de ambas as proteínas NS2B e NS3 (Falgout *et al.*, 1991) em uma conformação estrutural, dependente de uma associação não-covalente de NS3pro (domínio de protease de NS3) com um domínio central de 47 aminoácidos de NS2B (Erbel *et al.*, 2006).

Como a região entre a proteína estrutural E e a não-estrutural NS1 representa uma mudança funcional no genoma dos Flavivírus, inserções maiores, nesta localização, podem induzir uma menor perturbação no ciclo viral do que em outros sítios. Em nossa equipe, esta mesma região serviu de plataforma para gerar constructos de YF17D que expressavam a proteína autofluorescente GFP (Bonaldo *et al.*, 2007) e um segmento de SIV-Gag (Bonaldo *et al.*, 2010). Assim, a sequência heteróloga correspondente aos 120 resíduos de aminoácidos da proteína ASP-2 foi inserida e expressa na região intergênica entre a proteína E e a proteína não-estrutural NS1, originando o vírus YF17D/ENS1/Tc.



O desenho do cassete de expressão ASP-2<sub>261-380</sub> em E/NS1 consistiu na duplicação da região de HA (haste-âncora completa) com sequências oriundas do vírus da Dengue 4, a qual possui 58% de homologia nucleotídica com a HA do vírus da Febre Amarela. Isto foi realizado com o objetivo de favorecer a estabilidade genética do vírus recombinante, visto que quanto menor a homologia destas sequências, menor a possibilidade de se obter cópias de RNA defeituosas durante a replicação viral (Bonaldo *et al.*, 2007). Um outro aspecto importante foi a de que a presença do epítipo TEWETGQI no fragmento ASP-2<sub>261-380</sub> permitiu que pudéssemos avaliar comparativamente a capacidade de indução de células T específicas ao epítipo TEWETGQI nos três vírus.

Os três vírus recombinantes para antígenos de ASP-2 de *T. cruzi* foram caracterizados quanto à sua capacidade de expressão do epítipo ou fragmento heterólogo, crescimento em cultura de células e atenuação *in vivo*, bem como a sua capacidade imunogênica em induzir tanto resposta humoral quanto celular direcionada ao vetor vacinal e ao peptídeo-específico de *T. cruzi*. Com as diferentes construções, pudemos avaliar diferencialmente formulações mais relacionadas à proteção imune em um modelo murino suscetível para infecção por *T. cruzi*.

### 5.3 Caracterização dos vírus 17D recombinantes

Os vírus recombinantes para o epítipo TEWETGQI apresentaram boas taxas de proliferação em células Vero quando comparados com o controle vacinal YF 17DD e se mostraram geneticamente estáveis em relação à manutenção da sequência codante do motivo TEWETGQI, pelo menos até a oitava passagem seriada em células Vero. Estas características apontam para uma boa viabilidade dos vírus recombinantes, apesar de inserções heterólogas serem pouco suportadas pelo genoma viral (Li *et al.*, 2007; revisado em Liniger *et al.*, 2007). No entanto, as inserções claramente afetaram a morfologia da placa viral em células Vero, produzindo placas menores, quando comparada com o fenótipo de placa de YF 17DD, o que foi relatado também por outros trabalhos (Bonaldo *et al.*, 2002; Franco *et al.*, 2010). A morfologia de placa produzida pelo vírus parental YF17D/E200T3, cujo arcabouço é mais similar ao dos vírus recombinantes, também produz placas menores do que o vacinal, embora ligeiramente maiores do que as placas dos vírus recombinantes (dados não mostrados).

Quanto ao vírus recombinante para o fragmento de ASP-2 (ASP-2<sub>261-380</sub>), YF17D/ENS1/Tc, este mostrou-se também viável e apresentou características de proliferação em células Vero comparáveis com o vacinal YF 17DD, ainda que a diferença entre estes tenha sido de cerca de dez vezes menor que o vacinal no ponto máximo de crescimento do vírus

recombinante. Esta mesma diferença também se pronunciou para outros vírus recombinantes obtidos (Bonaldo *et al.*, 2007; Bonaldo, MC, comunicação pessoal). Quanto à estabilidade genética viral, o inserto foi mantido íntegro sem deleções até a sexta passagem seriada, o que seria indicado por uma alteração no tamanho do fragmento de DNA (inferior a 1.681 pb) ou perda deste (banda equivalente a 1.000 pb, Figura 4.23, seção Resultados). Este resultado é compatível com o potencial desenvolvimento desta construção para fins industriais, visto que é possível desenvolver lotes-sementes vacinais, a partir de cDNA geneticamente estável na quarta passagem seriada (Marchevsky *et al.*, 1995).

Outras construções na região E/NS1 foram descritas, como por exemplo, a expressão de um precursor de glicoproteína de Lassa vírus, descrita por Bredenbeek e equipe (2006), porém esta construção foi desenhada para conter apenas a sequência duplicada correspondente ao domínio da TM2 do gene E, servindo como sequência-sinal para NS1, o que provavelmente gerou um processamento de sua poliproteína alterado e consequentemente, uma baixa replicação viral *in vivo*. Apesar disso, é possível obter constructos contendo apenas uma parte da HA (formas truncadas), com a eliminação das regiões H1 e CS (Bonaldo *et al.*, 2010), ou contendo sequências provenientes de vírus relacionados, como a região transmembrana (E2) de Sindbis vírus, que foi duplicada após região correspondente ao inserto de SIV-Gag p24 (Franco *et al.*, 2010). No entanto, este último demonstrou ter uma replicação mais lenta em células Vero, além de ser instável após quatro passagens seriadas.

Foi possível caracterizar a expressão do epítipo TEWETGQI de *T. cruzi* pelos vírus YF17D/E200/Tc e YF17D/NS2B3/Tc através de ensaios de imunofluorescência indireta, embora o padrão de detecção tenha diferido muito provavelmente devido aos sítios em que a proteína E e as proteínas NS2B e NS3 são expressas durante a infecção viral (Mackenzie, 2005). A expressão do epítipo de ASP-2 na proteína E viral revelou um padrão de detecção na região perinuclear e ao longo de organelas tubulares, condizente com a importação da proteína E durante a tradução viral para o lúmen do retículo endoplasmático e a sua exocitose, na partícula viral, para o meio extracelular (Chambers *et al.*, 1990). Por outro lado, o vírus YF17D/NS2B3/Tc é capaz de expressar o epítipo TEWETGQI em uma marcação pontual, vesicular, dispersa por todo o citoplasma. Sabe-se que a replicação viral dos flavivírus ocorre em um complexo de vesículas compartimentalizadas (RC ou do inglês *Replication Complex*) que tanto podem estar individualizadas no citoplasma ou associadas a outras vesículas por ligações de membrana (Mackenzie *et al.*, 2005; Gillespie *et al.*, 2010). O complexo de protease viral (proteína não-estrutural NS3 e o seu co-fator NS2B) localiza-se principalmente nas estruturas vesiculares relacionadas à tradução e processamento proteolítico, que são as

vesículas CM (*convoluted membranes*) e PC (*paracrystalline arrays*), para onde o RNA migra após replicação em VP (*vesicle packets*) (Gillespie *et al.*, 2010). A formação de vesículas e a compartimentalização da replicação viral está associada a um mecanismo evolutivo de proteção viral à resposta imune do hospedeiro. A visualização de “pontos” marcados por anti-TEWETGQI em YF17D/NS2B3/Tc sugere, possivelmente, que o epítipo esteja sendo liberado por NS2B/NS3 em vesículas próprias (CM/PC) onde ocorre a tradução e o processamento proteolítico por esta protease viral. No entanto, ensaios de imunolocalização serão necessários para confirmar a associação da protease viral bem como do epítipo heterólogo com as vesículas replicativas formadas durante a infecção viral.

Nós mostramos também que a infecção viral em células Vero pelo vírus YF17D/NS1/Tc promoveu a expressão de epítipo específico TEWETGQI em ASP-2<sub>261-380</sub>. A localização aparentou estar restrita à região perinuclear, sugerindo sua retenção no RE. A expressão de GFP, clonada em um cassete similar entre E e NS1, demonstrou estar associada também ao RE (Bonaldo *et al.*, 2007). De fato, estudos mostraram que a região transmembrana TM1, tanto do vírus da FA (Op de Beeck *et al.*, 2004) quanto de JEV e DENV2 (Hsieh *et al.*, 2008) possuem sinais específicos de retenção da proteína E ao RE. Dessa forma, é esperado que a proteína exógena clonada adjacente à região completa de HA, localizada no C-terminal da proteína E, permaneça ancorada à membrana do RE voltada para o lúmen do RE.

Além disso, recentemente, um motivo de dois aminoácidos, presentes nas posições 10 e 11 do N-terminal de NS1 (imediatamente após a sequência-sinal de clivagem) podem promover a associação desta proteína, em maior intensidade, à superfície celular, como no caso do motivo presente em WNV ou preferencialmente sua secreção da célula infectada, como em DENV (Youn *et al.*, 2010). Não se sabe se a região N-terminal de NS1 de YFV promove a saída de NS1 do RE ou se, ainda, haveriam outros motivos em NS1 envolvidos mas de qualquer maneira, o motivo associado ao N-terminal do cassete heterólogo é uma versão truncada deste motivo, a qual compreende os resíduos de 1 a 9, não contendo a extensão completa em relação ao trecho mapeado em WNV e DENV. Desse modo, isto poderia comprometer a funcionalidade de uma possível sequência de secreção e/ou associação à superfície celular. Em nossa abordagem, é possível que tenhamos que efetuar alguma alteração no cassete E/NS1 de expressão para o direcionamento de proteínas heterólogas para outros compartimentos celulares.

No entanto, concluímos após este tipo de análise que todas as estratégias de expressão de antígenos de ASP-2 de *T. cruzi* foram eficazes, permitindo a detecção da expressão pelos vírus YF17D/E200/Tc, YF17D/NS2B3/Tc e YF17D/NS1/Tc.

#### 5.4 Atenuação dos vírus recombinantes

Apesar de não existir uma clara correlação entre neurovirulência em camundongo e virulência e atenuação do vírus em humanos (Marchevsky *et al.*, 2003), é importante demonstrar que pelo menos os vírus recombinantes expressando o epítipo TEWETGQI foram menos virulentos em camundongos Suíços, após um inóculo intracerebral, do que o vírus da vacina contra febre amarela YF 17DD, que em geral leva à morte da quase totalidade dos camundongos inoculados. Em nossos resultados, cerca de um terço dos animais morreram após a inoculação com YF17D/NS2B3/Tc e ainda menos animais morreram com o inóculo de YF17D/E200/Tc. Este resultado demonstra uma maior atenuação viral de YF17D/E200/Tc em relação a YF17D/NS2B3/Tc, possivelmente devido ao fato de que a inserção deste epítipo na proteína E viral causa um efeito mais deletéreo na viabilidade viral. A atenuação de vírus albergando epítipo na alça *fg*, como é o caso do recombinante YF17D/E200/Tc foi previamente demonstrada em outros trabalhos da nossa equipe (Bonaldo *et al.*, 2002, 2005, 2006).

A alça *fg* está localizada no Domínio II da estrutura em 3D da proteína E, este domínio sofre uma transição em baixo pH, expondo um segmento de aminoácidos hidrofóbicos que está envolvido com a fusão do envelope viral ao endossoma. Essa transição envolve um rearranjo dos dímeros da proteína E em trímeros, resultando em uma nova formação espacial dos três domínios de E (Allison *et al.*, 1995; Stiasny *et al.*, 1996). Acredita-se que a inserção de epítipo na região da alça *fg* possa perturbar a associação dos trímeros da proteína E durante a mudança conformacional que ocorre no processo de fusão das membranas do vírus com a do endossoma, resultando em uma taxa de fusão de membranas mais lenta e no retardo da produção viral, o que poderia ocasionar uma infecção mais branda e um fenótipo viral mais atenuado no organismo infectado (Bonaldo *et al.*, 2005). Não realizamos teste de neurovirulência com o vírus YF17D/NS1/Tc, mas dados obtidos por nosso grupo de pesquisa com um vírus que expressa a proteína GFP, obtido por estratégia semelhante de inserção na região intergenica E/NS1, mostrou que este vírus não é letal ao ser inoculado intracerebralmente em camundongos.

Uma maior atenuação viral devido à perda da viabilidade viral comparativamente ao vírus controle vacinal (sub-cepa YF 17DD) indicaria então uma menor capacidade de propagação no hospedeiro, ou seja, uma menor expansão de massa antigênica viral. Isto pôde ser constatado quando camundongos A/J foram imunizados com os três vírus recombinantes e o controle vacinal YF 17DD. A imunização com os vírus recombinantes YF17D/E200/Tc,

YF17D/NS2B3/Tc ou YF17D/NS1/Tc foi capaz de induzir títulos de anticorpos neutralizantes para o vírus FA, porém estes títulos foram inferiores aos obtidos pela imunização com o vírus vacinal YF 17DD.

### 5.5 Imunogenicidade dos vírus 17D recombinantes

Com o objetivo de demonstrarmos a utilidade do vírus 17D como vetor de expressão para o desenvolvimento de novas vacinas e obter dados sobre mecanismos de imunidade e proteção, optamos por utilizar uma linhagem de camundongos altamente suscetível a uma infecção letal por *T. cruzi*, denominado A/J (H2-K<sup>k</sup>). Além do epítipo TEWETGQI ser imunodominante para camundongos deste haplótipo, há ainda outro fator que favorece o uso desta linhagem em nossos estudos. A maioria dos estudos de vacinação para Chagas descrevem o uso de camundongos C57BL/6 e BALB/c, no entanto, estas linhagens não são tão suscetíveis à infecção por *T. cruzi* como os camundongos da linhagem do tipo A (A/Sn ou A/J), cuja infecção pelo parasito leva à mortalidade de 100% após um desafio com baixo número (Vasconcelos *et al.*, 2004). Assim, essa linhagem se torna um modelo de estudo imunológico interessante para se avaliar níveis de proteção fornecidos por diferentes composições vacinais contra *T. cruzi*. Não se sabe exatamente o que causa a susceptibilidade dos camundongos A/J ou A/Sn, no entanto, os achados de Graefe e equipe (2003) indicaram que, na linhagem A/J, a presença de alelos recessivos poderiam ser responsáveis pela susceptibilidade murina ao *T. cruzi*, ou então, que a susceptibilidade ao parasito poderia depender da ação conjunta de múltiplos genes. Além disso, sabe-se que a susceptibilidade desta linhagem não está ligada ao MHC, visto que a linhagem B10.A (H2-K<sup>k</sup>) é resistente à infecção por *T. cruzi*. Foi determinado que os animais A/J são capazes de apresentar uma elevação nos níveis de IL-4 e IL-5 (resposta tipo 2 - Th2), em consequência, apresentam baixos níveis de IFN- $\gamma$ , o que pode causar a morte destes animais durante o curso natural de uma infecção pelo parasito (Liew *et al.*, 1991).

Como não haviam dados prévios, inicialmente determinamos o grau de susceptibilidade de A/J para o vírus da Febre Amarela YF 17DD e verificamos que a imunização subcutânea com este vírus protegeu os camundongos desta mesma linhagem contra um desafio intracerebral induzido pelo próprio YF 17DD. Altos títulos de anticorpos neutralizantes contra YF 17DD foram gerados pela imunização destes animais, assim como descrito para os camundongos BALB/c (Bonaldo *et al.*, 2007).

### 5.5.1. Indução de anticorpos neutralizantes e de células produtoras de IFN- $\gamma$ (comparação entre os vírus)

Conforme foi discutido acima em relação à atenuação dos vírus recombinantes, a imunização de camundongos A/J com os vírus recombinantes foi capaz de induzir títulos menores de anticorpos neutralizantes do que a imunização com o vacinal YF 17DD, sendo que os títulos induzidos pelo vírus YF17D/ENS1/Tc foram ainda menores do que os obtidos para os outros vírus recombinantes (YF17D/NS2B3/Tc e YF17D/E200/Tc). Este dado é consistente com outra construção obtida pela nossa equipe (Bonaldo *et al.*, 2007), indicando que o vírus recombinante na região E e NS1 pode apresentar uma replicação mais limitada quando comparada à do vírus YF 17DD *in vivo*. Esta propriedade pode estar correlacionada com a capacidade reduzida de proliferação em células Vero, antes observada nesse estudo.

Entretanto, os baixos títulos de anticorpos neutralizantes para Febre Amarela, induzidos pelas imunizações com os vírus recombinantes pouco se correlacionam com o número de células produtoras de IFN- $\gamma$  induzidas pelo vírus YF 17DD como antígeno *in vitro*, sendo que não há diferenças entre o vírus vacinal e os grupos de vírus recombinantes, tampouco há diferenças significativas entre os vírus recombinantes (Tabela 4.15, seção Resultados). Já quando analisamos a resposta celular induzida pelo peptídeo-específico TEWETGQI, vemos que todos os vírus recombinantes são capazes de induzir um número de células produtoras de IFN- $\gamma$  específicas similar ou até mesmo superior do que a vacinação com somente o peptídeo TEWETGQI (com adjuvante). No entanto, observamos algumas diferenças entre os grupos de vírus recombinantes quanto à indução no número de células responsivas ao epítipo-específico TEWETGQI logo após uma imunização. Após duas imunizações, entretanto, os grupos quase não diferem entre si, com exceção de YF17D/E200/Tc (Tabela 4.16, seção Resultados).

O número de esplenócitos produtores de IFN- $\gamma$  induzidos pela vacinação por YF17D/E200/Tc foi menor do que o induzido pelo vírus YF17D/NS2B3/Tc ou YF17D/ENS1/Tc, tanto para o antígeno vacinal quanto para o epítipo TEWETGQI. Estes resultados podem ser um reflexo da capacidade reduzida de replicação *in vivo* do vírus mais atenuado, YF17D/E200/Tc, embora as eventuais células de memória induzidas pela vacinação com este vírus recombinante tenham sido suficientes para gerar um número significativo de células produtoras de IFN- $\gamma$  após o desafio com *T. cruzi*.

De uma maneira geral, em relação à vacinação dos camundongos A/J com um dos vírus recombinantes que expressam TEWETGQI (YF17D/E200/Tc ou YF17D/NS2B3/Tc), os nossos resultados mostraram que estes vírus puderam induzir uma média que variou entre 50

a 150 células produtoras de IFN- $\gamma$  por 10<sup>6</sup> esplenócitos, quando estimuladas *in vitro* com o mesmo peptídeo. Este resultado está de acordo com a literatura, em que a imunização de A/Sn com o peptídeo GST-TEWETGQI induziu 150 células produtoras de IFN- $\gamma$  por 10<sup>6</sup> esplenócitos (De Alencar *et al.*, 2007). Estes números estão de acordo também com os níveis de IFN- $\gamma$  induzidos pelo vírus da FA em indivíduos vacinados (Santos *et al.*, 2008). Em macacos *Rhesus*, um número significativo de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  puderam ser precocemente detectadas 5 a 7 dias após vacinação com YF 17D, ao contrário da vacinação com adenovírus recombinante (rAd5) (Neves *et al.*, 2010).

Já a vacinação com o vírus recombinante expressando o fragmento de ASP-2<sub>261-380</sub> (YF17D/ENS1/Tc) foi capaz de induzir em torno de 250 células produtoras de IFN- $\gamma$  após a segunda dose, acima dos valores obtidos para ambos os vírus expressando TEWETGQI. Comparativamente ao vírus que consideramos mais atenuado, YF17D/E200/Tc, o vírus YF17D/ENS1/Tc foi capaz de induzir um número maior de células responsivas após a segunda dose. Dessa forma, dentre os dois vírus que são atenuados, o vírus YF17D/ENS1/Tc parece ser mais eficiente em gerar uma resposta celular específica pré-desafio do que YF17D/E200/Tc (Tabela 4.16, seção Resultados). No entanto, estudos que determinem a massa antigênica e a viremia *in vivo* poderiam de fato relacionar a atenuação com a imunogenicidade dos vírus. Foi visto que macacos *Rhesus* vacinados com YF 17D são capazes de apresentar resposta celular T ainda que a viremia detectável seja baixa ou ausente (Mudd *et al.*, 2010).

#### 5.5.2. Expansão das células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ e a relação com proteção

Buscamos avaliar se os vírus poderiam ser capazes de induzir a expansão de células T CD8<sup>+</sup> TEWETGQI-específicas após um desafio com tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* e de montar uma resposta imune que favorecesse o aumento da sobrevivência de camundongos altamente suscetíveis. A cinética de uma resposta imune T CD8<sup>+</sup> após uma infecção ou vacinação compreende três etapas distintas: 1) a fase de expansão após o encontro com o antígeno específico e 2) uma fase de contração, em que a resposta antígeno-específica por célula T decai em número. Esta fase não necessariamente implica em reversão das células T CD8<sup>+</sup> primadas pelo antígeno ao nível basal, pois uma parte das células permanece estávelmente como células T de memória (revisado por Miyahira, 2007). A formação de células T de memória é um dos fatores mais importantes no desenvolvimento de uma vacina

efetora, já que a manutenção de um bom número destas implica em uma resposta de reativação mais rápida e mais efetiva para eliminar o patógeno recorrente. Assim, é esperado que após um desafio com o próprio patógeno, células T de memória-específicas sejam expandidas mais rapidamente e produzam em maior quantidade IFN- $\gamma$ . Os nossos resultados mostraram que o desafio é capaz de induzir um aumento significativo que varia de 10 a até 20 vezes mais células produtoras de IFN- $\gamma$ , dependendo do vírus. Este efeito pós-desafio nos níveis de células produtoras de IFN- $\gamma$  foi também observado por outros ensaios que empregaram um desafio com *T. cruzi* ou *Plasmodium yoelii* (Tzelepis *et al.*, 2006; de Alencar *et al.*, 2007; Tao *et al.*, 2005).

Estudos anteriores mostraram que a secreção de IFN- $\gamma$  por células T CD8<sup>+</sup> foi particularmente importante para a sobrevivência, 14 dias após a infecção pelo *T. cruzi*, de camundongos da linhagem de BALB/c e C57BL/6 (Tzelepis *et al.*, 2006). Os níveis observados de proteção, induzidos por ambos os recombinantes pode estar relacionado com a expansão da produção de IFN- $\gamma$  pelas células T CD8<sup>+</sup>, como demonstrado por ELISPOT no 15º dia após o desafio. Consideramos este resultado importante, pois sabemos que qualquer atraso na expansão de células TCD8<sup>+</sup> (e da produção de IFN- $\gamma$ ) representa um fator importante na evolução da infecção de *T. cruzi* em camundongos e na doença de Chagas no homem (Martin *et al.*, 2006; Tzelepis *et al.*, 2006, 2007). Verificamos também que o período entre 14 e 23 dpi é igualmente crítico para a sobrevivência de camundongos A/J, já que quase todos os animais não-vacinados (Mock) e infectados morreram até 23 dpi, ao contrário dos vacinados com os vírus recombinantes YF17D/E200/Tc, YF17D/NS2B3/Tc ou YF17D/ENS1/Tc .

Em relação à imunização com os dois vírus que expressavam TEWETGQI, YF17D/E200/Tc, YF17D/NS2B3/Tc, a resposta imunológica gerada pela imunização com estes vírus controlam uma infecção inicial pelo *T. cruzi*, levando a uma posterior proteção, ainda que parcial, em contraste com o grupo Mock. Em outro trabalho, o mesmo nível de proteção foi também relatado em ensaio de imunização de camundongos A/J que receberam apenas o peptídeo (GST-TEWETGQI) (De Alencar *et al.*, 2007).

Uma primeira explicação para uma proteção incompleta pode estar relacionado ao fato de que a imunização com um único peptídeo pode não ser suficiente para proteger totalmente os camundongos contra o *T. cruzi* (De Alencar *et al.*, 2007), ainda que TEWETGQI seja capaz de induzir células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  (Araújo *et al.*, 2005). Um amplo repertório de epítomos, abrangendo uma maior representação da proteína ASP-2 faz-se necessária. Segundo, a presença de outros epítomos, possivelmente de T CD4<sup>+</sup> pode ser essencial na contribuição ao



reforço da resposta de células T CD8<sup>+</sup>, como observado para a doença de Chagas (De Alencar *et al.*, 2007) ou malária (Stoyanov *et al.*, 2010).

Quando imunizamos camundongos suscetíveis com YF17D/ENS1/Tc, verificamos que as taxas de sobrevida são apenas parciais (16 % de proteção) após um desafio com *T. cruzi* (60 dpi), ainda que o tempo médio de sobrevida tenha sido maior do que os grupos controles. Em contraste, este dado não se correlacionou com os níveis protetores (100 % de proteção) obtidos com a imunização deste mesmo trecho imunogênico de ASP-2 fusionado a GST (“*glutathione S-Transferase*”), acoplado a Hidróxido de Alumínio, e injetado com CpG ODN 1826, um agonista de receptor Toll tipo 9 (Araújo *et al.*, 2005). No entanto, como os próprios autores citam, é possível que a presença de CpG ODN 1826 tenha exacerbado a ativação de células T CD8<sup>+</sup> nestes camundongos A/J.

### 5.5.3. A escolha das formulações virais e a indução de proteção

Nesta etapa do trabalho, decidiu-se por testar diferentes formulações virais - inoculadas simultaneamente - para verificar se estas poderiam promover um maior grau de proteção aos camundongos A/J frente ao desafio por *T. cruzi*. Esta iniciativa teve primeiramente como base a baixa imunogenicidade do vírus YF17D/ENS1/Tc, talvez devido a sua atenuação *in vivo*, que pode ter se refletido na baixa indução de anticorpos neutralizantes contra FA e na proteção insuficiente. Outro aspecto levado em conta foi que a possível retenção do fragmento de ASP-2<sub>261-380</sub>, majoritariamente, no RE poderia restringir a apresentação via MHC I de antígenos presentes neste fragmento. E finalmente, levou-se em consideração que a expressão do epítipo TEWETGQI pelos outros vírus FA recombinantes está associada a outras vias de secreção ou localização celular (citoplasma) - o que poderia acarretar em diferentes modos de ativação da resposta imune via MHC I.

Em combinação com o vírus YF17D/ENS1/Tc, decidimos por utilizar o vírus YF17D/NS2B3/Tc, levando em consideração as seguintes propriedades: 1) a menor atenuação deste vírus, observada nos ensaios de proliferação celular, testes de neurovirulência e de indução de anticorpos neutralizantes ao vetor vacinal; 2) a indução de uma resposta celular T CD8<sup>+</sup> produtora de IFN- $\gamma$  mais robusta do que o vírus recombinante com a inserção na proteína E (YF17D/E200/Tc) e 3) a capacidade deste tipo de construção em apresentar epítipo em um contexto de MCH classe I, mimetizando a via de indução natural da resposta imune a antígenos do parasita intracelular. Como já se observou para outras doenças parasitárias, como em malária (Wang *et al.*, 2004), o uso combinado de antígenos parece ser

mais vantajoso no combate à infecção parasitária. Foi visto que é ainda mais promissora a combinação de antígenos provenientes de diferentes estágios do ciclo de vida do *T. cruzi* (Vasconcelos *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2006).

Os nossos resultados indicaram que o inóculo simultâneo de ambos os vírus YF 17D recombinantes (Formulação 1, 50/50 de cada vírus) induziu uma melhora na resposta imune protetora, a qual pareceu complementar, proporcionando uma resistência ao desafio por *T. cruzi* em quase 60% dos camundongos vacinados. Este mesmo nível de resposta não foi visto para inóculos consecutivos contendo os mesmos vírus, isoladamente. Além disso, a proteção fornecida pela formulação de igual porcentagem de dose para ambos os vírus YF17D/ENS1/Tc e YF17D/NS2B3/Tc foi maior quando comparada com a formulação em que a dose de YF17D/NS2B3/Tc representava apenas 25 % da formulação. Com isso, concluímos que a determinação de um valor mínimo de YF17D/NS2B3/Tc na formulação da dose é impactante para um resultado mais protetor. Seria interessante testar uma formulação na qual a porcentagem da dose do vírus YF17D/NS2B3/Tc fosse maior que a do vírus YF17D/ENS1/Tc para se avaliar se esta poderia promover uma maior proteção ao desafio com *T. cruzi*.

Quando analisamos a imunização simultânea com dois vírus recombinantes (YF17D/E200/Tc e YF17D/NS2B3/Tc), que somente expressam o epítipo TEWETGQI, ainda que em sítios diferentes do genoma de YF 17D, não conseguimos as mesmas taxas de proteção do que as obtidas para as formulações que combinam YF17D/ENS1/Tc e YF17D/NS2B3/Tc. Consequentemente, a proteção observada para a Formulação 1 pode ser resultado da expressão do epítipo TEWETGQI em diferentes compartimentos celulares – citoplasma e RE – associado à presença de antígenos distintos, presentes no fragmento de ASP-2, que se complementam. Estas características da formulação composta dos dois vírus FA recombinantes poderiam induzir a um maior número de células do sistema imunológico e fornecer uma resposta imune mais ampla e mais eficaz. Assim, a expressão de fragmentos de ASP-2 em outros sítios genômicos poderia promover a sua associação a outros compartimentos celulares, tais como o citoplasma, superfície celular ou até a sua secreção pela célula infectada, o que poderia levar a um aumento da proteção frente ao desafio com *T. cruzi*.

Um estudo prévio sugeriu que fragmentos peptídicos imunogênicos de ASP-2 possam estar mais relacionados à proteção imunológica por conterem epítopos T CD4<sup>+</sup> que auxiliem na ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória (De Alencar *et al.*, 2007). Neste sentido, a depleção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em camundongos vacinados com o fragmento recombinante de

ASP-2 levou à redução do número de células produtoras de IFN- $\gamma$  TEWETGQI-específicas em mais de dez vezes, em comparação com os animais que não sofreram depleção de células T CD4<sup>+</sup> (De Alencar *et al.*, 2007). Assim, nós especulamos que os epítomos T CD4<sup>+</sup> presentes no domínio recombinante de ASP-2, inserido no vírus YF17D/ENS1/Tc, possam ter auxiliado na indução de linfócitos protetores ou na expansão de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória, após a infecção por *T. cruzi*. É possível que associado a isto, a apresentação do peptídeo TEWETGQI, aos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, esteja sendo complementada pela expressão simultânea em dois sítios distintos do genoma de YF 17D, neste caso, na região do NS2B / NS3 e entre a proteína E e NS1.

A importância de células T CD4<sup>+</sup> no desenvolvimento de células T CD8<sup>+</sup> foi evidenciada através de ensaios experimentais com *T. cruzi* (Alba Soto *et al.*, 2003; De Alencar *et al.*, 2007; Tzelepis *et al.*, 2007) ou em outros modelos de infecção, como para o vírus *Influenza*, *Herpes simplex virus I* ou *Listeria monocitogenes* (Belz *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004). O auxílio das T CD4<sup>+</sup> pode ser desnecessário, caso as células apresentadoras de antígenos (APCs) sejam diretamente infectadas pelo patógeno, e expressem co-estimuladores fortes, bem como realizem uma apresentação cruzada eficaz para ativar diretamente células T CD8<sup>+</sup>. O que se vê na infecção por *T. cruzi* é que embora este patógeno infecte as APCs, a expressão de co-estimuladores, como CD40 e CD86 é reduzida, além disso, a infecção pelo parasita induz a uma supressão da secreção pelas APCs de citocinas, como IL-12, TNF- $\alpha$ , e IL-6, normalmente secretadas pelas APCs, além de suprimir a expressão de moléculas de MHC classe I, levando a uma indução restrita de células T CD8<sup>+</sup> pós-infecção pelo parasita (Van Overtvelt *et al.*, 2002). As células T CD4<sup>+</sup> podem promover o desenvolvimento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> através do engajamento da co-expressão de CD40 nas DCs, resultando na maturação destas (Ridge *et al.*, 1998) ou através de mediadores solúveis (Williams *et al.*, 2006). Verificou-se ainda que essa modulação mediada por T CD4<sup>+</sup> tem relação com a diferenciação e expansão mais rápida das células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas, visto que uma resposta citotóxica ocorre tardiamente na infecção por *T. cruzi* (Tzelepis *et al.*, 2007). Apesar de Padilla e equipe (2007) terem demonstrado a ativação de T CD8<sup>+</sup> independente de T CD4<sup>+</sup>, a falta de T CD4<sup>+</sup> durante a resposta de ativação (*priming*) resulta em uma resposta secundária defectiva e em uma perda de células T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicas ao longo do tempo, estando, portanto, T CD4<sup>+</sup> associadas à manutenção da população de células T CD8<sup>+</sup> de memória antígeno-específicas, conforme foi demonstrado por outros autores (Sun & Bevan, 2003; Bevan *et al.*, 2004).

Foi visto que a depleção de células T CD4<sup>+</sup> anteriormente à vacinação com DNA ou peptídeos de ASP-2 é capaz de reverter quase que totalmente a imunidade protetora obtida pela vacinação de camundongos A/Sn não-depletados (Vasconcelos *et al.*, 2004; De Alencar *et al.*, 2007). No entanto, epítomos protetores em ASP-2, reconhecidos por T CD4<sup>+</sup> de haplótipo murino H-2K<sup>k</sup> ainda necessitam ser caracterizados. Até então, apenas um epítomo H-2<sup>d</sup> (BALB/c) foi identificado em *T. cruzi*, sendo este epítomo presente em uma proteína pertencente ao grupo das trans-sialidases, denominada de SA85.11 (Millar & Kahn, 2000).

Em nosso trabalho, visto que o vírus YF17D/ENS1/Tc alberga o domínio de ASP-2 que possivelmente contém epítomos T CD4<sup>+</sup>, podemos hipotetizar mecanismos pelos quais este vírus possa induzir T CD4<sup>+</sup> *in vivo*. Sabemos que o acúmulo de proteínas incorretamente processadas no RE é um fator de estresse, podendo levar a um desencadeamento de sinais que culminam na apoptose celular (Todd *et al.*, 2008). O vírus YF17D/ENS1/Tc, bem como outras construções, que apresentam inserções na região E/NS1, desenvolvidas pela nossa equipe, são capazes de induzir apoptose de células Vero infectadas. Corpos apoptóticos por sua vez, podem ser imunogênicos, sendo engolfados pelas DCs e macrófagos ativados e ter seus antígenos apresentados via MHC classe II à células T CD4<sup>+</sup> alvo (Green *et al.*, 2009) ou via MHC classe I a células T citotóxicas, por um mecanismo de apresentação-cruzada das DCs (Heath & Carbone, 2001).

Em relação à indução de anticorpos específicos para antígenos de *T. cruzi*, verificamos que a imunização com o vírus YF17D/ENS1/Tc (o que expressa o fragmento maior de ASP-2) foi capaz de gerar anticorpos específicos para ASP-2, presentes em soro obtido de camundongos A/J, que reagem diretamente com as formas amastigotas de *T. cruzi* (cepa Y), comparativamente à imunização de camundongos com somente o peptídeo TEWETGQI emulsificado em adjuvante de Freund. Células não infectadas por amastigotas de *T. cruzi* não apresentaram qualquer marcação específica. Outros ensaios poderão ser realizados a fim de se quantificar os títulos de anticorpos anti-ASP-2 induzidos pela imunização com o vírus YF17D/NS1/Tc.

#### 5.5.4 Parasitemia

Nós iniciamos um estudo de parasitemia por ser este tipo de análise, complementar à determinação do tempo médio de sobrevivência obtido em camundongos A/J após um desafio com *T. cruzi*. Se uma vacinação é capaz de reduzir a mortalidade de camundongos desafiados após o período crítico da fase aguda (até 23 dpi), espera-se que haja uma redução no número

de parasitas no sangue ou controle da parasitemia ao longo do curso da infecção, conforme demonstraram outros autores (Araújo *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2006). Os nossos dados são ainda preliminares, porém, demonstraram que a vacinação com o vírus YF17D/ENS1/Tc ou Formulação 1 levou a uma parasitemia menor do que o controle e YF17D/NS2B3/Tc. Porém, a proteção não foi estéril, pois não eliminou a infecção por *T. cruzi*. Um trabalho prévio mostrou que camundongos A/Sn imunizados com o peptídeo GST-TEWETGQI apresentaram uma carga parasitária em torno de  $300 \times 10^4$  parasitas / mL, enquanto que os imunizados com o peptídeo correspondente a ASP-2<sub>261-380</sub> (GST-P4-P5) apresentaram em torno de  $100 \times 10^4$  parasitas / mL (De Alencar *et al.*, 2007), valores que estão em acordo com os nossos resultados, pois camundongos imunizados com YF17D/NS2B3/Tc, YF17D/ENS1/Tc e Formulação 1 apresentaram cargas parasitárias em torno de 360, 185 e 138  $\times 10^4$  parasitas / mL, respectivamente. A carga parasitária medida em camundongos imunizados com a Formulação 1 diferiu significativamente da carga parasitária em animais imunizados com meio (Mock), o que se relaciona com os níveis de proteção existentes para essa imunização. No entanto, novos testes ainda serão necessários a fim de se confirmar o perfil protetor da Formulação 1.

Além dos níveis parasitêmicos, outros parâmetros poderiam ser avaliados em conjunto, em ensaios experimentais de maior duração, como a avaliação de infiltrados inflamatórios ou ninhos de amastigotas em análises histopatológicas de tecidos de coração, auxiliando na correlação entre a parasitemia e dano inflamatório tecidual em infecções por *T. cruzi* (Dumonteil *et al.*, 2004). Além disso, uma melhor caracterização de células T secretoras de IFN- $\gamma$ , com marcadores de degranulação e citotoxicidade ou marcadores de perforina ou granzima poderão em trabalhos futuros, complementar estas análises.

#### 5.5.5 A resposta imune celular e a proteção induzida pela Formulação 1

Nós tivemos interesse em comparar os níveis de produção de IFN- $\gamma$ , através de ensaios de ELISPOT, obtidos pela imunização com a Formulação 1, visto ser a formulação mais protetora, em relação à imunização com os vírus recombinantes isoladamente: YF17D/ENS1/Tc e YF17D/NS2B3/Tc. Foi observado que um dos fatores mais críticos na determinação do tamanho de uma população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória antígeno-específicos, é o aumento da resposta celular que ocorre inicialmente (expansão pós-vacinação), implicando que quanto maior a resposta inicial, mais robusta a geração de células T de memória (Miyahira *et al.*, 2007). Desse modo, queríamos verificar se haveriam

diferenças entre estes vírus logo no início das imunizações, após uma única dose. Além disso, pudemos mensurar a capacidade dos vírus recombinantes e da Formulação 1 em expandir linfócitos T CD8<sup>+</sup> respondedores a TEWETGQI após a segunda dose.

Nesse sentido, com apenas uma dose, nós pudemos claramente diferenciar a Formulação 1 dos outros grupos de imunização, em relação ao número de células TEWETGQI-específicas produtoras de IFN- $\gamma$ . De acordo com nossos resultados, a vacinação com a Formulação 1 é capaz de induzir uma maior resposta celular ao epítipo de *T. cruzi* logo no início das imunizações, ainda que o vírus YF17D/NS2B3/Tc, um bom indutor de células produtoras de IFN- $\gamma$ , em comparação com os outros vírus descritos neste trabalho, tenha apresentado uma média elevada. Já o vírus YF17D/ENS1/Tc, mais atenuado, parece menos eficiente em ativar células produtoras de IFN- $\gamma$  logo após uma dose. Similar a estes resultados, obtidos pelo ensaio de ELISPOT, ensaios de linfoproliferação realizados com células dos grupos imunizados com a Formulação 1 e com YF17D/NS2B3/Tc e marcadas com anti-CD8 foram capazes de apresentar já com uma dose, uma proliferação diferente de YF17D/ENS1/Tc, mediante estímulo com TEWETGQI (Tabela 4.16, seção Resultados).

Após a dose-reforço (segunda dose), o número de células produtoras de IFN- $\gamma$  mostrou-se aumentado significativamente para todas as imunizações, tendo sido mais pronunciado para as imunizações com a Formulação 1 e YF17D/ENS1/Tc. Assim, nossos resultados demonstraram que tanto a Formulação 1 quanto os vírus isoladamente levam à expansão de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  específicas para TEWETGQI, tanto após a dose-reforço quanto após o desafio com *T. cruzi*. No entanto, o número de células produtoras de IFN- $\gamma$  obtido logo após a primeira dose parece melhor se correlacionar com proteção dos camundongos desafiados por *T. cruzi*, enquanto que a expansão de células T CD8<sup>+</sup> TEWETGQI-específicas avaliadas 15 dias após desafio, parece se correlacionar mais com a resistência inicial dos camundongos em sucumbir à infecção pelo *T. cruzi* do que com a proteção duradoura mais propriamente dita (Tabela 4.16, seção Resultados). A análise pós-desafio mostrou que os vírus recombinantes para *T. cruzi* induzem, em níveis similares, a expansão da população de linfócitos T específicos.

Em relação à expansão do número de células responsivas ao vetor vacinal como estímulo após a dose reforço, os resultados parecem não diferir significativamente dentre os grupos imunizados, estes em níveis similares à imunização com o YF 17DD, conforme discutido anteriormente. No entanto, após a primeira dose, YF17D/ENS1/Tc induziu valores inferiores em relação aos outros grupos de imunização, o que pode sugerir sua atenuação.

Diferentemente do vírus YF17D/E200/Tc, não nos pareceu que baixos títulos de anticorpos neutralizantes para o vírus YF 17DD se correlacionem com um baixo número de células produtoras de IFN- $\gamma$ , visto que a imunização com a Formulação 1 induziu baixo título de resposta humoral dirigida ao YF 17DD, porém a resposta celular específica para o vetor vacinal foi comparável à imunização com o próprio YF 17DD vacinal (Tabela 4.15, seção Resultados).

#### 5.5.6 Linfoproliferação e a indução de resposta imune pelo YF 17D vacinal

Para investigar se a baixa resposta humoral poderia ser relacionada a uma falta de ativação de células T CD4<sup>+</sup> direcionadas ao vetor vacinal, células do baço, recuperadas após 1 ou 2 doses, foram estimuladas com o vírus YF 17DD na presença de CFSE e marcadas com anti-CD4. Verificou-se que a imunização com a Formulação 1 é capaz de induzir a uma linfoproliferação de T CD4<sup>+</sup> semelhante à imunização com YF 17DD. A linfoproliferação de células T CD8<sup>+</sup> marcadas também não diferiu dentre os vírus recombinantes e o vacinal. Sendo assim, os nossos resultados mostraram que a análise dos títulos de anticorpos neutralizantes ao vetor vacinal, induzidos pelas vacinações, faz-se importante como uma avaliação da replicação e da atenuação viral *in vivo*, porém, em nem todos os casos, esta análise pode se correlacionar com a indução de resposta celular ao epítipo de interesse ou até mesmo ao próprio vetor, conforme foi demonstrado pelos ensaios de ELISPOT e linfoproliferação.

Um trabalho recente mostrou que a imunização com YF 17D recombinantes foi capaz de induzir uma resposta imune mais balanceada de T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> polifuncionais em relação a outros vetores virais, como adenovírus ou MVA (“*Modified Vaccinia Ankara*”) recombinantes (Franco *et al.*, 2010). Apesar destes outros vetores virais terem induzido uma resposta significativa de T CD8<sup>+</sup>, os vírus YF 17D foram capazes de induzir uma resposta T CD4<sup>+</sup> mais robusta, em contraste com as outras plataformas virais. Os autores observaram que, apesar de adenovírus e MVA recombinantes terem induzido uma resposta robusta de T CD8<sup>+</sup>, esta esteve apenas associada à produção de IFN- $\gamma$ , enquanto que os vírus YF 17D foram capazes de induzir linfócitos T CD4<sup>+</sup> capazes de produzir além de IFN- $\gamma$ , IL-2 ou ambos, além de IL-4, IL-5 e TNF- $\alpha$ , caracterizando a polifuncionalidade destas células em induzir um perfil de citocinas misto do tipo Th1 e Th2. Os nossos resultados, ainda que de forma preliminar, estão de acordo com estes achados, visto que uma resposta balanceada de T CD4<sup>+</sup>

e T CD8<sup>+</sup> é induzida pelos vírus recombinantes YF17D/NS2B3/Tc, YF17D/ENS1/Tc e Formulação 1.

Algumas das boas propriedades da vacina YF 17D, já discutidas nesta tese, incluem uma limitada replicação do vetor no hospedeiro, porém capaz de induzir uma resposta imune robusta e de longa duração; além disso, a vacina é administrada com apenas uma dose e possui um processo de fabricação rigidamente controlado. As propriedades imunogênicas vacinais vêm sendo estudadas com mais força recentemente, e confirmam o potencial deste vírus em ser utilizado em novas plataformas virais. Neste trabalho, utilizamos o vírus vacinal YF 17DD para expressar epítomos de amastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) e verificamos que estes vírus recombinantes são geneticamente estáveis, capazes de proliferar em cultura de células e de se replicar *in vivo*, induzindo uma resposta imune celular (T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>) balanceada, similar ao vacinal. Além disso, ao utilizarmos um sistema-modelo murino suscetível à cepa Y de *T. cruzi*, verificamos que a administração simultânea de dois vírus YF 17D que expressam epítomos em distintas localizações do genoma parecem ser complementar, induzindo precocemente um número mais robusto de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , levando a uma resposta mais protetora frente a um desafio com parasitas. O conjunto destas análises encoraja o desenvolvimento do Vírus da Febre Amarela como um vetor candidato para uma vacina contra a Doença de Chagas e ao seu desenvolvimento como vetor de antígenos heterólogos.



## 6. CONCLUSÕES

- A construção dos vírus recombinantes YF17D/E200/Tc e YF17D/NS2B3/Tc expressando epítipo que reconhecem linfócitos T CD8<sup>+</sup>, TEWETGQI, e do vírus YF17D/ENS1/Tc expressando um cassete heterólogo que possui fragmento imunogênico de ASP-2<sub>261-380</sub> (proteína de superfície de amastigota 2) de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) originaram vírus viáveis, com boas taxas de replicação em cultura de células Vero e que se mostraram estáveis geneticamente por até no mínimo, a sexta passagem viral seriada.

- Os vírus recombinantes foram capazes de expressar o inserto heterólogo nas células infectadas em distintos padrões de detecção, o que sugere regiões de expressão distintas: em região perinuclear que provavelmente corresponde ao retículo endoplasmático e ao longo de organelas tubulares do citoplasma (vírus YF17D/E200/Tc), em região perinuclear, principalmente (vírus YF17D/ENS1/Tc) ou dispersa por todo o citoplasma (vírus YF 17D/NS2B3/Tc).

- O vírus recombinante YF17D/E200/Tc apresentou-se mais atenuado do que YF17D/NS2B3/Tc em camundongos Suíços, quando inoculados via intra-cerebral.

- Os três vírus recombinantes foram capazes de induzir títulos de anticorpos neutralizantes para o Vírus da Febre Amarela, porém menores do que o vacinal YF 17DD, sendo que a diferença entre os títulos foi mais relevante para os vírus YF17D/E200/Tc e YF17D/ENS1/Tc, o que sugere taxa de replicação mais reduzida *in vivo*.

- O grau de susceptibilidade do modelo murino A/J ao vírus 17D foi estabelecido através da indução de proteção contra o desafio intracerebral pelo próprio YF 17DD após a imunização pela via subcutânea e pela geração de títulos de anticorpos neutralizantes.

- A imunização com o vírus YF17D/ENS1/Tc induziu anticorpos que são capazes de reagir especificamente com formas amastigotas, provenientes de células Vero infectadas de *T. cruzi*

- A imunização com os três vírus recombinantes de FA foi capaz de aumentar o tempo médio de sobrevivência de camundongos A/J frente a um desafio por *T. cruzi* (cepa Y), porém, conferiu somente proteção parcial. Pudemos avaliar diferencialmente formulações virais mais relacionadas à proteção imune e uma das formulações testadas, que utiliza YF17D/ENS1/Tc e YF17D/NS2B3/Tc, mostrou-se indutora de uma proteção mais efetiva contra o *T. cruzi*.

- Com apenas uma dose dos vírus recombinantes YF17D/ENS1/Tc e YF17D/NS2B3/Tc, ou formulação destes (50/50, Formulação 1), foi possível verificar a

indução de resposta celular produtora de IFN- $\gamma$ , direcionada ao vetor vacinal e ao peptídeo-específico de *T. cruzi*, sendo que a Formulação 1 induziu os maiores níveis de células produtoras de IFN- $\gamma$  em relação aos vírus inoculados isoladamente.

- A resposta celular ao vetor vacinal, induzida pelos três vírus recombinantes ou formulação viral pouco se correlacionou com a resposta de anticorpos neutralizantes para o vírus da FA vacinal.

- Células produtoras de IFN- $\gamma$ , específicas para o epítipo de *T. cruzi*, induzidas pela vacinação com os vírus recombinantes são capazes de se expandir vigorosamente após o desafio com *T. cruzi*, sendo os valores mais relevantes para YF17D/ENS1/Tc e Formulação Viral. É possível que esta expansão celular esteja correlacionada à resistência inicial de camundongos vacinados frente à infecção pelo *T. cruzi*.

- Uma resposta balanceada de T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> foi induzida pelos vírus recombinantes YF17D/NS2B3/Tc, YF17D/ENS1/Tc e Formulação 1, similar ao vacinal YF 17DD.

- A Formulação 1 (combinação de vírus YF17D/ENS1/Tc e YF17D/NS2B3/Tc) mostrou-se promissora quanto aos resultados de proteção, parasitemia, indução de IFN- $\gamma$  e linfoproliferação específica para o vetor vacinal e para antígeno específico de *T. cruzi*.

## 7. PERSPECTIVAS

Diante dos resultados expostos, as perspectivas que poderão complementar este trabalho futuramente são:

1) a construção de novos vírus YF 17D recombinantes, em outras abordagens, que expressem outros epítomos imunodominantes de *T. cruzi*, provenientes tanto de amastigotas quanto de tripomastigotas, que tenham se mostrado promissores. Alguns destes epítomos mostraram bons resultados quanto à indução de células T CD8<sup>+</sup>, como o epítomo VNHRFTLV, presente em ASP-2 (553 – 560 aminoácidos), indutor do haplótipo H-2K<sup>b</sup> murino (camundongos C57BL/6) (Low *et al.*, 1998; Tzelepis *et al.*, 2006). O epítomo VNHRFTLV demonstrou ser promissor em camundongos, ao induzir cerca de 1.000 células produtoras de IFN- $\gamma$  após vacinação de Adenovírus recombinante para ASP-2 (Machado *et al.*, 2006) e até 3.000 células produtoras de IFN- $\gamma$  em sistema de dose-reforço heterólogo empregando DNA e Adenovírus, recombinantes para ASP-2 (De Alencar *et al.*, 2009). Além deste, outros foram descritos em antígenos de tripomastigotas, como o epítomo IYNVGQVSI, presente em TS (359 – 367 aa) (Rodrigues *et al.*, 1999) ou o epítomo ANYNFTLV, do antígeno de TSSA (*trans-sialidase surface antigen*), descrito como suficiente para controlar uma infecção letal de *T. cruzi* em camundongos experimentais (Miyahira *et al.*, 2005). Alguns dos resultados obtidos por estes e outros epítomos foram descritos na Tabela 1.1 (seção Introdução);

2) avaliação e caracterização de novos vírus contendo modificações no arcabouço do cassete heterólogo (região da haste-âncora) que contribuam para uma maior estabilidade genética viral e possibilitem a expressão direcionada de fragmentos antigênicos maiores. O desenvolvimento da plataforma viral de YF 17D vem sendo aprimorado constantemente nesse sentido. Novos vírus contendo apenas uma parte da HA (formas truncadas, que eliminaram a duplicação das regiões H1 e CS) mostraram-se mais estáveis geneticamente. Essa estratégia foi utilizada para gerar os vírus descritos no trabalho de Bonaldo e equipe (2010). No que diz respeito à resposta imune contra a proteína heteróloga, apesar desse sistema de expressão provocar a retenção desta no interior do RE, novas estratégias que permitam a retenção ou a liberação da proteína heteróloga do RE podem ser complementares e utilizadas neste modelo de *T. cruzi* para expressar proteínas distintas;

3) a utilização do modelo de infecção e desafio murino para o estudo de novas formulações virais que possam complementar uma resposta imune protetora eficaz contra *T. cruzi*. Devido aos resultados mais promissores deste trabalho terem sido obtidos pelas

imunizações simultâneas de vírus que expressavam peptídeos em diferentes localizações do genoma de FA, poderíamos testar uma nova formulação viral que contivesse uma combinação dos três vírus recombinantes, gerados nesse trabalho, que expressam TEWETGQI ou fragmento de ASP-2<sub>261-380</sub>. Outra possibilidade seria uma combinação de vírus distintos que expressem outros fragmentos proteicos maiores de ASP-2 ou TS na região intergênica de E e NS1. Estes estudos poderiam ser complementados com a verificação de imunidade estéril ou não através dos ensaios de parasitemia e de análise histológica dos tecidos;

4) o estudo da imunogenicidade e proteção de camundongos vacinados com isoformas de ASP-2, expressas por distintas cepas de *T. cruzi*. Foi visto em estudo anterior que diferentes cepas de *T. cruzi* podem expressar distintas isoformas de ASP-2 (Claser *et al.*, 2007). Enquanto que as cepas Brazil, Colombiana e Tulahuen possuem sequências nucleotídicas de aminoácidos de ASP-2 com alto grau de identidade com relação à da cepa Y, as cepas Sylvio X10/4 e G apresentam identidade limitada em relação à cepa Y. No estudo de Claser e equipe (2007), esta diferença não se refletiu na detecção da expressão das diferentes isoformas de ASP-2 por anticorpos monoclonais ou policlonais (houve presença de reatividade cruzada para todas as cepas), no entanto, camundongos que foram vacinados com ASP-2, oriunda das cepas CL-Brener e G não apresentaram o mesmo nível de proteção quando desafiados pela cepa Y de *T. cruzi* do que camundongos vacinados com ASP-2 oriunda da mesma cepa (Y), indicando que ASP-2 de distintas cepas podem não compartilhar epítomos de proteção cruzada (Claser *et al.*, 2007);

5) a verificação da indução de células produtoras de IFN- $\gamma$  específicas por um conjunto mais abrangente de peptídeos imunogênicos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup>, tanto para *T. cruzi* quanto para YF 17D. A Tabela 4.6 (seção Resultados) lista algumas das possibilidades de epítomos de ASP-2<sub>261-380</sub> que poderiam ser testados por ensaios de ELISPOT em células do baço obtidas de camundongos imunizados com o vírus YF17D/ENS1/Tc. Além destes, outros epítomos indutores de resposta celular poderiam ser utilizados para mapear a resposta induzida por vírus recombinantes de FA que expressem distintas proteínas de *T. cruzi*;

6) a implementação dos estudos de caracterização da resposta imune induzida pelos YF17D recombinantes através da avaliação funcional de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e produção de múltiplas citocinas efetoras do sistema imune. Para isso, poderia ser realizada uma caracterização do fenótipo celular marcando-se subpopulações purificadas de células T CD8<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> para expressão de CD107a (um marcador de degranulação e citotoxicidade de células T). Como análise funcional, estas células poderiam ser analisadas por marcação intracelular (ICS, *intracellular staining*) através do estímulo *in vitro* com peptídeos de *T. cruzi*

(TEWETGQI ou outros) e marcadas com anticorpos para IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2. Estas citocinas são regularmente usadas para identificar células T multifuncionais, conforme visto em outros trabalhos (Goonetilleke *et al.*, 2006; De Alencar *et al.*, 2009). Estas e outras citocinas (Cunha-Neto *et al.*, 2009) como perforina e granzima poderiam ser utilizadas para estudos que, além de IFN- $\gamma$ , correlacionem a presença de um perfil funcional simultâneo de células T ativadas com imunidade protetora gerada pelos regimes de vacinação; e

7) o estudo de novas estratégias de vacinação utilizando regime de dose-reforço heterólogo (tipo *prime-boost*) com o uso de outros vetores virais ou vacina de DNA em conjunto com o vírus recombinante de FA. As boas propriedades imunológicas induzidas pelo uso de regimes de vacinação tipo dose-reforço heterólogos foram descritas em alguns trabalhos (Bruna-Romero *et al.*, 2001; Stephenson *et al.*, 2001; Miyahira *et al.*, 2005; Goonetilleke *et al.*, 2006). Um estudo que usou uma estratégia de imunização de vírus recombinante vaccinia como reforço (*boost*) após uma dose de adenovírus recombinante ou vírus da influenza (*prime*), ambos expressando epítipo T CD8<sup>+</sup> de *T. cruzi*, demonstrou ser capaz de induzir uma resposta protetora eficaz e um alto número de células produtoras de IFN- $\gamma$  (Takayama *et al.*, 2010). É possível que o uso de vírus vaccinia como reforço possa aumentar a magnitude de resposta induzida pelos vírus recombinantes de FA.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akondy RS, Monson ND, Miller JD, Edupuganti S, Teuwen D, Wu H, *et al.* The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response. *J. Immunol.* 2009; 183(12):7919-7930.

Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, Suarez J, Abate T, Naranjo L, Paiva M, *et al.* Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis* 2010, 201:1308-1315.

Alba Soto CD, Mirkin GA, Solana ME, González Cappa SM. *Trypanosoma cruzi* infection modulates in vivo expression of major histocompatibility complex class II molecules on antigen-presenting cells and T-cell stimulatory activity of dendritic cells in a strain-dependent manner. *Infect. Immun.* 2003; 71(3):1194-1199.

Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect. Immun.* 1996; 64(6):1961-1967.

Aliberti JC, Souto JT, Marino AP, Lannes-Vieira J, Teixeira MM, Farber J, *et al.* Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Pathol.* 2001; 158(4):1433-1440.

Allison SL, Stiasny K, Stadler K, Mandl CW, Heinz FX. Mapping of functional elements in the stem-anchor region of tick-borne encephalitis virus envelope protein E. *J. Virol.* 1999; 73(7):5605-5612.

Allison SL, Stiasny K, Stadler K, Mandl CW, Heinz FX. Mapping of functional elements in the stem-anchor region of tick-borne encephalitis virus envelope protein E. *J. Virol.* 1999; 73(7):5605-5612.

Alvarez MG, Postan M, Weatherly DB, Albareda MC, Sidney J, Sette A, *et al.* HLA Class I-T cell epitopes from trans-sialidase proteins reveal functionally distinct subsets of CD8+ T cells in chronic Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(9):e288.

Andino R, McAllister A. Recombinant bicistronic flaviviruses and methods of use thereof. 2002. WO 02/089840.

Araújo AFS, de Alencar BCG, Vasconcelos JRC, Hiyane MI, Marinho CRF, Penido MLO, *et al.* CD8+-T-cell-dependent control of *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after immunization with recombinant proteins based on amastigote surface protein 2. *Infect. Immun.* 2005; 73(9):6017-6025.

Arroyo J, Miller C, Catalan J, Myers GA, Ratterree MS, Trent DW, *et al.* ChimeriVax-West Nile virus live-attenuated vaccine: preclinical evaluation of safety, immunogenicity, and efficacy. *J. Virol.* 2004; 78(22):12497-12507.

Ashour J, Laurent-Rolle M, Shi P, García-Sastre A. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *J. Virol.* 2009; 83(11):5408-5418.

Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A 2006. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 177: 3515-3519.

Barba-Spaeth G, Longman RS, Albert ML, Rice CM. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. *J. Exp. Med.* 2005; 202(9):1179-1184.

Barrett AD, Pryde A, Medlen AR, Ledger TN, Whitby JE, Gibson CA, *et al.* Examination of the envelope glycoprotein of yellow fever vaccine viruses with monoclonal antibodies. *Vaccine.* 1989; 7(4):333-336.

Barwick R. History of thymoma and yellow fever vaccination. *Lancet.* 2004; 364(9438):936.

Basombrio MA. *Trypanosoma cruzi*: partial prevention of the natural infection of guinea pigs with a killed parasite vaccine. *Exp. Parasitol.* 1990; 71(1):1-8.

Beasley DWC, Barrett ADT. Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein. *J. Virol.* 2002; 76(24):13097-13100.

Belz GT, Wodarz D, Diaz G, Nowak MA, Doherty PC. Compromised influenza virus-specific CD8(+)-T-cell memory in CD4(+)-T-cell-deficient mice. *J. Virol.* 2002; 76(23):12388-12393.

Bevan MJ. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4(8):595-602.

Bilate AMB, Cunha-Neto E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 2008; 50(2):67-74.

Bonaldo MC, Garratt RC, Caufour OS, Freire MS, Rodrigues MM, Nussenzweig RS, Galler R. Surface expression of an immunodominant malaria protein B cell epitope by yellow fever virus. *J Mol Biol* 2002; 315:873-885

Bonaldo MC, Garratt RC, Marchevsky RS, Coutinho ES, Jabor AV, Almeida LF, Yamamura AM, Duarte AS, Oliveira PJ, Lizeu JO, Camacho LA, Freire MS, Galler R. Attenuation of recombinant yellow fever 17D viruses expressing foreign protein epitopes at the surface. *J Virol* 2005; 79(13), 8602-8613.

Bonaldo MC, Garratt RC, Freire MS, Galler R. Expression of foreign protein epitopes at the surface of recombinant yellow fever 17D viruses based on three-dimensional modeling of its envelope protein. *Cell Biochem. Biophys.* 2006;44(3):313-324.

Bonaldo MC, Mello SM, Trindade GF, Rangel A, Duarte AS, Oliveira PJ, Freire MS, Kubelka CF, Galler R. Construction and characterization of recombinant flaviviruses bearing insertions between E and NS1 genes. *Virology Journal* 2007; 4:115.

Bonaldo MC, Martins MA, Rudersdorf R, Mudd PA, Sacha JB, Piaskowski SM, *et al.* Recombinant yellow fever vaccine virus 17D expressing simian immunodeficiency virus



SIVmac239 gag induces SIV-specific CD8+ T-cell responses in rhesus macaques. *J. Virol.* 2010; 84(7):3699-3706.

Boscardin SB, Kinoshita SS, Fujimura AE, Rodrigues MM. Immunization with cDNA expressed by amastigotes of *Trypanosoma cruzi* elicits protective immune response against experimental infection. *Infect. Immun.* 2003; 71(5):2744-2757.

Brandriss MW, Schlesinger JJ, Walsh EE, Briselli M. Lethal 17D yellow fever encephalitis in mice. I. Passive protection by monoclonal antibodies to the envelope proteins of 17D yellow fever and dengue 2 viruses. *J. Gen. Virol.* 1986; 67 ( Pt 2):229-234.

Brandriss MW, Schlesinger JJ, Walsh EE. Immunogenicity of a purified fragment of 17D yellow fever envelope protein. *J. Infect. Dis.* 1990; 161(6):1134-1139.

Bredenbeek PJ, Molenkamp R, Spaan WJM, Deubel V, Marianneau P, Salvato MS, *et al.* A recombinant Yellow Fever 17D vaccine expressing Lassa virus glycoproteins. *Virology.* 2006; 345(2):299-304.

Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 1962; 4:389-396.

Brinkworth RI, Fairlie DP, Leung D, Young PR. Homology model of the dengue 2 virus NS3 protease: putative interactions with both substrate and NS2B cofactor. *J. Gen. Virol.* 1999; 80 (Pt 5):1167-1177.

Brinton MA, Fernandez AV, Dispoto JH. The 3'-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure. *Virology.* 1986; 153(1):113-121.

Brinton MA, Dispoto JH. Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA. *Virology.* 1988; 162(2):290-299

Bruña-Romero O, González-Aseguinolaza G, Hafalla JC, Tsuji M, Nussenzweig RS. Complete, long-lasting protection against malaria of mice primed and boosted with two

distinct viral vectors expressing the same plasmodial antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2001; 98(20):11491-11496.

Camargo EP. Perspectives of vaccination in Chagas disease revisited. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2009; 104 Suppl 1:275-280.

Camargo MM, Andrade AC, Almeida IC, Travassos LR, Gazzinelli RT. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from Leishmania species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. J. Immunol. 1997; 159(12):6131-6139.

Campos MA, Closel M, Valente EP, Cardoso JE, Akira S, Alvarez-Leite JI, Ropert C, Gazzinelli RT 2004. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. J Immunol 172: 1711-1718.

Carpp LN, Galler R, Bonaldo MC. Interaction between the yellow fever virus nonstructural protein NS3 and the host protein Alix contributes to the release of infectious particles. Microbes Infect. 2011; 13(1):85-95.

Caufour PS, Motta MC, Yamamura AM, Vazquez S, Ferreira II, Jabor AV, *et al.* Construction, characterization and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 viruses. Virus Res. 2001; 79(1-2):1-14.

Cazorla SI, Becker PD, Frank FM, Ebensen T, Sartori MJ, Corral RS, *et al.* Oral vaccination with Salmonella enterica as a cruzipain-DNA delivery system confers protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 2008; 76(1):324-333.

Chagas CRJ. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen. n. esp., agente da nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909; 1: 159-218.

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. Annu. Rev. Microbiol. 1990; 44:649-688.

Chambers TJ, Nestorowicz A, Mason PW, Rice CM. Yellow fever/Japanese encephalitis chimeric viruses: construction and biological properties. *J. Virol.* 1999; 73(4):3095-3101.

Chan RC, Penney DJ, Little D, Carter IW, Roberts JA, Rawlinson WD. Hepatitis and death following vaccination with 17D-204 yellow fever vaccine. *Lancet.* 2001; 358(9276):121-122

Chen CJ, Kuo MD, Chien LJ, Hsu SL, Wang YM, Lin JH. RNA-protein interactions: involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of Japanese encephalitis virus genomic RNA. *J. Virol.* 1997; 71(5):3466-3473.

Chiu W, Kinney RM, Dreher TW. Control of translation by the 5'- and 3'-terminal regions of the dengue virus genome. *J. Virol.* 2005; 79(13):8303-8315.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162:156-159.

Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques.* 1993; 15:532-537.

Chung KM, Nybakken GE, Thompson BS, Engle MJ, Marri A, Fremont DH, *et al.* Antibodies against West Nile Virus nonstructural protein NS1 prevent lethal infection through Fc gamma receptor-dependent and -independent mechanisms. *J. Virol.* 2006; 80(3):1340-1351.

Claser C, Espíndola NM, Sasso G, Vaz AJ, Boscardin SB, Rodrigues MM. Immunologically relevant strain polymorphism in the Amastigote Surface Protein 2 of *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect.* 2007; 9(8):1011-1019.

Claser C, Curcio M, de Mello SM, Silveira EV, Monteiro HP, Rodrigues MM. Silencing cytokeratin 18 gene inhibits intracellular replication of *Trypanosoma cruzi* in HeLa cells but not binding and invasion of trypanosomes. *BMC Cell Biol.* 2008; 9:68.

Co MDT, Terajima M, Cruz J, Ennis FA, Rothman AL. Human cytotoxic T lymphocyte responses to live attenuated 17D yellow fever vaccine: identification of HLA-B35-restricted

CTL epitopes on nonstructural proteins NS1, NS2b, NS3, and the structural protein E. *Virology*. 2002; 293(1):151-163.

Costa F, Franchin G, Pereira-Chioccola VL, Ribeirão M, Schenkman S, Rodrigues MM. Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine*. 1998; 16(8):768-774.

Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2007; 102 Suppl 1:113-122

Cross GA, Takle GB. The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 1993;47:385-411.

Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, *et al.* Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104 Suppl 1:252-258.

de Alencar BCG, Araújo AFS, Penido MLO, Gazzinelli RT, Rodrigues MM. Cross-priming of long lived protective CD8+ T cells against *Trypanosoma cruzi* infection: importance of a TLR9 agonist and CD4+ T cells. *Vaccine*. 2007; 25(32):6018-6027.

de Alencar BCG, Persechini PM, Haolla FA, de Oliveira G, Silverio JC, Lannes-Vieira J, *et al.* Perforin and gamma interferon expression are required for CD4+ and CD8+ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. *Infect. Immun.* 2009; 77(10):4383-4395.

Dos Santos CN, Post PR, Carvalho R, Ferreira II, Rice CM, Galler R. Complete nucleotide sequence of yellow fever virus vaccine strains 17DD and 17D-213. *Virus Res.* 1995; 35(1):35-41.

Draper SJ, Heeney JL. Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8(1):62-73.

Duan X, Yonemitsu Y, Chou B, Yoshida K, Tanaka S, Hasegawa M, *et al.* Efficient protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection after nasal vaccination with recombinant Sendai virus vector expressing amastigote surface protein-2. *Vaccine*. 2009; 27(44):6154-6159.

Dumonteil E, Escobedo-Ortegon J, Reyes-Rodriguez N, Arjona-Torres A, Ramirez-Sierra MJ. Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection with DNA vaccines in mice. *Infect. Immun.* 2004; 72(1):46-53.

Dutra WO, Rocha MOC, Teixeira MM. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends Parasitol.* 2005; 21(12):581-587.

Elazar M, Liu P, Rice CM, Glenn JS. An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *J. Virol.* 2004; 78(20):11393-11400.

Erbel P, Schiering N, D'Arcy A, Renatus M, Kroemer M, Lim SP, *et al.* Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006; 13(4):372-373.

Falgout B, Chanock R, Lai CJ. Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a. *J. Virol.* 1989; 63(5):1852-1860.

Falgout B, Bray M, Schlesinger JJ, Lai CJ. Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. *J. Virol.* 1990; 64(9):4356-4363.

Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J. Virol.* 1991; 65(5):2467-2475.

Fralish BH, Tarleton RL. Genetic immunization with LYT1 or a pool of trans-sialidase genes protects mice from lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine*. 2003 Jun 20;21(21-22):3070-3080.

Franco D, Li W, Qing F, Stoyanov CT, Moran T, Rice CM, *et al.* Evaluation of yellow fever virus 17D strain as a new vector for HIV-1 vaccine development. *Vaccine*. 2010; 28(35):5676-5685.

Franco O. [History of the Yellow fever in Brazil]. *Rev Bras Malariol Doencas Trop*. 1969; 21(2):315-512.

Frank FM, Petray PB, Cazorla SI, Muñoz MC, Corral RS, Malchiodi EL. Use of a purified *Trypanosoma cruzi* antigen and CpG oligodeoxynucleotides for immunoprotection against a lethal challenge with trypomastigotes. *Vaccine*. 2003; 22(1):77-86.

Fujimura AE, Kinoshita SS, Pereira-Chioccola VL, Rodrigues MM. DNA sequences encoding CD4+ and CD8+ T-cell epitopes are important for efficient protective immunity induced by DNA vaccination with a *Trypanosoma cruzi* gene. *Infect. Immun*. 2001; 69(9):5477-5486.

Gao N, Chen W, Zheng Q, Fan D, Zhang J, Chen H, *et al.* Co-expression of Japanese encephalitis virus prM-E-NS1 antigen with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances humoral and anti-virus immunity after DNA vaccination. *Immunol. Lett*. 2010; 129(1):23-31.

Galler R, Freire MS, Jabor AV, Mann GF. The yellow fever 17D vaccine virus: molecular basis of viral attenuation and its use as an expression vector. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 1997; 30(2):157-168.

Galler R, Post PR, Santos CN, Ferreira II. Genetic variability among yellow fever virus 17D substrains. *Vaccine*. 1998; 16(9-10):1024-1028.

Galler R, Pugachev KV, Santos CL, Ocran SW, Jabor AV, Rodrigues SG, *et al.* Phenotypic and molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil. *Virology*. 2001; 290(2):309-319.

Garg N, Nunes MP, Tarleton RL. Delivery by *Trypanosoma cruzi* of proteins into the MHC class I antigen processing and presentation pathway. *J. Immunol*. 1997 Apr 1;158(7):3293-3302.

Garg N, Tarleton RL. Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun*. 2002; 70(10):5547-5555.

Gaucher D, Therrien R, Kettaf N, Angermann BR, Boucher G, Filali-Mouhim A, *et al.* Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J. Exp. Med*. 2008; 205(13):3119-3131.

Gillespie LK, Hoenen A, Morgan G, Mackenzie JM. The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. *J. Virol*. 2010; 84(20):10438-10447.

Gomes JAS, Bahia-Oliveira LMG, Rocha MOC, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect. Immun*. 2003;71(3):1185-1193.

Goonetilleke N, Moore S, Dally L, Winstone N, Cebere I, Mahmoud A, *et al.* Induction of multifunctional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T cells capable of proliferation in healthy subjects by using a prime-boost regimen of DNA- and modified vaccinia virus Ankara-vectored vaccines expressing HIV-1 Gag coupled to CD8+ T-cell epitopes. *J. Virol*. 2006; 80(10):4717-4728.

Gould EA, Buckley A, Barrett AD, Cammack N. Neutralizing (54K) and non-neutralizing (54K and 48K) monoclonal antibodies against structural and non-structural yellow fever virus proteins confer immunity in mice. *J. Gen. Virol*. 1986; 67 (Pt 3):591-595.

Graefe SEB, Meyer BS, Müller-Myhsok B, Rüschemdorf F, Drosten C, Laue T, *et al.* Murine susceptibility to Chagas' disease maps to chromosomes 5 and 17. *Genes Immun.* 2003; 4(5):321-325.

Green DR, Ferguson T, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9(5):353-363.

Guirakhoo F, Heinz FX, Kunz C. Epitope model of tick-borne encephalitis virus envelope glycoprotein E: analysis of structural properties, role of carbohydrate side chain, and conformational changes occurring at acidic pH. *Virology.* 1989; 169(1):90-99.

Guirakhoo F, Zhang ZX, Chambers TJ, Delagrave S, Arroyo J, Barrett AD, *et al.* Immunogenicity, genetic stability, and protective efficacy of a recombinant, chimeric yellow fever-Japanese encephalitis virus (ChimeriVax-JE) as a live, attenuated vaccine candidate against Japanese encephalitis. *Virology.* 1999; 257(2):363-372.

Guirakhoo F, Arroyo J, Pugachev KV, Miller C, Zhang ZX, Weltzin R, *et al.* Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. *J. Virol.* 2001; 75(16):7290-7304.

Guirakhoo F, Pugachev K, Arroyo J, Miller C, Zhang Z, Weltzin R, *et al.* Viremia and immunogenicity in nonhuman primates of a tetravalent yellow fever-dengue chimeric vaccine: genetic reconstructions, dose adjustment, and antibody responses against wild-type dengue virus isolates. *Virology.* 2002; 298(1):146-159.

Guirakhoo F, Pugachev K, Zhang Z, Myers G, Levenbook I, Draper K, *et al.* Safety and efficacy of chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine formulations in nonhuman primates. *J. Virol.* 2004; 78(9):4761-4775.

Gutierrez FRS, Guedes PMM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol.* 2009; 31(11):673-685.



Guy B, Guirakhoo F, Barban V, Higgs S, Monath TP, Lang J. Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses. *Vaccine*. 2010; 28(3):632-649.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987a; 84(7):2019-2023.

Hahn CS, Hahn YS, Rice CM, Lee E, Dalgarno L, Strauss EG, *et al.* Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. *J. Mol. Biol.* 1987b; 198(1):33-41.

Hall BF, Webster P, Ma AK, Joiner KA, Andrews NW. Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. *J. Exp. Med.* 1992 Ago 1;176(2):313-325.

Harris E, Holden KL, Edgil D, Polacek C, Clyde K. Molecular biology of flaviviruses. *Novartis Found. Symp.* 2006; 277:23-39; discussion 40, 71-73, 251-253

Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 2001; 1(2):126-134.

Heaton NS, Perera R, Berger KL, Khadka S, Lacount DJ, Kuhn RJ, *et al.* Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010; 107(40):17345-17350.

Heinz FX. Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Adv. Virus Res.* 1986; 31:103-168.

Hill AB, Müllbacher A, Parrish C, Coia G, Westaway EG, Blanden RV. Broad cross-reactivity with marked fine specificity in the cytotoxic T cell response to flaviviruses. *J. Gen. Virol.* 1992; 73 ( Pt 5):1115-1123.

Hoare CA. The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publication; 1972. Oxford

Hoft DF, Eickhoff CS. Type 1 immunity provides both optimal mucosal and systemic protection against a mucosally invasive, intracellular pathogen. *Infect. Immun.* 2005; 73(8):4934-4940.

Hoft DF, Eickhoff CS, Giddings OK, Vasconcelos JRC, Rodrigues MM. Trans-sialidase recombinant protein mixed with CpG motif-containing oligodeoxynucleotide induces protective mucosal and systemic *Trypanosoma cruzi* immunity involving CD8+ CTL and B cell-mediated cross-priming. *J. Immunol.* 2007; 179(10):6889-6900.

Hsieh S, Liu I, King C, Chang G, Wang W. A strong endoplasmic reticulum retention signal in the stem-anchor region of envelope glycoprotein of dengue virus type 2 affects the production of virus-like particles. *Virology.* 2008; 374(2):338-350.

Jabor AV. Manipulação genética do clone infeccioso do vírus da febre amarela da cepa vacinal 17D [dissertação]. Rio de Janeiro: Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, IOC/Fiocruz; 2001.

Jannin J, Villa L. An overview of Chagas disease treatment. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2007; 102 Suppl 1:95-97.

Jiang X, Dalebout TJ, Bredenbeek PJ, Carrion R, Brasky K, Patterson J, *et al.* Yellow fever 17D-vectored vaccines expressing Lassa virus GP1 and GP2 glycoproteins provide protection against fatal disease in guinea pigs. *Vaccine.* 2011; 29(6):1248-1257.

Jones DM, Patel AH, Targett-Adams P, McLauchlan J. The hepatitis C virus NS4B protein can trans-complement viral RNA replication and modulates production of infectious virus. *J. Virol.* 2009; 83(5):2163-2177.

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. *Vaccine.* 2005; 23(25):3256-3263.

Khromykh AA, Meka H, Guyatt KJ, Westaway EG. Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *J. Virol.* 2001; 75(14):6719-6728.

Laucella SA, Postan M, Martin D, Hubby Fralish B, Albareda MC, Alvarez MG, *et al.* Frequency of interferon- gamma -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *J. Infect. Dis.* 2004; 189(5):909-918.

Lee E, Lobigs M. E protein domain III determinants of yellow fever virus 17D vaccine strain enhance binding to glycosaminoglycans, impede virus spread, and attenuate virulence. *J. Virol.* 2008; 82(12):6024-6033.

Letvin NL. Progress and obstacles in the development of an AIDS vaccine. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6(12):930-939.

Li S, Locke E, Bruder J, Clarke D, Doolan DL, Havenga MJE, *et al.* Viral vectors for malaria vaccine development. *Vaccine.* 2007; 25(14):2567-2574.

Liew FY, Li Y, Moss D, Parkinson C, Rogers MV, Moncada S. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* 1991; 21(12):3009-3014.

Lima-Junior JC, Tran TM, Meyer EVS, Singh B, De-Simone SG, Santos F, *et al.* Naturally acquired humoral and cellular immune responses to *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 9 in Northwestern Amazon individuals. *Vaccine.* 2008; 26(51):6645-6654.

Limon-Flores AY, Cervera-Cetina R, Tzec-Arjona JL, Ek-Macias L, Sánchez-Burgos G, Ramirez-Sierra MJ, *et al.* Effect of a combination DNA vaccine for the prevention and therapy of *Trypanosoma cruzi* infection in mice: role of CD4+ and CD8+ T cells. *Vaccine.* 2010; 28(46):7414-7419.

Lindenbach BD, Rice CM. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J. Virol.* 1999; 73(6):4611-4621.

Lindenbach, BD, Rice, CM. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, editores. Fields Virology. Lippincott, Williams and Wilkins, Vol. 4. Vol. 1.; 2000. P. 991-1041.

Lindenbach BD, Rice CM. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editores. Fields Virology. Lippincott-Raven: Filadélfia; 4ª Ed; 2001. P. 991-1041.

Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. In: Chambers TJ, Monath TP, editores. Advances in Virus Research, The Flaviviruses: Detection, diagnosis and vaccine development. Elsevier Academic Press: California; vol. 59; 2003. P. 235-289.

Lindsey NP, Schroeder BA, Miller ER, Braun MM, Hinckley AF, Marano N, *et al.* Adverse event reports following yellow fever vaccination. *Vaccine*. 2008; 26(48):6077-6082.

Liniger M, Zuniga A, Naim HY. Use of viral vectors for the development of vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2007; 6(2):255-266.

Liu WJ, Chen HB, Wang XJ, Huang H, Khromykh AA. Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. *J. Virol*. 2004; 78(22):12225-12235.

Liu WJ, Wang XJ, Clark DC, Lobigs M, Hall RA, Khromykh AA. A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice. *J. Virol*. 2006; 80(5):2396-2404.

Lobigs M, Dalgarno L, Schlesinger JJ, Weir RC. Location of a neutralization determinant in the E protein of yellow fever virus (17D vaccine strain). *Virology*. 1987; 161(2):474-478.

Lobigs M, Arthur CE, Müllbacher A, Blanden RV. The flavivirus nonstructural protein NS3 is a dominant source of cytotoxic T cell peptide determinants. *Virology*. 1994; 202(1):195-201.

Low HP, Tarleton RL. Molecular cloning of the gene encoding the 83 kDa amastigote surface protein and its identification as a member of the *Trypanosoma cruzi* sialidase superfamily. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1997; 88(1-2):137-149.

Low HP, Santos MA, Wizel B, Tarleton RL. Amastigote surface proteins of *Trypanosoma cruzi* are targets for CD8+ CTL. *J. Immunol.* 1998; 160(4):1817-1823.

Machado AV, Cardoso JE, Claser C, Rodrigues MM, Gazzinelli RT, Bruna-Romero O. Long-term protective immunity induced against *Trypanosoma cruzi* infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum. Gene Ther.* 2006; 17(9):898-908.

Maciel M, Kellathur SN, Chikhlikar P, Dhaliya R, Sidney J, Sette A, *et al.* Comprehensive analysis of T cell epitope discovery strategies using 17DD yellow fever virus structural proteins and BALB/c (H2d) mice model. *Virology.* 2008; 378(1):105-117.

Mackenzie J. Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic.* 2005 Nov;6(11):967-977.

Mackenzie JM, Jones MK, Westaway EG. Markers for trans-Golgi membranes and the intermediate compartment localize to induced membranes with distinct replication functions in flavivirus-infected cells. *J. Virol.* 1999; 73(11):9555-9567.

Marchevsky RS, Mariano J, Ferreira VS, Almeida E, Cerqueira MJ, Carvalho R, *et al.* Phenotypic analysis of yellow fever virus derived from complementary DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1995; 52(1):75-80.

Marchevsky RS, Freire MS, Coutinho ESF, Galler R. Neurovirulence of yellow fever 17DD vaccine virus to rhesus monkeys. *Virology.* 2003; 316(1):55-63.

Markoff L. 5' and 3' non-coding regions of flavivirus RNA. In: Chambers TJ, Monath TP (editores). *The Flaviviruses: structure, replication and evolution.* Elsevier Academic Press; 2003. P. 177-228.

Martin D, Tarleton R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol. Rev.* 2004; 201:304-317.

Martin DL, Weatherly DB, Laucella SA, Cabinian MA, Crim MT, Sullivan S, *et al.* CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. *PLoS Pathog.* 2006; 2(8):e77.

Martins GA, Campanelli AP, Silva RB, Tadokoro CE, Russo M, Cunha FQ, *et al.* CD28 is required for T cell activation and IFN-gamma production by CD4+ and CD8+ T cells in response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect.* 2004; 6(13):1133-1144.

Martins MA, Silva ML, Elói-Santos SM, Ribeiro JGL, Peruhype-Magalhães V, Marciano APV, *et al.* Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination. *Vaccine.* 2008; 26(9):1173-1184.

Mason RA, Tauraso NM, Spertzel RO, Ginn RK. Yellow fever vaccine: direct challenge of monkeys given graded doses of 17D vaccine. *Appl Microbiol.* 1973; 25(4):539-544.

McAllister A, Arbetman AE, Mandl S, Peña-Rossi, Andino R. Recombinant yellow fever viruses are effective therapeutic vaccines for treatment of murine experimental solid tumors and pulmonary metastases. *J. Virol.* 2000; 74: 9197 – 9205

McMahon AW, Eidex RB, Marfin AA, Russell M, Sejvar JJ, Markoff L, *et al.* Neurologic disease associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of 15 cases. *Vaccine.* 2007; 25(10):1727-1734.

Mellado-Sánchez G, García-Machorro J, Sandoval-Montes C, Gutiérrez-Castañeda B, Rojo-Domínguez A, García-Cordero J, *et al.* A plasmid encoding parts of the dengue virus E and NS1 proteins induces an immune response in a mouse model. *Arch. Virol.* 2010; 155(6):847-856.

Menezes H. Protective effect of an avirulent (cultivated) strain of *Trypanosoma cruzi* against experimental infection in mice. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 1968; 10(1):1-4.

Millar AE, Kahn SJ. The SA85-1.1 protein of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase superfamily is a dominant T-cell antigen. *Infect. Immun.* 2000; 68(6):3574-3580.

Miller JD, van der Most RG, Akondy RS, Glidewell JT, Albott S, Masopust D, *et al.* Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity.* 2008; 28(5):710-722.

Miyahira Y, Takashima Y, Kobayashi S, Matsumoto Y, Takeuchi T, Ohyanagi-Hara M, *et al.* Immune responses against a single CD8+-T-cell epitope induced by virus vector vaccination can successfully control *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* 2005; 73(11):7356-7365.

Miyahira Y. *Trypanosoma cruzi* infection from the view of CD8+ T cell immunity--an infection model for developing T cell vaccine. *Parasitol. Int.* 2008; 57(1):38-48.

Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003; 100(12):6986-6991.

Monath TP, Heinz FX. Flavivirus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (editores). *Fields Virology*, Raven Press: Filadélfia, 3ª edição; 1996. P.961-1034.

Monath TP. Yellow fever. In: Plotkin S, Orenstein WA, editores. *Vaccines*. 3ª edição. Philadelphia: WB Saunders, 1999. P.815-80.

Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis.* 2001; 1(1):11-20.

Monath TP, Arroyo J, Miller C, Guirakhoo F. West Nile virus vaccine. *Curr Drug Targets Infect Disord.* 2001; 1(1):37-50.

Monath TP, Liu J, Kanesa-Thanan N, Myers GA, Nichols R, Deary A, *et al.* A live, attenuated recombinant West Nile virus vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006; 103(17):6694-6699.

Monath TP, Teuwen D, Cetron MS. Yellow fever. In: Plotkin S, Orenstein W (editores). Vaccines. 4ª edição. Philadelphia: Saunders; 2007. P. 1-218

Moretta A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. Nat Rev Immunol 2002; 2(12):957-64.

Mudd PA, Piaskowski SM, Neves PCC, Rudersdorf R, Kolar HL, Eernisse CM, *et al.* The live-attenuated yellow fever vaccine 17D induces broad and potent T cell responses against several viral proteins in Indian rhesus macaques--implications for recombinant vaccine design. Immunogenetics. 2010; 62(9):593-600.

Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. Nat. Rev. Microbiol. 2005; 3(1):13-22.

Müller U, Sobek V, Balkow S, Hölscher C, Müllbacher A, Museteanu C, *et al.* Concerted action of perforin and granzymes is critical for the elimination of *Trypanosoma cruzi* from mouse tissues, but prevention of early host death is in addition dependent on the FasL/Fas pathway. Eur. J. Immunol. 2003; 33(1):70-78.

Muñoz-Fernández MA, Fernández MA, Fresno M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. Eur. J. Immunol. 1992; 22(2):301-307.

Muylaert IR, Chambers TJ, Galler R, Rice CM. Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: effects on virus replication and mouse neurovirulence. Virology. 1996; 222(1):159-168.

Muylaert IR, Galler R, Rice CM. Genetic analysis of the yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. J. Virol. 1997; 71(1):291-298.

Neves PCDC, Matos DCDS, Marcovistz R, Galler R. TLR expression and NK cell activation after human yellow fever vaccination. Vaccine. 2009; 27(41):5543-5549.



Neves PCC, Rudersdorf RA, Galler R, Bonaldo MC, de Santana MG, Mudd PA, *et al.* CD8<sup>+</sup> gamma-delta TCR<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells produce IFN- $\gamma$  at 5-7 days after yellow fever vaccination in Indian rhesus macaques, before the induction of classical antigen-specific T cell responses. *Vaccine*. 2010; 28(51):8183-8188.

Nickell SP, Sharma D. *Trypanosoma cruzi*: roles for perforin-dependent and perforin-independent immune mechanisms in acute resistance. *Exp. Parasitol.* 2000 Apr;94(4):207-216.

Op De Beeck A, Rouillé Y, Caron M, Duvet S, Dubuisson J. The transmembrane domains of the prM and E proteins of yellow fever virus are endoplasmic reticulum localization signals. *J. Virol.* 2004; 78(22):12591-12602.

Padilla A, Xu D, Martin D, Tarleton R. Limited role for CD4<sup>+</sup> T-cell help in the initial priming of *Trypanosoma cruzi*-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Infect. Immun.* 2007; 75(1):231-235.

Pan AA, McMahon-Pratt D. Amastigote and epimastigote stage-specific components of *Trypanosoma cruzi* characterized by using monoclonal antibodies. Purification and molecular characterization of an 83-kilodalton amastigote protein. *J. Immunol.* 1989; 143(3):1001-1008.

Patkar CG, Kuhn RJ. Yellow Fever virus NS3 plays an essential role in virus assembly independent of its known enzymatic functions. *J. Virol.* 2008; 82(7):3342-3352.

Pereira VRA, Lorena VMB, Nakazawa M, Luna CF, Silva ED, Ferreira AGP, *et al.* Humoral and cellular immune responses in BALB/c and C57BL/6 mice immunized with cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens, in acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol. Res.* 2005; 96(3):154-161.

Perera R, Khaliq M, Kuhn RJ. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Res.* 2008; 80(1):11-22.

Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr. Opin. Microbiol.* 2008; 11(4):369-377.

Pierson TC, Diamond MS, Ahmed AA, Valentine LE, Davis CW, Samuel MA, *et al.* An infectious West Nile virus that expresses a GFP reporter gene. *Virology*. 2005; 334(1):28-40.

Planelles L, Thomas MC, Alonso C, López MC. DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. *Infect. Immun.* 2001; 69(10):6558-6563.

Poland JD, Calisher CH, Monath TP, Downs WG, Murphy K. Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bull. World Health Organ.* 1981; 59(6):895-900.

Post PR, de Carvalho R, da Silva Freire M, Galler R. The early use of yellow fever virus strain 17D for vaccine production in Brazil--a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2001; 96(6):849-857.

Power CA, Grand CL, Ismail N, Peters NC, Yurkowski DP, Bretscher PA. A valid ELISPOT assay for enumeration of ex vivo, antigen-specific, IFN $\gamma$ -producing T cells. *J. Immunol. Methods.* 1999; 227(1-2):99-107.

Pugachev KV, Guirakhoo F, Mitchell F, Ocran SW, Parsons M, Johnson BW, *et al.* Construction of yellow fever/St. Louis encephalitis chimeric virus and the use of chimeras as a diagnostic tool. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2004; 71(5):639-645.

Pulendran B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9(10):741-747.

Querec T, Bennouna S, Alkan S, Laouar Y, Gorden K, Flavell R, *et al.* Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J. Exp. Med.* 2006; 203(2):413-424.

Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D, *et al.* Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat. Immunol.* 2009; 10(1):116-125.

Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanović S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*. 1999; 50(3-4):213-219.

Reed W, Carroll J. The etiology of yellow fever: a supplemental note. 1902. *Mil Med*. 2001; 166(9 Suppl):62-66.

Reinhardt B, Jaspert R, Niedrig M, Kostner C, L'age-Stehr J. Development of viremia and humoral and cellular parameters of immune activation after vaccination with yellow fever virus strain 17D: a model of human flavivirus infection. *J. Med. Virol*. 1998; 56(2):159-167.

Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*. 1995; 375(6529):291-298.

Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science*. 1985; 229(4715):726-733.

Rice CM, Aebersold R, Teplow DB, Pata J, Bell JR, Vorndam AV, *et al*. Partial N-terminal amino acid sequences of three nonstructural proteins of two flaviviruses. *Virology*. 1986; 151(1):1-9.

Rice CM, Grakoui A, Galler R, Chambers TJ. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by *in vitro* ligation. *New Biol*. 1989; 1(3):285-296.

Rice CM. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editores. *Fields Virology*. Raven Press, Filadélfia, 3ª Ed v.2; 1996. P. 931-960.

Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature*. 1998; 393(6684):474-478.

Rodrigues MM, Ribeirão M, Pereira-Chioccola V, Renia L, Costa F. Predominance of CD4 Th1 and CD8 Tc1 cells revealed by characterization of the cellular immune response

generated by immunization with a DNA vaccine containing a *Trypanosoma cruzi* gene. *Infect. Immun.* 1999; 67(8):3855-3863.

Rodrigues MM, Ribeiro M, Boscardin SB. CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. *Immunol. Lett.* 2000; 73(1):43-50.

Rodrigues MM, Boscardin SB, Vasconcelos JR, Hiyane MI, Salay G, Soares IS. Importance of CD8 T cell-mediated immune response during intracellular parasitic infections and its implications for the development of effective vaccines. *An. Acad. Bras. Cienc.* 2003; 75(4):443-468.

Rodrigues MM, Alencar BCGD, Claser C, Tzelepis F. Immunodominance: a new hypothesis to explain parasite escape and host/parasite equilibrium leading to the chronic phase of Chagas' disease? *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2009a; 42(3):220-223.

Rodrigues MM, de Alencar BC, Claser C, Tzelepis F, Silveira EL, Haolla FA, *et al.* Swimming against the current: genetic vaccination against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2009b; 104 Suppl 1:281-287.

Rothman AL, Kurane I, Ennis FA. Multiple specificities in the murine CD4+ and CD8+ T-cell response to dengue virus. *J. Virol.* 1996; 70(10):6540-6546.

Rumyantsev AA, Zhang Z, Gao Q, Moretti N, Brown N, Kleanthous H, *et al.* Direct random insertion of an influenza virus immunologic determinant into the NS1 glycoprotein of a vaccine flavivirus. *Virology.* 2010; 396(2):329-338.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* 2<sup>a</sup> edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press: EUA, 1989.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1977; 74(12):5463-5467.

Santos AP, Matos DCS, Bertho AL, Mendonça SCF, Marcovistz R. Detection of Th1/Th2 cytokine signatures in yellow fever 17DD first-time vaccinees through ELISpot assay. *Cytokine*. 2008; 42(2):152-155.

Schenkman S, Eichinger D. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. *Parasitol. Today (Regul. Ed.)*. 1993; 9(6):218-222.

Schlesinger JJ, Brandriss MW, Monath TP. Monoclonal antibodies distinguish between wild and vaccine strains of yellow fever virus by neutralization, hemagglutination inhibition, and immune precipitation of the virus envelope protein. *Virology*. 1983; 125(1):8-17.

Schlesinger JJ, Brandriss MW, Walsh EE. Protection against 17D yellow fever encephalitis in mice by passive transfer of monoclonal antibodies to the nonstructural glycoprotein gp48 and by active immunization with gp48. *J. Immunol*. 1985; 135(4):2805-2809.

Schlesinger JJ, Brandriss MW, Cropp CB, Monath TP. Protection against yellow fever in monkeys by immunization with yellow fever virus nonstructural protein NS1. *J. Virol*. 1986; 60(3):1153-1155.

Schnapp AR, Eickhoff CS, Sizemore D, Curtiss R, Hoft DF. Cruzipain induces both mucosal and systemic protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. *Infect. Immun*. 2002 Sep;70(9):5065-5074.

Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol*. 2006; 22(12):583-588.

Sil BK, Dunster LM, Ledger TN, Wills MR, Minor PD, Barrett AD. Identification of envelope protein epitopes that are important in the attenuation process of wild-type yellow fever virus. *J. Virol*. 1992; 66(7):4265-4270.

Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect. Immun*. 1995; 63(12):4862-4867.

Silva ML, Espírito-Santo LR, Martins MA, Silveira-Lemos D, Peruhype-Magalhães V, Caminha RC, *et al.* Clinical and immunological insights on severe, adverse neurotropic and viscerotropic disease following 17D yellow fever vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010; 17(1):118-126.

Silva PAGC, Molenkamp R, Dalebout TJ, Charlier N, Neyts JH, Spaan WJM, *et al.* Conservation of the pentanucleotide motif at the top of the yellow fever virus 17D 3' stem-loop structure is not required for replication. *J. Gen. Virol.* 2007; 88(Pt 6):1738-1747.

Silveira A, Vinhaes M. Elimination of vector-borne transmission of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1999;94 Suppl 1:405-411.

Silveira ELV, Claser C, Haolla FAB, Zanella LG, Rodrigues MM. Novel protective antigens expressed by *Trypanosoma cruzi* amastigotes provide immunity to mice highly susceptible to Chagas' disease. *Clin. Vaccine Immunol.* 2008; 15(8):1292-1300.

Smith CM, Wilson NS, Waithman J, Villadangos JA, Carbone FR, Heath WR, *et al.* Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nat. Immunol.* 2004; 5(11):1143-1148.

Stefano I, Sato HK, Pannuti CS, Omoto TM, Mann G, Freire MS, Yamamura AMY, Vasconcelos PFC, Oselka GW, Weckz LW, Salgado MF, Noale LFO, Souza VAU. Recent immunization against measles does not interfere with the sero-response to yellow fever vaccine. *Vaccine.* 1999; 17:1042-1046.

Steindel M, Kramer Pacheco L, Scholl D, Soares M, de Moraes MH, Eger I, *et al.* Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 60(1):25-32.

Stephenson JR. Genetically modified viruses: vaccines by design. *Curr Pharm Biotechnol.* 2001; 2(1):47-76.

Stiasny K, Allison SL, Marchler-Bauer A, Kunz C, Heinz FX. Structural requirements for low-pH-induced rearrangements in the envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus. *J. Virol.* 1996; 70(11):8142-8147.

Stokes A, Bauer JH, Hudson NP. The transmission of yellow fever to *Macacus rhesus*. 1928. *Rev. Med. Virol.* 2001; 11(3):141-148.

Stoyanov CT, Boscardin SB, Deroubaix S, Barba-Spaeth G, Franco D, Nussenzweig RS, *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant yellow fever vaccine against the murine malarial parasite *Plasmodium yoelii*. *Vaccine.* 2010; 28(29):4644-4652.

Sun JC, Bevan MJ. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science.* 2003; 300(5617):339-342.

Takayama E, Ono T, Carnero E, Umemoto S, Yamaguchi Y, Kanayama A, *et al.* Quantitative and qualitative features of heterologous virus-vector-induced antigen-specific CD8+ T cells against *Trypanosoma cruzi* infection. *Int. J. Parasitol.* 2010; 40(13):1549-1561.

Takeuchi O, Akira S. Innate immunity to virus infection. *Immunol. Rev.* 2009; 227(1):75-86.

Tao D, Barba-Spaeth G, Rai U, Nussenzweig V, Rice CM, Nussenzweig RS. Yellow fever 17D as a vaccine vector for microbial CTL epitopes: protection in a rodent malaria model. *J Exp Med.* 2005; 201(2), 201-209.

Tarleton RL, Grusby MJ, Postan M, Glimcher LH. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int. Immunol.* 1996; 8(1):13-22.

Tarleton RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* 2001; 31(5-6):550-554.

Tarleton RL. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Opin. Immunol.* 2007; 19(4):430-434.

Teixeira ARL, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in chagas disease--a review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2006; 101(5):463-491.

Theiler M, Smith HH. The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. J. Exp. Med. 1937; 65(6):787-800.

Turner C, Witwer C, Hofacker IL, Stadler PF. Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. J. Gen. Virol. 2004; 85(Pt 5):1113-1124.

Todd DJ, Lee A, Glimcher LH. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. Nat. Rev. Immunol. 2008; 8(9):663-674.

Tomlinson S, Pontes de Carvalho LC, Vandekerckhove F, Nussenzweig V. Role of sialic acid in the resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. J. Immunol. 1994; 153(7):3141-3147.

Tsuji M, Zavala F. T cells as mediators of protective immunity against liver stages of Plasmodium. Trends Parasitol. 2003; 19(2):88-93.

Tzelepis F, de Alencar BCG, Penido MLO, Gazzinelli RT, Persechini PM, Rodrigues MM. Distinct kinetics of effector CD8+ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice. Infect. Immun. 2006;74(4):2477-2481.

Tzelepis F, Persechini PM, Rodrigues MM. Modulation of CD4(+) T cell-dependent specific cytotoxic CD8(+) T cells differentiation and proliferation by the timing of increase in the pathogen load. PLoS ONE. 2007;2(4):e393.

Tzelepis F, de Alencar BCG, Penido MLO, Claser C, Machado AV, Bruna-Romero O, *et al.* Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8+ T cells leading to immunodominance. J. Immunol. 2008; 180(3):1737-1748.

van der Most RG, Harrington LE, Giuggio V, Mahar PL, Ahmed R. Yellow fever virus 17D envelope and NS3 proteins are major targets of the antiviral T cell response in mice. Virology. 2002; 296(1):117-124.



Van Overtvelt L, Andrieu M, Verhasselt V, Connan F, Choppin J, Vercruysse V, *et al.* *Trypanosoma cruzi* down-regulates lipopolysaccharide-induced MHC class I on human dendritic cells and impairs antigen presentation to specific CD8(+) T lymphocytes. *Int. Immunol.* 2002; 14(10):1135-1144.

Vasconcelos JRC, Boscardin SB, Hiyane MI, Kinoshita SS, Fujimura AE, Rodrigues MM. A DNA-priming protein-boosting regimen significantly improves type 1 immune response but not protective immunity to *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain. *Immunol. Cell Biol.* 2003; 81(2):121-129.

Vasconcelos JR, Hiyane MI, Marinho CRF, Claser C, Machado AMV, Gazzinelli RT, *et al.* Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum. Gene Ther.* 2004; 15(9):878-886.

Vasconcelos PF, Luna EJ, Galler R, Silva LJ, Coimbra TL, Barros VL, *et al.* Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases. *Lancet.* 2001; 358(9276):91-97.

Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect. Immun.* 1994; 62(11):5177-5182.

Viotti R, Vigliano C, Armenti H, Segura E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am. Heart J.* 1994; 127(1):151-162.

Wang L, Goschnick MW, Coppel RL. Oral immunization with a combination of Plasmodium yoelii merozoite surface proteins 1 and 4/5 enhances protection against lethal malaria challenge. *Infect. Immun.* 2004; 72(10):6172-6175.

Wei Y, Qin C, Jiang T, Li X, Zhao H, Liu Z, *et al.* Translational regulation by the 3' untranslated region of the dengue type 2 virus genome. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009; 81(5):817-824.

Westaway EG, Mackenzie JM, Khromykh AA. Kunjin RNA replication and applications of Kunjin replicons. In: Chambers TJ, Monath TP, editores. *Advances in Virus Research, The Flaviviruses: Detection, diagnosis and vaccine development.* Elsevier Academic Press: California; vol 59; 2003. P: 235 – 289.

Williams MA, Tyznik AJ, Bevan MJ. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature.* 2006; 441(7095):890-893.

Winkler G, Randolph VB, Cleaves GR, Ryan TE, Stollar V. Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. *Virology.* 1988; 162(1):187-196.

Winkler G, Maxwell SE, Ruemmler C, Stollar V. Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. *Virology.* 1989; 171(1):302-305.

Wizel B, Palmieri M, Mendoza C, Arana B, Sidney J, Sette A, *et al.* Human infection with *Trypanosoma cruzi* induces parasite antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Clin. Invest.* 1998; 102(5):1062-1071.

World Health Organization (WHO): Tropical Disease Research: progress 2003-2004. In: *Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases; Programme Report 17 G ed.*; 2005.

World Health Organization. Yellow fever, 1998-1999. *Wkly Epidem Rec* 2000; 75:322-7.

Wrightman RA, Dawson BD, Fouts DL, Manning JE. Identification of immunodominant epitopes in *Trypanosoma cruzi* trypomastigote surface antigen-1 protein that mask protective epitopes. *J. Immunol.* 1994; 153(7):3148-3154.

Wrightsmann RA, Manning JE. Paraflagellar rod proteins administered with alum and IL-12 or recombinant adenovirus expressing IL-12 generates antigen-specific responses and protective immunity in mice against *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine*. 2000; 18(14):1419-1427.

Wu K, Wu C, Tsao Y, Kuo T, Lou Y, Lin C, *et al*. Structural basis of a flavivirus recognized by its neutralizing antibody: solution structure of the domain III of the Japanese encephalitis virus envelope protein. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(46):46007-46013.

Yewdell JW, Haeryfar SMM. Understanding presentation of viral antigens to CD8+ T cells in vivo: the key to rational vaccine design. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; 23:651-682.

Yon C, Teramoto T, Mueller N, Phelan J, Ganesh VK, Murthy KHM, *et al*. Modulation of the nucleoside triphosphatase/RNA helicase and 5'-RNA triphosphatase activities of Dengue virus type 2 nonstructural protein 3 (NS3) by interaction with NS5, the RNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(29):27412-27419.

Youn S, Cho H, Fremont DH, Diamond MS. A short N-terminal peptide motif on flavivirus nonstructural protein NS1 modulates cellular targeting and immune recognition. *J. Virol.* 2010; 84(18):9516-9532.

Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(3):1053-1057.

Zanotto PMA. *et al*. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 93; 1996. P. 548-553.

Zuo Z, Liew OW, Chen G, Chong PCJ, Lee SH, Chen K, *et al*. Mechanism of NS2B-mediated activation of NS3pro in dengue virus: molecular dynamics simulations and bioassays. *J. Virol.* 2009; 83(2):1060-1070.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Meios, soluções e reagentes

#### Acetato de amônia 7,5 M:

Dissolver 28,87 g de acetato de amônia em água bidestilada q.s.p. para 50 mL e estocar a -20° C.

#### Agarose para análise em eletroforese:

Misturar 0,8 g (0,8%) ou 1,0 g (1%) de agarose (Promega) a 100 mL de tampão TAE 1 X. Aquecer em aparelho de microondas até toda a agarose dissolver.

#### Bicarbonato de sódio 4,4% gaseificado (NaHCO<sub>3</sub>):

Misturar 44 g de NaHCO<sub>3</sub> com 1 mL de vermelho de fenol 1 % e água bidestilada q.s.p. 1000 mL. Adicionar gelo seco com agitação até a solução atingir pH de 7.0 - 7.2. Fazer alíquotas de 20 mL esterilizar por autoclavagem a 121° C por 15 min e estocar a 4° C.

#### Carboximetilcelulose (CMC):

**Solução 3 %:** homogeneizar 3 g de CMC em água bidestilada q.s.p. para 100 mL batendo a mistura no liquidificador. Autoclavar por 20 min a 121° C e armazenar à temperatura ambiente.

**CMC 3 % com meio de Earle 199 completo 5% de NaHCO<sub>3</sub>:** para cada 100 mL, adicionar a 90 mL de CMC 3% estéril, 10 mL de meio 199 com sais de Earle 10 X, 5 mL de soro fetal bovino inativado, 1 mL de sulfato de gentamicina (4 mg/mL), 100 µl de fungizona (500 mg/mL) e 5 mL de NaHCO<sub>3</sub> 4,4 %.

**Cloreto de cálcio (100 mM):** pesar 1,47 g e adicionar 100 mL de água Milli-Q estéril. Autoclavar por 15 min à 121°C e estocar a 4° C.

#### Cristal Violeta:

**Solução estoque 2%:** misturar 10 g de *crystal* violeta em pó, 100 mL de metanol e água destilada q.s.p. 500 mL.

**Solução de uso 0,02%:** misturar 10 mL da solução estoque em 1 L de água.

**DEPC:**

Adicionar DEPC em água bidestilada para uma concentração de 0,01%. Autoclavar a mistura por 15 min a 121°C.

**EDTA 0,5 M pH 8,9:**

Dissolver 18,61 g de EDTA em água bidestilada q.s.p. para 100 mL, ajustar a pH 8.0 com NaOH 1 N e estocar a 4° C.

**Formol 10 %:** misturar 1 L de formaldeído a 36 % com 2,6 L de água.

**Meio 199 com sais de Earle**

**Meio Earle completo:** para cada 100 mL de meio, adicionar a 90 mL de água bidestilada, 10 mL de meio 199 com sais de Earle 10 X, 5 mL de soro fetal bovino inativado (Cultilab), 1 mL de sulfato de gentamicina (4 mg/mL) e 2,5 mL (sistema aberto) ou 5 mL (sistema fechado) de NaHCO<sub>3</sub> 4,4 % pH 7,0.

**Meio Earle (sem antibiótico) para inóculo de camundongos:** para cada 100 mL de meio, adicionar a 90 mL de água bidestilada, 10 mL de meio 199 com sais de Earle 10 X, 5 mL de soro fetal bovino inativado (Cultilab) e 5 mL de NaHCO<sub>3</sub> 4,4 % pH 7,0. Todo material é estéril e preparado na hora do inóculo.

**Meio Earle com HEPES 1M:** para cada 100 mL de meio, adicionar a 90 mL de água bidestilada, 10 mL de meio 199 com sais de Earle 10 X, 5 mL de soro fetal bovino inativado (Cultilab), 1 mL de sulfato de gentamicina (4 mg/mL), 0,5 mL de NaHCO<sub>3</sub> 4,4 % pH 7,0 e 2,5 mL de solução de HEPES 1M.

**Meio RPMI 1640 (Invitrogen) completo:** para cada 100 mL de meio, adicionar em condições estéreis 10% ou 1% de soro fetal bovino (Cultilab), 1% de L-Glutamina (2 mM), 1% NEAS (non-essential aminoacids, 1X), 1% de piruvato (1X), 1% de vitamina (1X) (fornecidos pela Sigma), 50 µg/mL de gentamicina, 0,1% de β-mercaptoetanol (0,01 M) e 1% de solução de HEPES (1 M).

**Meio LB (Luria-Bertani):**

**Líquido:** dissolver 10 g de tripton, 5 g de extrato de levedura e 10 g de NaCl em 900 mL de água destilada. Agitar a solução para homogeneizar. Ajustar o pH para 7,0 com uma solução 5 N de NaOH e o volume final para um litro com água deionizada. Esterilizar a solução por autoclavação durante 20 min.

**Sólido:** este meio é idêntico ao LB líquido adicionando-se apenas 15 g de ágar a cada litro antes da autoclavação.

**Paraformaldeído em tampão fosfato:** dissolver 4g (4%) ou 1g (1%) de paraformaldeído em água destilada aquecida q.s.p. para 50 mL. Adicionar 1 ou 2 gotas de NaOH 1 N, deixar esfriar e adicionar 50 mL de tampão fosfato dibásico (0,1M, pH 7,2). Água e tampão fosfato devem estar sempre na proporção 1:1.

**PBS (solução salina tamponada com fosfato)**

**PBS 10 X pH 7,4:** misturar 80 g de NaCl, 20 g de KCl, 14,4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O e água bidestilada q.s.p. para 1 L. Ajustar pH para 7,4, esterilizar por autoclavação por 15 min e armazenar à temperatura ambiente (Sambrook *et al.*, 1989).

**PBS-DEPC 1 X:** misturar 80 g de NaCl, 20 g de KCl, 14,4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O e água tratada com DEPC (0,01%) q.s.p. para 1 L. Ajustar pH para 7,4, esterilizar por autoclavação por 15 min e armazenar à temperatura ambiente.

**PBS-BSA:** pesar 5 g (1%) ou 20 g (4%) de BSA para 500 mL de PBS 1X qsp.

**PBS-Tween 0,05%:** adicionar 50 µL de detergente Tween (Sigma) a cada 100 mL de PBS pH 7,4 e misturar.

**Solução hemolisante:** adicionar solução de NH<sub>4</sub>Cl (0,14 mol/L) à solução de Tris (0,017 mol/L) em pH 7,2. Autoclavar a mistura por 15 min a 121 °C.

**Solução de permeabilização 0,5% Triton X-100 em PBS:** para cada 50 mL de PBS pH 7,4 estéril adicionar 1 g de Triton X- 100.

**Soro Fetal Bovino/SFB (Cultilab):** inativar a 56° C por 30 min, aliquotar (5 mL) e armazenar a 4°C.

**Sulfato de gentamicina (garamicina) 5 mg/mL:** misturar cinco ampolas (2 mL cada na concentração de 50 mg/mL) de garamicina a 90 mL de água bidestilada estéril.

**Tampão TAE:**

**Solução de estoque 50 X:** dissolver 242 g de Tris base em 57,1 mL de ácido acético glacial, 100 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0 e água destilada q.s.p. para 1 L. Estocar à temperatura ambiente.

**Solução de uso 1 X:** misturar 40 mL da solução estoque em água destilada q.s.p. para 2 litros.

**TE pH 7,6:** para 1 L do tampão deve-se colocar 10 mM de Tris HCl (10 mL Tris 1M pH 7,6), 1 mM de EDTA (2 mL EDTA 0,5M pH 8,0) e água bidestilada q.s.p. para 1 L. Autoclavar a solução por 20 min a 121° C e estocar a -20° C.

**Tris HCl 1 M (pH 7,6):** dissolver 12,11 g de tris base em água bidestilada q.s.p. para 100 mL, ajustar o pH para 7,6 com HCl e estocar a 4° C.

**Tripsina/verseno:** preparar imediatamente antes do uso misturando 0,5 ml de tripsina estoque (5 mg/mL) a 50 mL de verseno.

**Verseno:**

**Solução estoque 5 %:** misturar 50 g de EDTA, 0,1 mL de vermelho de fenol 1 % e água bidestilada q.s.p. para 1000 mL. Acertar a pH 7,6 com NaOH e estocar à temperatura ambiente.

**Solução de uso 0,1 %:** misturar 20 mL da solução estoque 5 %, 0,1 mL de vermelho de fenol 1 % e PBS pH 7,6 q.s.p. para 1000 mL.

**9.2 Artigo publicado no dia 18 de março de 2011 em revista indexada *Virology Journal***