

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Saúde Pública

Sabrina Ribeiro de Almeida Queiroz

**ESTRATÉGIAS MOLECULARES PARA
UTILIZAÇÃO DO VÍRUS DA FEBRE
AMARELA COMO VETOR VACINAL**

RECIFE
2011

Sabrina Ribeiro de Almeida Queiroz

**ESTRATÉGIAS MOLECULARES PARA UTILIZAÇÃO DO VÍRUS DA FEBRE
AMARELA COMO VETOR VACINAL**

Tese apresentada ao Curso de
Doutorado em Saúde Pública do
Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães, Fundação Oswaldo
Cruz para a obtenção do grau
de Doutor em Ciências.

Orientadora: Laura Helena Vega Gonzales Gil, PhD.

Co-orientadores: Ernesto Torres de Azevedo Marques Júnior, PhD.

Giovani Rota Bertani, PhD.

Recife

2011

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Q3p Queiroz, Sabrina Ribeiro de Almeida.
Estratégias moleculares para utilização do
vírus da febre amarela como vetor vacinal /
Sabrina Ribeiro de Almeida Queiroz. - Recife: S.
R. de A. Queiroz, 2011.
113 f. : il., tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Saúde Pública) — Centro de
Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz,
2011.

Orientadora: Laura Helena Vega Gonzales Gil; Co-
orientadores: Ernesto de Azevedo Marques Júnior,
Giovani Rota Bertani.

1. Vírus da febre amarela – genética. 2. Vacinas
sintéticas. 3. DNA recombinante. 4. Replicon. I. Gil,
Laura Helena Vega Gonzáles. II. Marques Júnior, Ernesto
de Azevedo. III. Bertani, Giovani Rota. IV. Título.

CDU 615.371

Sabrina Ribeiro de Almeida Queiroz

**ESTRATÉGIAS MOLECULARES PARA UTILIZAÇÃO DO VÍRUS DA FEBRE
AMARELA COMO VETOR VACINAL**

Tese apresentada ao Curso de
Doutorado em Saúde Pública do
Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães, Fundação Oswaldo
Cruz para a obtenção do grau
de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 13/05/2011

BANCA EXAMINADORA

Dra. Laura Helena Gonzalez Vega Gil
Orientadora

Dra. Marli Tenório Cordeiro
Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco e CPq AM/FIOCRUZ

Dr. Eduardo Furtado Flores
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM/RS

Dra. Sílvia Maria Lucena Montenegro
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Maria Alice Varjal Melo Santos
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ

Dedico este trabalho aos meus pais, Zado e Meirinha,
ao meu esposo Alessandro.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem Ele nada disso teria sido possível;

Aos meus pais, Zado e Meirinha, por incentivarem os meus estudos, pela compreensão dos anos de ausência física e pelo alicerce familiar;

Ao meu esposo, pela compreensão das ausências e por ter sido (e ser) UM comigo em todas as situações;

Às minhas irmãs, Bruna e Cinthia, por me incentivarem a ser a irmã mais velha, me motivando a superar todos os obstáculos que atravessam o meu caminho;

À minha orientadora e amiga, Laura Gil, pela convivência de respeito e amizade, pelos ensinamentos e incentivos;

Ao dr. Ernesto Marques, pelo exemplo de determinação e pela oportunidade de trabalhar no LaViTE, um laboratório de estrutura diferenciada;

Ao dr. Giovani Bertani, pela amizade e atenção dispensada às correções da tese e artigo;

À amiga, Fernanda Possato, por me fazer ser mais “eu” diante das dificuldades;

Aos amigos, Andréia Rangel, Amanda, Jefferson, Sandra, Geórgia e José Valter pela cooperação nos experimentos e por me fazer acreditar que somos mais quando trabalhamos em equipe;

Às amigas Verônica e Joelma, pelos momentos de fé partilhados;

À família LaViTE, por terem criado um ambiente de trabalho que me fez sentir em casa durante esses últimos quatro anos;

Ao CPqAM e CNPq pela concessão da bolsa de doutorado;

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

"Um sonho é somente um sonho se sonhamos a sós, mas se sonharmos com nossos amigos será o começo de algo real."

Don Hélder Câmara

QUEIROZ, Sabrina Ribeiro de Almeida. Estratégias moleculares para utilização do vírus da febre amarela como vetor vacinal. 2011. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

RESUMO

A vacina da febre amarela 17D (YFV-17D) é bastante segura e uma dose única confere imunidade potente e duradoura. Por essas e outras características, diferentes tecnologias têm sido propostas para a utilização da cepa 17D como vetor vacinal. Estratégias promissoras para o desenvolvimento de novas vacinas têm se baseado na construção de quimeras YFV-17D com inserção de sequências heterólogas e produção em larga escala de replicons empacotados em partículas pseudo-infecciosas (PPIs), no entanto, ainda não existe um consenso da melhor estratégia a ser utilizada para esses fins. O presente estudo teve por objetivo avaliar diferentes estratégias de construção para a utilização do YFV-17D como vetor vacinal. Para isso foram construídos duas quimeras do YFV-17D com inserção de um gene repórter YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) na junção E/NS1 e dois replicons subgenômicos do YFV-17D expressando o gene repórter luciferase. Para a produção de PPIs foi desenvolvida a linhagem HEK-YFV-prM/E-opt. O YFV-YFP-SSE revelou instabilidade genética com perda do gene YFP e correlação negativa entre expressão de proteínas virais e do gene repórter. O YFV-YFP-DENV1linker mostrou-se estável geneticamente com expressão eficiente de YFP e proteínas virais, e mostrou-se ser o mais adequado para ser utilizado como vetor viral. Os replicons do YFV-17D mostraram-se funcionais e capazes de expressar eficientemente o gene heterólogo. E, embora a linhagem HEK-YFV-prM/E-opt tenha expressado as proteínas estruturais prM e E eficientemente, poucas partículas pseudo-infecciosas foram produzidas. Diante do exposto, as diferentes estratégias de manipulação genética do YFV avaliadas neste trabalho constituem ferramentas viáveis e aplicáveis ao processo de desenvolvimento de vacinas, havendo, porém, necessidade de otimização dessas estratégias para assegurar maiores segurança e eficácia.

Palavras-chave: Vírus da febre amarela – genética. Vacinas sintéticas. DNA recombinante. Replicon.

QUEIROZ, Sabrina Ribeiro de Almeida. Molecular strategies to use the yellow fever virus as a vaccine vector. 2011. Thesis (Doctorate in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

ABSTRACT

The yellow fever vaccine 17D (YFV-17D) is safe and a single dose confers lasting and powerful immunity. For these, different technologies have been proposed for the use of YF-17D strain as a vaccine vector. Promising strategies for the development of new vaccines has been based on chimeric YFV-17D with insertion of heterologous genes and subgenomic replicons packaged into pseudo-infectious particles (PIPs). However, there is still no consensus in the best strategy to be used for such purposes. This study aimed to evaluate different strategies for building for the use of YFV-17D as a vector vaccine. For that were constructed two chimeric YFV-17D with insertion of a reporter gene YFP (yellow fluorescent protein) at E/NS1 junction and two subgenomic replicons of YFV-17D expressing the luciferase reporter gene. For the production of PIPs a recombinant cell line were developed (HEK-YFV-prM/E-opt). The YFV-YFP-SSE showed genetic instability with loss of the YFP gene and negative correlation between expression of viral proteins and reporter gene. The YFV-YFP-DENV1linker proved to be genetically stable with efficient expression of YFP and viral proteins, and proved to be the most suitable for use as a viral vector. The replicons of YFV-17D were shown to be functional and able to efficiently express heterologous gene. And although the cell line HEK-YFV-prM/E-opt has expressed efficiently structural viral proteins prM and E, a few of pseudoinfectious particles were produced. In this light, the different strategies of genetic manipulation of YFV measured in this study are feasible and applicable tools to the process of vaccine development, however, the optimization of these strategies is important to ensure greater safety and efficacy.

Keywords: Yellow fever virus - genetic. Synthetic vaccines. Recombinant DNA. Replicon

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do genoma e do processamento da poliproteína do YFV	22
Figura 2	Representação esquemática da proteína E dos <i>Flavivirus</i>	23
Figura 3	Ciclos de transmissão da febre amarela	26
Figura 4	Áreas de risco de infecção pelo YFV	27
Figura 5	Distribuição geográfica do <i>Aedes aegypti</i> nas Américas nos anos 30, 70 e em 2004	28
Figura 6	Distribuição da febre amarela por áreas de recomendação vacinal no Brasil	29
Figura 7	Fluxograma esquemático da metodologia empregada	43
Figura 8	Representação esquemática da construção do vírus YFV-YFP-DENV1linker	44
Figura 9	Representação esquemática da construção do vírus YFV-YFP-SSE	48
Figura 10	Representação esquemática da construção do replicon monocistrônico repYF-17D-Luc	53
Figura 11	Representação esquemática da construção do replicon bicistrônico repYF-17D-LucIRES	55
Figura 12	Mapa do plasmídeo pCDNA-YFV-prM/E-opt elaborado pelo programa Ape-A plasmid Editor v1.10.4	58
Figura 13	Confirmação da construção do vírus YFV-YFP-DENV1linker por recombinação homóloga em levedura	64
Figura 14	Representação esquemática do genoma dos vírus YFV-YFP-DENV1linker: clones 1 e 3	66
Figura 15	Avaliação da estabilidade do vírus YFV-YFP-DENV1linker clone 3	67
Figura 16	Replicação do vírus YFV-YFP-DENV1linker clone 3	68
Figura 17	Curvas de replicação do vírus YFV-YFP-DENV1linker clone 3	69
Figura 18	Confirmação da construção do vírus YFV-YFP-SSE por	

	recombinação homóloga em levedura	71
Figura 19	Representação esquemática do genoma dos vírus YFV-YFP-SSE clones 1 e 2	72
Figura 20	Avaliação da estabilidade do vírus YFV-YFP-SSE clone 1	73
Figura 21	Replicação do vírus YFV-YFP-SSE clone 1	74
Figura 22	Curvas de replicação do vírus YFV-YFP-SSE clone 1	75
Figura 23	Confirmação da construção do replicon repYF-17D-Luc por recombinação homóloga em levedura	76
Figura 24	Replicação do replicon subgenômico repYF-17D-Luc em células BHK21	77
Figura 25	Replicação do replicon subgenômico repYF-17D-LucIRES clone em células BHK21	78
Figura 26	Expressão de proteínas estruturais prM e E do YFV pela linhagem celular HEK293-YFV-prM/E-opt	79
Figura 27	Caracterização da linhagem celular HEK293-YFV-prM/E-opt	80
Figura 28	Trans-empacotamento do replicon repYF-17D-LucIRES pela linhagem celular HEK293-YFV-prM/E-opt clone 16	81
Figura 29	Diagrama esquemático da organização das proteínas E e NS1 na membrana celular	83
Figura 30	Representação esquemática da estratégia de trans-empacotamento do replicon repYF-17D-LucIRES por uma linhagem celular recombinante	91

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	<i>Primers</i> utilizados na construção do vírus YFV-YFP-DENV1linker	46
Quadro 2	<i>Primers</i> utilizados na construção do vírus YFV-YFP-SSE	48
Quadro 3	<i>Primers</i> utilizados na construção do replicon monocistrônico repYF-17D-Luc	54
Quadro 4	<i>Primers</i> utilizados na construção do replicon bicistrônico repYF-17D-LucIRES	56
Quadro 5	Diferenças entre as sequências do plasmídeo pBSC-YFV-17D-YFP-DENV1linker e do vírus YFV-17D-YFP-DENV1linker clone 3	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácidos
BHK21	<i>Baby hamster kidney</i>
C	Proteína do capsídeo
CIAP	Fosfatase alcalina
C-terminal	Carboxi-terminal
DENV	Vírus da dengue (<i>Dengue virus</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimetil-sulfóxido (<i>Dimethyl sulfoxide</i>)
DO	Densidade ótica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E	Proteína do envelope
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>fluorescein isothiocyanate</i>)
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
HEK	<i>Human embrionic kidney</i>
IFI	Imunofluorescência indireta
IRES	Sítio interno para a ligação do ribossomo (<i>internal ribosome entry site</i>)
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
JEV	Vírus da encefalite japonesa (<i>Japanese encephalitis virus</i>)
kb	Kilobase
Luc	Luciferase
M	Proteína da membrana
MEM	Meio mínimo essencial (<i>minimal essential medium</i>)
MOI	Multiplicidade de infecção (<i>Multiplicity of infection</i>)
N-terminal	Amino-terminal
NS	Proteína não-estrutural
NTP	Nucleotídeo trifosfato
ORF	Fase aberta de leitura (<i>open reading frame</i>)
PB	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salina (<i>phosphate buffered saline</i>)

PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PPI	Partícula pseudo-infecciosa
prM	Proteína precursora pré-membrana
<i>NarI</i>	Enzima de restrição
RNA	Ácido ribonucléico
RE	Retículo endoplasmático
RSP	Partícula subviral recombinante (<i>recombinant subviral particle</i>)
SSE	Sequência sinal do envelope (<i>signal sequence envelope</i>)
SFB	Soro fetal bovino (<i>fetal bovine serum</i>)
TBEV	Vírus da encefalite transmitida pelo carrapato (<i>Tick-borne encephalitis virus</i>)
UTR	Região não codificadora (<i>untranslated region</i>)
WNV	Vírus do oeste do Nilo (<i>West Nile virus</i>)
YF	Febre amarela (<i>Yellow fever</i>)
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>
YFV-17D	Vírus da febre amarela cepa 17D

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Histórico	17
1.1.1 Febre amarela no Brasil	19
1.2 O vírus da febre amarela	20
1.2.1 Classificação	20
1.2.2 Estrutura e organização gênica..	21
1.2.3 Ciclo replicativo	24
1.3 Aspectos epidemiológicos	25
1.3.1 Transmissão	25
1.3.2 Distribuição geográfica	27
1.4 Manifestações clínicas da febre amarela	29
1.5 Tratamento	30
1.6 Controle e prevenção	31
1.6.1 A vacina da febre amarela 17D	31
1.6.1.1 <i>Aplicações da cepa 17D do vírus da febre amarela como vetor vacinal</i>	33
2 JUSTIFICATIVA	40
3 HIPÓTESE	41
4 OBJETIVOS	42
5 MATERIAIS E MÉTODOS	43
5.1 Cultivo de células e vírus	43
5.2 Clonagem das quimeras YFV-17D pela recombinação homóloga em levedura	44
5.2.1 Construção do vírus YFV-YFP-DENV1linker	44
5.2.1.1 <i>Preparação do vetor</i>	45
5.2.1.2 <i>Reação de PCR para a recombinação</i>	45
5.2.1.3 <i>Transformação de leveduras</i>	46
5.2.1.4 <i>Extração de DNA de levedura e confirmação dos clones</i>	47
5.2.2 Construção do vírus YFV-YFP-SSE	47
5.3 Caracterização <i>in vitro</i> das quimeras virais YFV-17D	49

5.3.1 PCR do genoma completo e transcrição <i>in vitro</i>	49
5.3.2 Eletroporação do RNA viral em células BHK21	50
5.3.3 Ensaio de fluorescência e imunofluorescência indireta	50
5.3.4 Extração de RNA	51
5.3.5 Transcrição reversa e PCR	51
5.3.6 Sequenciamento	52
5.3.7 Curva de replicação e caracterização de placas.....	52
5.4 Construção dos replicons subgenômicos do YFV-17D expressando o gene repórter luciferase (Luc)	53
5.4.1 Construção do replicon monocistrônico repYF-17D-Luc	53
5.4.1.1 Amplificação dos fragmentos de recombinação por PCR, e digestão do vetor pBSC-repYF-17D	53
5.4.1.2 Transformação da levedura e extração de DNA plasmideal de levedura	54
5.4.1.3 Transformação e extração de DNA plasmideal de bactérias	54
5.4.2 Construção do replicon bicistrônico repYF-17D-LucIRES.....	55
5.5 Caracterização dos replicons repYF-17D-Luc e repYF- 17D-LucIRES	57
5.5.1 Teste de atividade luciferase	57
5.6 Desenvolvimento de uma linhagem celular expressando os genes estruturais prM e E do YFV	57
5.6.1 Otimização e síntese da sequência dos genes prM e E do YFV para expressão em células eucariotas	57
5.6.2 Transformação de <i>E. coli</i> e confirmação de clonagem	58
5.6.3 Eletroporação de células HEK293 e seleção das células transformadas	59
5.6.4 Seleção dos clones por diluição limitante	59
5.7 Caracterização da linhagem celular HEK293-YFV-prM/E- opt	59
5.7.1 Imunofluorescência indireta	59
5.7.2 Curvas de multiplicação celular	60
5.7.3 Citometria de fluxo	60
5.7.4 Concentração das partículas subvirais recombinantes	

(RSPs)	61
5.7.5 <i>Western blotting</i>	61
5.7.6 Trans-empacotamento	62
5.7.6.1 <i>Eletroporação de células HEK293-YFV-prM/E-opt</i>	62
5.7.6.2 <i>Análise da replicação de PPIs</i>	63
6 RESULTADOS	64
6.1 Construção vetores virais	64
6.1.2 Construção e caracterização da construção YFV-YFP-DENV1linker	64
6.1.3 Construção e caracterização do vetor YFV-YFP-SSE	70
6.2 Construção dos replicons subgenômicos do YFV	75
6.2.1 Construção e caracterização do replicon monocistrônico repYF-17D-Luc	75
6.2.2 Construção e caracterização do replicon bicistrônico repYF-17D-LucIRES	77
6.3 Desenvolvimento da linhagem celular HEK293-YFV-prM/E-opt	78
7 DISCUSSÃO	82
8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	95
9 CONCLUSÃO	96
10 PERSPECTIVAS	97
REFERÊNCIAS	98
ANEXO A – Parecer do CEP/CPqAM	113

1 INTRODUÇÃO

A Febre Amarela (*Yellow fever* - YF) é uma arbovirose endêmica nas regiões tropicais da África e Américas, causando surtos isolados ou epidemias de impacto variável em saúde pública. Estima-se que mais de 900 milhões de pessoas vivam em áreas de risco. Na África, onde apresenta maior disseminação, a doença é endêmica em 34 países. Na América do Sul, nos últimos 20 anos, sua ocorrência tem sido registrada em nove países: Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Paraguai, Peru, Venezuela e Argentina.

A YF é considerada uma das doenças mais letais e temidas nas Américas. A sua ocorrência está associada a um amplo espectro de sinais e sintomas, que variam de moderados a graves e morte. As taxas de mortalidade mundial são elevadas, situando-se entre 5 a 10% e as taxas de letalidade dos casos graves são maiores e, no Brasil, oscilam entre 40 e 60%.

A vacina viva atenuada 17D, desenvolvida na década de 30, mudou a história da doença no mundo e constitui a medida mais importante de prevenção da YF. Essa vacina foi usada como base para o desenvolvimento de outras vacinas atenuadas e sua importância em salvar milhares de vida em todo o mundo conferiu ao pesquisador Theiler, responsável pelo seu desenvolvimento, o Prêmio Nobel de Medicina em 1951. A vacina da YF é considerada muito segura e uma dose única confere proteção por pelo menos 10 anos, e possivelmente por toda a vida. Uma imunidade protetora é conferida em 95% das pessoas vacinadas num período de uma semana, e embora alguns efeitos adversos tenham sido relatados após imunizações com a vacina 17D, não há comprometimento da sua eficácia e segurança.

Baseado na segurança e confiabilidade da vacina YF-17D, ainda hoje essa cepa vacinal tem servido de modelo para o desenvolvimento de novas vacinas e diferentes tecnologias têm sido propostas para a utilização do vírus da YF (*Yellow fever virus* - YFV) 17D como vetor vacinal.

1.1 Histórico

A YF teve origem na África e foi importada para a Europa e Américas em consequência do tráfico de escravos entre esses continentes (BARRETT; MONATH, 2003). O primeiro relato epidêmico no hemisfério oeste foi durante o ano de 1648 em Yucatan, México, embora já tivesse se manifestado no Caribe em 1498 (GUBLER; KUNO; MARHOFF, 2007). Durante os séculos XVII, XVIII, XIX e início do século XX epidemias devastadoras ocorreram nas regiões tropicais das Américas, cidades costeiras da América do Norte e na Europa (TOMLINSON; HODGSON, 2005).

Embora muitos aspectos da doença permanecessem desconhecidos até o século XIX, algumas observações foram associadas à sua ocorrência: a doença apresentava-se nas formas epidêmica e endêmica; era associada com regiões portuárias; novos surtos eram frequentemente associados com a chegada de navios oriundos de regiões que apresentavam focos da doença; um “germe” transmissível foi suspeito de ser o agente causal; um intervalo de tempo fora do hospedeiro era necessário para torná-lo infeccioso, porém, sem transmissão direta e a recuperação da doença conferia imunidade duradoura (FRIERSON, 2010). No século XIX, foi reconhecido que a YF não era contagiosa e a fonte de infecção foi atribuída aos miasmas ambientais (STAPLES; MONATH, 2008).

Em 1881, o cubano Carlos Finlay sugeriu que um mosquito fosse o vetor do agente causador da YF, porém, somente em 1900, durante uma guerra entre EUA e Espanha, é que Walter Reed e seus colaboradores demonstraram a natureza filtrável do agente, que poderia ser filtrado a partir do sangue de pacientes infectados, e que a sua transmissão era mediada por mosquitos *Aedes aegypti* (GUBLER; KUNO; MARHOFF, 2007). Campanhas para o controle do vetor realizadas nesta época em Havana, Panamá, Santos, Rio de Janeiro e outros centros urbanos resultaram no desaparecimento da doença das vastas zonas tropicais americanas. Do mesmo modo, medidas de controle contra esse mosquito adotadas no Equador, Peru, Colômbia, América Central e México foram seguidas do completo desaparecimento da doença (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1999)

Em 1927, Mahaffy e Bauer realizaram o primeiro isolamento do YFV inoculando sangue de um paciente de Ghana em macaco Rhesus. Este vírus ficou conhecido como cepa Asibi que deu origem à cepa vacinal 17D (STAPLES; MONATH, 2008).

Em 1930, Theiler demonstrou que camundongos eram susceptíveis à doença após inoculação intracerebral e constituíam um modelo animal mais adequado do que macacos para a YF (STAPLES; MONATH, 2008). Após inoculações intracerebrais em camundongos, o vírus da YF tornava-se simultaneamente mais neurotrópico e menos viscerotrópico quando reinoculado em macaco Rhesus (FRIERSON, 2010).

Tentativas de atenuação para uso vacinal foram realizadas posteriormente, e em 1937 Theiler e Smith desenvolveram a vacina YF-17D. A cepa Asibi foi empiricamente atenuada por 176 passagens em cultura de células de galinhas e camundongos resultando na perda do vicerotropismo e competência vetorial, ou seja, perda da capacidade de ser transmitido pelo vetor (THEILER; SMITH, 1937b), sem comprometimento da sua capacidade em induzir resposta imune protetora em macacos e humanos. Essa cepa atenuada foi designada YF-17D em referência ao número de cultivos em tecidos de embriões de galinha a que foi submetido (THEILER; SMITH, 1937a). A cepa 17D foi usada como base para o desenvolvimento de outras vacinas e foi responsável por salvar milhares de vidas, por essa razão, Theiler recebeu o Prêmio Nobel de Medicina em 1951 (STAPLES; MONATH, 2008).

Nessa mesma época, o YFV foi isolado de um homem acometido pela doença no Senegal e foi atenuado após 128 passagens em cérebros de camundongos. Essa cepa ficou conhecida como a “cepa francesa” e resultou na vacina YF neurotrópica francesa (GUBLER; KUNO; MARHOFF, 2007) que foi usada na erradicação da doença nos países africanos de língua francesa em 1960. Devido à ocorrência elevada de casos de encefalite após vacinação com a cepa francesa, o uso dessa vacina foi abandonado em 1982 (GUBLER; KUNO; MARHOFF, 2007; STAPLES; MONATH, 2008).

Na década de 40, foi implementado um sistema de lotes-semente e controle das subcepas vacinais para evitar alterações indesejáveis nas propriedades biológicas da vacina (CAMACHO et al., 2004). Atualmente, são usadas duas subcepas YF-17D (17D-204 e 17DD) como vacina, com mais de 500 milhões de doses já administradas (GARDNER; RYMAN, 2010).

A maioria das indústrias utilizam a subcepa 17D-204 (passagem 204), enquanto o Brasil utiliza a subcepa 17DD, que representa uma linhagem de passagem independente da original 17D. A vacina YF-17D (17D-204) é produzida no Reino Unido (Medeva Pharma Ltd.), nos EUA e França (Aventis-Pasteur) e a

subcepa 17DD é produzida no Brasil pelo Instituto Biomanguinhos (GARDNER; RYMAN, 2010; PUGACHEV et al., 2002).

1.1.1 Febre amarela no Brasil

O primeiro relato de ocorrência da YF no Brasil foi em Recife, Pernambuco (1685). Um ano depois, foram relatados 25.000 casos da doença e 900 mortes na Bahia, correspondendo à primeira descrição de epidemia de YF no Brasil (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1999).

A elucidação do ciclo de transmissão da YF urbana incentivou programas de controle e prevenção focados no controle do vetor *A. aegypti*, resultando na queda dramática no número de epidemias e incidência da doença (GUBLER, 2004).

O sucesso das campanhas sanitárias iniciadas em 1691 assegurou um período de silêncio epidêmico por cerca de 150 anos no país, interrompido pelo reaparecimento da doença em Salvador na Bahia, em 1849, com 2.800 mortes. Neste mesmo ano, a instalação de *A. aegypti* no Rio de Janeiro provocou a primeira epidemia da doença naquele estado, na qual mais de 9.600 pessoas foram acometidas, com o registro de 4.160 óbitos (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1999).

Após oito anos da confirmação, por Carlos Finlay, de que o *Stegomyia fasciata* ou *A. aegypti* era o transmissor da febre amarela, Adolpho Lutz relatou um caso de febre amarela silvestre sem a ocorrência de larvas ou adultos do mosquito *Stegomyia fasciata* em 1889, porém, este fato foi desconsiderado na ocasião (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1999).

Entre os anos de 1937 e 1955, o uso da vacina anti-amarílica no Serviço de Profilaxia da Febre Amarela (1937), em conjunto com a aplicação de medidas de controle vetorial houve uma redução na ocorrência da doença no Brasil. A primeira erradicação do *A. aegypti* no Brasil foi confirmada em 1955, porém o mosquito foi reintroduzido em 1963 e uma nova erradicação foi alcançada no início da década de 70. Entretanto, após a última reintrodução em 1976 essa espécie tem se dispersado pelo território brasileiro e está presente em todos os estados. Casos de YF

relacionados à transmissão no ambiente silvestre ocorrem periodicamente no território brasileiro (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1999).

Nos últimos 20 anos foram notificados 587 casos de YF silvestre, com 259 mortes. O maior número de registros de casos foi em Minas Gerais (n=104), seguido pelo Maranhão (n=90), Goiás (n=88), Pará (n=84), e Amazonas (n=43) (BRASIL, 2011).

As regiões Norte e Centro-Oeste contribuíram com os maiores números de casos do período de 1990 a 2010, com 94 mortes em 178 casos e 80 mortes em 150 casos, respectivamente. A região sul, registrou seus primeiros casos, dessas duas décadas, entre os anos de 2008 e 2009 com 10 mortes em 23 casos da doença no Rio Grande do Sul. Casos de YF silvestre são relatados esporadicamente na região Sudeste, no entanto, surtos ocorridos em Minas Gerais (2003) e em São Paulo (2008) resultaram em 21 e 11 mortes, respectivamente. Não há registro de YF silvestre no Nordeste desde o ano 2000 e os últimos casos no país foram notificados em 2010 no Pará (n=1) e Mato Grosso do Sul (n=1) (BRASIL, 2011).

1.2 O vírus da febre amarela

1.2.1 Classificação

O YFV pertence ao gênero *Flavivirus*, que representa o gênero protótipo da família Flaviviridae (KÜMMERER, 2006). Esta família inclui patógenos virais, causadores de doenças graves e mortalidade em humanos e animais, classificados em três gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus* (LINDENBACH, THIEL; RICE, 2007).

O gênero *Flavivirus* compreende mais de 70 vírus, incluindo alguns de importância global como o vírus da dengue (*Dengue virus* - DENV), o vírus da encefalite japonesa (*Japanese encephalitis virus* – JEV), o vírus do oeste do Nilo (*West Nile virus* - WNV), o YFV e o vírus da encefalite transmitida pelo carrapato (*Tick-Borne encephalitis virus* –TBE). Dentro do gênero, os vírus podem ser categorizados em complexos antigênicos de acordo com critérios sorológicos ou em

grupos, classes e espécies de acordo com características filogenéticas moleculares (LINDENBACH, THIEL; RICE, 2007).

1.2.2 Estrutura e expressão gênica

Os *Flavivirus* possuem partículas esféricas pequenas (40-60nm de diâmetro) compostas de uma molécula de RNA, cadeia simples e polaridade positiva. O nucleocapsídeo é envolto por um envelope bilipídico, em que duas proteínas são inseridas: proteína do envelope (E) e a proteína da membrana (M), ou o seu precursor prM (proteína precursora da membrana) (KÜMMERER, 2006).

O genoma do YFV é infeccioso e consiste de um RNA de aproximadamente 11 kilobases (kb). O genoma codifica uma única poliproteína de 10.233 nt cuja fase aberta de leitura (*Open reading frame* – ORF) é flanqueada por duas regiões não traduzidas: região 5' não-codificadora (UTR) com uma estrutura Cap e uma 3'-UTR desprovida de cauda poli-adenilada (RICE et al., 1985). As regiões 5'-UTR e 3'-UTR compreendem, respectivamente, 120 e 500 nt, os quais apresentam sequências essenciais para a replicação do genoma viral (CORVER et al., 2003).

O processamento da poliproteína viral é realizado por proteases virais e celulares para gerar 10 proteínas virais (Figura 1). A ordem das proteínas codificadas na orientação 5'-3' é a seguinte: C-prM/M-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5, sendo três proteínas estruturais – capsídeo (C), membrana (M, expressada como precursor prM) e envelope (E) - codificadas pela região amino – terminal (N-terminal) da poliproteína; e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) codificadas pela região carboxi-terminal (C-terminal) (LINDENBACH, THIEL; RICE, 2007; RICE et al., 1985). Além disso, dois pequenos peptídeos hidrofóbicos são liberados da poliproteína. Um deles é derivado da extremidade C-terminal da proteína C durante a maturação viral, e o outro corresponde a um pequeno fragmento liberado entre as proteínas NS4a e NS4b, chamado de 2K baseado no seu tamanho (KÜMMERER, 2006).

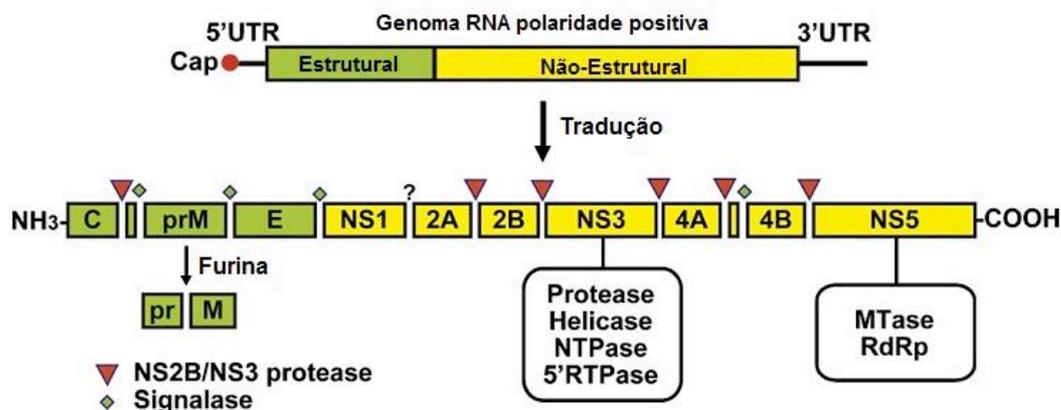


Figura 1. Representação esquemática do genoma e do processamento da poliproteína do vírus da febre amarela.

Fonte: Sampath; Padmanabhan (2009).

A proteína C (aproximadamente 11 KDa) está associada com o empacotamento do genoma viral e formação do nucleocapsídeo (CHAMBERS et al., 1990a). As proteínas prM e E, assim como todo o restante da poliproteína, são translocadas para o retículo endoplasmático (RE) durante a replicação viral. A proteína M (8 KDa) é traduzida como um precursor, prM (26 KDa), que é processado durante o período de maturação viral. A proteína prM forma um complexo poligomérico com a proteína E, dessa forma protegendo o peptídeo de fusão de modificações irreversíveis em compartimentos ácidos durante o transporte dos vírions para a superfície celular (KÜMMERER, 2006). A porção C-terminal da proteína prM/M contém um domínio transmembrana que funciona como sinal para localização no RE e possui papel na formação do envelope viral (OP DE BEECK et al., 2003; OP DE BEECK et al., 2004).

A proteína E representa a maior proteína do envelope do YFV (53-54 KDa). Possui atividade hemaglutinante, peptídeo de fusão e sítio de ligação ao receptor celular, além de constituir o principal alvo de anticorpos neutralizantes, é uma proteína de membrana tipo 1 que se apresenta como homodímeros na partícula viral madura (LINDENBACH, THIEL; RICE, 2007). Cada monômero é constituído por três domínios externos (ectodomínio): O domínio I, corresponde à região central do ectodomínio da proteína E com epítomos do subcomplexo e tipo específico; O domínio II, projeta na superfície viral entre as regiões transmembranas das subunidades do homodímero e apresenta epítomos de reação cruzada; O domínio III, localiza-se na porção C-terminal da proteína e é responsável pela ligação a receptores celulares. Possui estrutura semelhante à imunoglobulina e tem relação

com a virulência de determinadas cepas virais e ligação de anticorpos neutralizantes. O peptídeo de fusão está localizado no domínio II, e anticorpos neutralizantes são produzidos contra o domínio III. (LINDENBACH, THIEL; RICE, 2007; CRILL; CHANG, 2004).

A região *stem-anchor* localiza-se na extremidade C-terminal do ectodomínio de cada monômero da proteína E e acomoda essa proteína na membrana do RE (ZHANG et al., 2003). A região *stem-anchor* é composta pelos últimos 100 aa da proteína E (ALLISON et al., 1999). Essa região inclui duas estruturas alfa-hélices na região *stem* (H1 e H2), uma região conservada (CS) separando essas hélices e dois segmentos transmembrana (TM1 e TM2) na porção âncora (Figura 2): H1 parece estar associada com a formação dos trimeros de proteína E; H2 é importante para a estabilidade de dímeros prM-E; CS é altamente conservada entre os *Flavivirus*, no entanto sua função não é bem definida; TM1 contribui para a estabilidade de prM/E heterodímeros (ALLISON et al., 1999) e TM2 serve como sequência sinal para a proteína não-estrutural (NS) NS1 (CRILL; CHANG; 2004). Interações entre TM1 e TM2 são importantes na formação do envelope viral (OP DE BEECK et al., 2003).

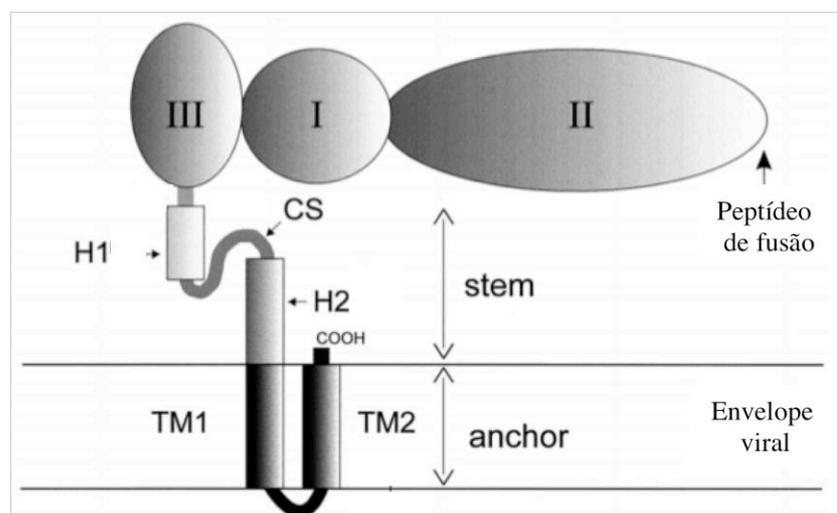


Figura 2. Representação esquemática da proteína E dos *Flavivirus*.

Fonte: Adaptado de Allison et. al (1999).

Nota: Os três domínios da proteína E estão representados pelas estruturas (I, II e III), e a posição do peptídeo de fusão está indicada no domínio II. As estruturas da região *stem-anchor* estão representadas (H1 e H2; CS; TM1 e TM2).

Três proteínas não-estruturais são altamente conservadas entres os *Flavivirus*, NS1 (38-41 KDa), NS3 (68-70 KDa) e NS5 (100-103 KDa). A NS1 participa da replicação da fita negativa de RNA, pode ser encontrada tanto associada à membrana de células infectadas quanto no meio extracelular e inibe a ativação da

cascata do sistema complemento (LINDENBACH; RICE, 1997; 1999). A NS3 participa da replicação viral com as funções de protease (CHAMBERS et al., 1990b; LEE et al., 2000; STOCKS; LOBIGS, 1998) e nucleotídeo trifosfase/helicase (WENGLER, 1993). A NS5 é a maior proteína viral e também a mais conservada. Possui atividade polimerase de RNA dependente de RNA (CHAMBERS et al., 1990a; STEFFENS; THIEL; BEHRENS, 1999) e contém sequências encontradas em outras polimerases de RNA viral (STEFFENS; THIEL; BEHRENS, 1999). NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são proteínas hidrofóbicas que participam da replicação viral, porém, pouco conservadas entre os *Flavivirus* em nível de aa. NS2A (22 KDa) parece ser necessária para o processamento correto de NS1; NS2B (14 KDa) participa do complexo de replicação em associação com a NS3; NS4A (16 KDa) interage com NS1 formando os complexos de replicação e a NS4B (27 KDa) colocaliza com NS3 nos sítios de replicação (CHAMBERS et al., 1990a).

1.2.3 Ciclo replicativo

A replicação do YFV envolve a produção de 10 proteínas nas células infectadas. Numerosas evidências existem de que as interações entre o vírus e a célula hospedeira são extremamente complexas, tais como a adaptação da maquinaria celular hospedeira para sua replicação e o antagonismo ou escape das respostas antivirais (GARDNER; RYMAN, 2010).

A replicação dos *Flavivirus* ocorre associada a membranas e os estágios iniciais envolvem a entrada em células susceptíveis pela endocitose mediada por receptor. O rearranjo conformacional da glicoproteína E ocorre no ambiente de baixo pH endossomal, que facilita a fusão da membrana lipídica viral com a membrana endossomal, com a consequente liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma. Em seguida, ocorre a tradução imediata do genoma viral. A tradução nos *Flavivirus* é dependente de Cap e inicia no primeiro códon AUG próximo à extremidade 5' do genoma. Os processamentos co- e pós-traducionais da poliproteína em proteínas individuais envolve clivagens sequenciais por proteases virais e celulares (LINDENBACH, THIEL; RICE, 2007)

Após a tradução e processamento das proteínas virais inicia-se a replicação do

RNA genômico. As proteínas não-estruturais virais se associam para formar o complexo replicase. Esse complexo reconhece estruturas secundárias presentes na extremidade 3' do genoma viral e a polimerase NS5 (RNA polimerase dependente de RNA) inicia a síntese de cópias de RNA genômico de fita negativa que serve de molde para o RNA genômico de fita positiva. A síntese de RNA viral é assimétrica com acúmulo de 10 vezes mais de RNA genômico de fita positiva em relação ao de fita negativa (KÜMMERER, 2006).

A montagem das partículas virais imaturas ocorre no RE, onde o RNA genômico forma um complexo com a proteína C e é empacotado pela membrana do RE contendo heterodímeros das proteínas M e E (GARDNER; RYMAN, 2010). Partículas subvirais podem ser formadas durante a replicação de *Flavivirus*, consistindo de envelope viral contendo proteínas M e E, porém, desprovido de nucleocapsídeo (ALLISON et al., 1995; KÜMMERER, 2006; SCHALICH et al., 1996). Durante a montagem e transporte das partículas virais imaturas para a membrana plasmática e posterior liberação no meio extracelular, o precursor da proteína M (prM) protege a proteína E de alterações conformacionais irreversíveis. A maturação ocorre no complexo trans-Golgi com clivagem da prM por furinas celulares e rearranjo da proteína E, com consequente liberação das partículas infecciosas por exocitose (GARDNER; RYMAN, 2010).

1.3 Aspectos epidemiológicos da febre amarela

1.3.1 Transmissão

A YF é uma arbovirose e possui dois padrões epidemiológicos de ocorrência: o silvestre e o urbano (Figura 3). Entre eles não há diferenças etiológicas, clínicas e fisiopatológicas, sendo distinguíveis apenas pela cadeia de transmissão, ou seja, hospedeiros e espécies de vetores envolvidos na transmissão (BRASIL, 2005a).

O ciclo de transmissão primária envolve primatas não-humanos (macacos) e mosquitos. Na América do Sul, os principais transmissores são mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* (BRASIL, 2005a). O homem pode ser infectado

quando participa acidentalmente do ciclo enzoótico natural (FA silvestre). Na população humana, geralmente o aparecimento de casos é precedido de epizootias em primatas não humanos (BRASIL, 2005b).

Os pacientes mais acometidos pela YF silvestre são geralmente indivíduos jovens do sexo masculino realizando atividades agropecuárias e de extração de madeira, que adentram a floresta sem vacinação prévia, porém um número crescente de turistas, mulheres e crianças tem sido relatado (VASCONCELOS, 2002). Essa forma epidemiológica da YF constitui uma ameaça às populações rurais e um risco permanente para a introdução do vírus nas grandes cidades e pequenas localidades infestadas pelo mosquito *A. aegypti* (VASCONCELOS, 2003).

No ciclo urbano, o vírus é transmitido de homem a homem pela picada da fêmea do mosquito *A. aegypti* infectada pelo YFV. Não ocorre participação de animais silvestres e o homem é o hospedeiro responsável pela infecção do mosquito (GUBLER; KUNO; MARHOFF, 2007; VASCONCELOS, 2003). No entanto, desde 1942 não há relatos de YF urbana no Brasil (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1999).

Na África, um ciclo intermediário ocorre nas savanas, envolvendo a transmissão de YF por *Aedes* spp. que ocupam áreas peridomiciliares atingindo a população humana que reside ou trabalha em locais ao redor de florestas. Neste ciclo, o vírus pode ser transmitido de macacos para humanos ou entre humanos por esses mosquitos (GERSHMAN; SCHROEDER; STAPLES, 2011).

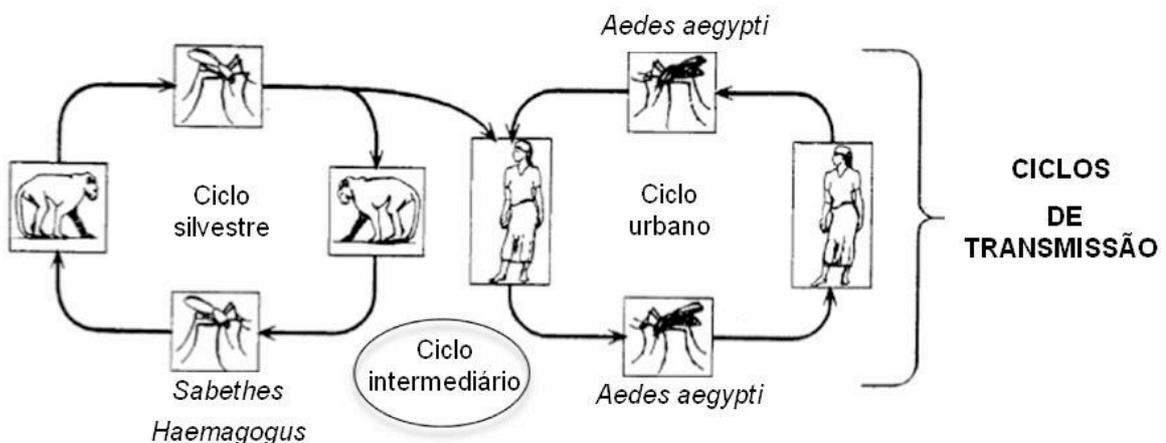


Figura 3. Ciclos de transmissão da febre amarela.
Fonte: Adaptado de Gubler (2004).

1.3.2 Distribuição geográfica

A YF é endêmica na África, Américas do Sul e Central, e Caribe (Figura 4). A maioria dos casos nessas regiões é atribuída aos ciclos de transmissão silvestre. No entanto, casos de transmissão urbana podem ocorrer periodicamente na África e esporadicamente na América do Sul (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2010; TOMORI, 2004). Dois terços dos países africanos estão localizados em áreas de risco de YF, uma população de 610 milhões de pessoas com mais de 219 milhões vivendo em áreas urbanas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011).

Nas Américas, países como Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela são considerados áreas de risco. Embora a doença cause, geralmente, apenas casos esporádicos e pequenos surtos, os principais centros urbanos das Américas têm sido reinfestados com *A. aegypti*, tornando-se vulneráveis à ocorrência da doença devido à baixa cobertura vacinal (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011).



Figura 4. Áreas de risco de infecção pelo vírus da febre amarela.
Fonte: Adaptado de Gershman; Schroder; Staples (2011).

A densidade e habitats do *Aedes aegypti* tem se expandido em áreas urbanas e rurais, com o vetor infestando novamente regiões das quais tinha sido anteriormente erradicado (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011) (Figura 5).

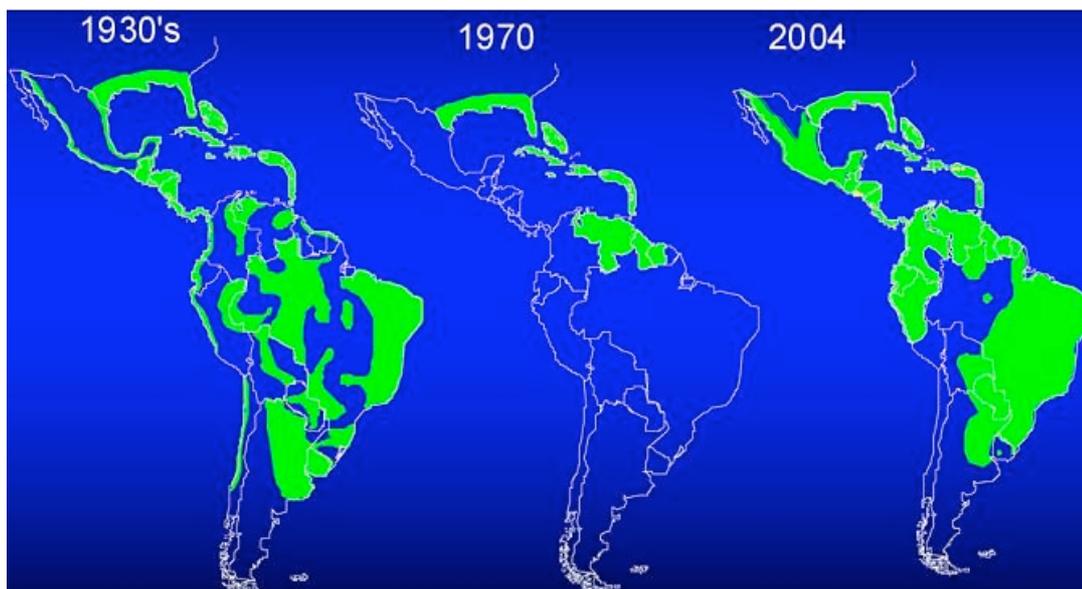


Figura 5. Distribuição geográfica do *Aedes aegypti* nas Américas, nos anos 30, 70 e em 2004. Fonte: Gubler (2004).

A doença tem caráter sazonal, ocorrendo com maior frequência em épocas em que os fatores ambientais propiciam o aumento da densidade vetorial. No Brasil, esse período compreende os meses de janeiro a abril (BRASIL, 2011). Na região da Amazônia e outras áreas endêmicas do Brasil têm sido relatados surtos epizooticos a cada cinco a sete anos. Essa periodicidade é provavelmente devido à renovação de populações de macacos, e não apenas da população dos vetores (*Haemagogus* e *Sabethes*), mesmo considerando a sua transmissão vertical e trans-ovariana (VASCONCELOS, 2003).

A partir do desaparecimento da forma urbana, em 1942, do Brasil, houve ocorrência apenas de casos de YF silvestre e os focos endêmicos até 1999 estavam situados nas regiões Norte e Centro-Oeste, além de áreas pré-amazônicas do Maranhão e oeste de Minas Gerais. A expansão da circulação vetorial no sentido leste e sul foi observada durante os surtos ocorridos entre os anos de 2000 e 2003, áreas anteriormente livres do vetor (GUBLER, 2004; BRASIL, 2005b).

O caráter dinâmico da epidemiologia da doença no país levou à criação de uma nova delimitação das regiões brasileiras para direcionamento e aplicação de medidas mais adequadas para o controle e prevenção da YF. Foram assim redefinidas: (a) área com recomendação de vacina, correspondendo àquelas anteriormente denominadas endêmica e de transição, incluindo o sul de Minas Gerais, anteriormente considerado “área indene de risco potencial”; e (b) área sem recomendação de vacina, correspondendo às “áreas indenenes”, incluindo também o

sul da Bahia e norte do Espírito Santo, que antes eram consideradas “áreas indenes de risco potencial” (BRASIL, 2005b) (Figura 6).

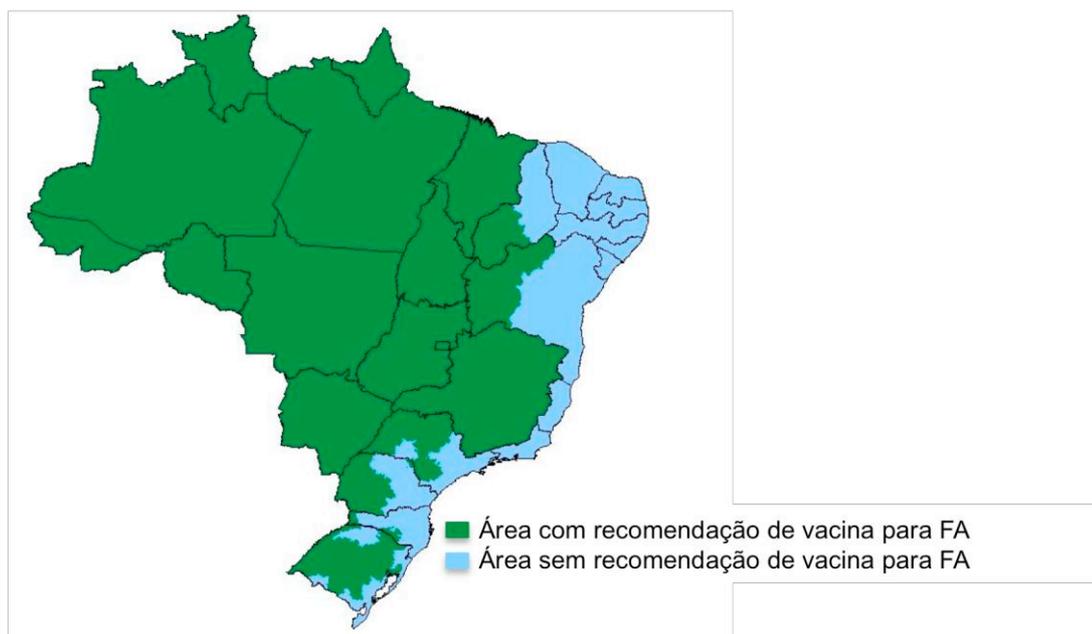


Figura 6. Distribuição da febre amarela por áreas de recomendação vacinal no Brasil.
Fonte: Brasil (2009).

A reinfestação de extensas áreas do território brasileiro pelo *A. aegypti* trouxe a possibilidade de re-estabelecimento do ciclo urbano do vírus no país, extinto desde 1942. Um grupo de fatores pode ser considerado de risco para reurbanização da febre amarela no país e, dentre eles estão a expansão territorial da infestação do *A. aegypti*; sua presença em áreas de circulação do vírus amarílico; presença do *A. albopictus* em estados das regiões endêmicas e de transição; áreas urbanas infestadas por *A. aegypti* próximas de áreas de risco para febre amarela silvestre; intenso processo migratório rural-urbano, levando à possibilidade de importação do vírus amarílico dos ambientes silvestres para os urbanos (BRASIL, 2005b).

1.4 Manifestações clínicas da febre amarela

A YF é uma febre hemorrágica viral típica. Possui muitas características em comum com outras febres hemorrágicas, porém é caracterizada por injúria hepática

grave. A doença pode variar de assintomática a severa. Após um período de incubação de três a seis dias, a doença inicia abruptamente com febre e dor de cabeça e a recuperação ocorre em poucos dias (GARDNER; RYMAN, 2010; MONATH, 2008).

Nos casos mais graves, a progressão da doença é marcada pelo aparecimento de fraqueza muscular intensa, náuseas, vômitos, icterícia, dores de cabeça e lombossacral, insuficiência renal, choque e hemorragia, frequentemente manifestando o sinal de Faget (febre alta com bradicardia). As taxas virêmicas durante este período, chamado de período de infecção, são suficientes para transmissão pela picada de mosquitos. Um período de remissão ocorre em 24 horas, caracterizado pela ausência de vírus na circulação (GARDNER; RYMAN, 2010).

Cerca de 20% dos pacientes são acometidos pelo período de intoxicação que corresponde ao reaparecimento de uma forma mais grave da doença, com febre alta, vômitos, dor epigástrica, prostração, desidratação. Um quadro de coagulopatia hepato-induzida manifesta-se por hemorragias intensas com o característico “vômito preto” (hematêmese, hemorragia gastrointestinal) (GARDNER; RYMAN, 2010).

Aproximadamente 15% das pessoas infectadas desenvolvem doença visceral com icterícia (MONATH, 2008). As mortes ocorrem num período entre sete a 10 dias em 20 a 50% dos casos graves e são precedidas por icterícia profunda, hemorragia, hipotensão, oligúria e azotemia (GARDNER; RYMAN, 2010; GUBLER; KUNO; MARHOFF, 2007).

1.5 Tratamento

O tratamento da YF é apenas sintomático, uma vez que não existe um tratamento específico para a doença (GUBLER; KUNO; MARHOFF, 2007). Embora várias drogas tenham sido testadas ou usadas empiricamente para tratar a YF, os seus benefícios específicos não têm sido demonstrados. Pouco se sabe sobre os efeitos da imunoterapia passiva; e, o uso de interferon- α em hamster e macacos parece ter efeito satisfatório somente quando administrado previamente à infecção ou em estágios iniciais (JULANDER et al., 2007; MONATH, 2008). Resultados menos expressivos foram obtidos com o uso de interferon- γ . Por outro lado, a

ribavirina mostrou-se promissora em camundongos infectados pelo YFV (SBRANA et al., 2004), no entanto, o mesmo não ocorreu em macacos (MONATH, 2008)

1.6 Controle e Prevenção

As estratégias mundias de controle da YF são a vacinação de crianças com idade igual ou superior a seis meses; campanhas de vacinação em massa para prevenir epidemias, permitir uma resposta rápida e detecção de surtos; e controle do *Aedes aegypti* nos centros urbanos (GARDNER; RYMAN, 2010). Na forma urbana, o risco de transmissão epidêmica ocorre quando os índices de infestação pelo *Aedes aegypti* são superiores a 5% fazendo-se necessária a aplicação de medidas de combate ao vetor (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1999).

A vacina atenuada da YF é a medida mais importante para prevenção e controle da doença. Apresenta eficácia acima de 95% e tem como objetivo conferir proteção individual e coletiva, bloqueando a propagação geográfica da doença, na prevenção de epidemias (BRASIL, 2011).

1.6.1 A vacina da febre amarela 17D

A vacina atenuada contra o vírus da febre amarela 17D (YFV-17D) vem sendo utilizada desde 1937 com grande sucesso. Ao longo destes 73 anos, mais de 540 milhões de pessoas foram imunizadas com notáveis índices de segurança e eficácia. (BARRETT; TEUWEN, 2009). A sua produção é baseada na tecnologia de replicação de vírus em ovos embrionados, na qual cada ovo produz em torno de 400 doses da vacina e tem sido pouco alterada desde 1945 (GARDNER; RYMAN, 2010).

A cepa vacinal YFV-17D e a cepa selvagem Asibi diferem entre si em 68 de 10.860 nt (nt) (aproximadamente 0,63%), que resulta em 32 aminoácidos (aa) diferentes (HAHN et al., 1987). O gene que codifica a proteína E é a região na qual existe o maior número de mutações, correspondendo a 11 nt e oito aa diferentes (HAHN et al., 1987). Baseado na associação da proteína E com a penetração do

vírus na célula hospedeira, acreditam-se que mutações nessa proteína possam ser responsáveis pela alteração de tropismo viral e conseqüentemente, da virulência. Além dessas, mutações na região 3'-UTR podem estar envolvidas na atenuação (CHAMBERS; NICKELLS, 2001; MANDL et al., 1998; NICKELLS; CHAMBERS, 2003).

As duas subcepas vacinais usadas como vacinas atualmente, 17D-204 e 17DD correspondem às passagens 235-240 e 287-289, respectivamente, do vírus selvagem Asibi (BARRETT; TEUWEN, 2009). As diferenças entre os genomas da cepa Asibi e as duas subcepas 17D-204 e 17DD são 48 nt correspondentes a 20 substituições de aa. Não há diferença na região 5'-terminal e no gene do capsídeo, no entanto, quatro substituições de nt estão localizadas na extremidade 3'-UTR. As outras substituições de aminoácidos estão distribuídas no restante do genoma viral (BARRETT; TEUWEN, 2009).

Embora apresentem diferenças em nível molecular, estudos envolvendo diferentes subcepas vacinais do YFV-17D mostraram que não há diferenças na imunogenicidade entre elas (LANG et al., 1999; MONATH et al., 2002a,b).

Uma baixa viremia é detectada em aproximadamente metade dos indivíduos vacinados após a vacinação. No entanto, a imunidade mediada pela vacina 17D ocorre em 10 dias em 95% dos vacinados e induz imunidade protetora contra todas as cepas selvagens conhecidas (BARRETT; TEUWEN, 2009). Essa imunidade é conferida por uma resposta imune integrada que incluem diferentes efetores da imunidade inata, incluindo complemento, inflamassoma, interferon, assim como a imunidade adaptativa como evidenciada por uma resposta T precoce seguida por uma resposta de células (GAUCHER et al., 2008).

A cepa vacinal 17D é um potente indutor de respostas celulares T CD8+ e CD4+ contra as proteínas não-estruturais NS1, NS2B e NS3, e contra a proteína E (BARRETT; TEUWEN, 2009). A resposta celular T CD8+ em resposta à imunização com 17D alcança pico entre 1-2 semanas após vacinação (MILLER et al., 2008), sendo detectável até 19 meses, o que pode contribuir para a eficácia da vacina. A vacina induz uma resposta imune humoral rápida e específica. A produção de anticorpos neutralizantes é rápida, detectável sete dias pós-vacinação e pode persistir por, pelo menos, 45 anos. Anticorpo neutralizante é correlacionado com proteção conferindo proteção total de 98% dos vacinados por pelo menos 10 anos e é considerado o mecanismo primário de proteção contra re-exposição (BARRETT;

TEUWEN, 2009). Em adição, estudos recentes mostraram que o sistema de imunidade inata também desempenha um papel importante na qualidade e força da resposta imune adaptativa (BARBA-SPAETH et al., 2005; MILLER et al., 2008; PALMER et al., 2007; QUEREC; PULENDRAN, 2007; SANTOS et al., 2008).

No Brasil, a vacinação contra YF é recomendada para toda a população, a partir dos nove meses de idade, que se deslocar das áreas sem recomendação de vacina para áreas com recomendação da vacina (BRASIL, 2011). Exceto para quatro grupos de pessoas, para os quais a vacina somente deverá ser administrada quando o risco da doença exceder o risco da vacina: crianças menores que seis meses de idade; mulheres grávidas, pessoas com histórico de hipersensibilidade aos componentes de vacina ou ovo; e pessoas imunodeprimidas por HIV ou outras doenças (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2011).

A vacina 17D possui uma excelente segurança com relatos de casos raros de eventos graves após a vacinação (BARRETT; TEUWEN, 2009). Efeitos adversos, como mal-estar, cefaléia, dores musculares e febre baixa são observados em 2 a 5% dos vacinados, do 5º ao 10º dia após a vacinação. Esta reação dura de um a dois dias (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1999). Dois tipos de eventos raros são bem caracterizados: doenças neurotrópica e viscerotrópica associadas à vacina. Apesar da ocorrência desses casos raros e graves, a taxa risco-benefício da vacina é positiva para viajantes que se direcionam para as áreas de risco e em campanhas de controle de surtos (BARRETT; TEUWEN, 2009).

1.6.1.1 Aplicações da cepa 17D do vírus da febre amarela como vetor vacinal

As notáveis propriedades da cepa vacinal YF-17D têm sido exploradas na construção de vacinas experimentais contra doenças causadas por outros *Flavivirus* e agentes infecciosos. O desenvolvimento da tecnologia de clone infeccioso, do qual o RNA viral pode ser recuperado a partir de um cDNA clonado, tem possibilitado a manipulação genética do genoma viral do YFV-17D pela expressão de genes heterólogos, contribuindo para os avanços nesse campo de investigação (BONALDO et al., 2005; CHAMBERS et al., 1999). Diferentes técnicas são utilizadas atualmente para a construção de vírus recombinantes baseados no YFV-17D e a estratégia varia de acordo com o antígeno a ser expresso (BONALDO et al., 2007).

A estratégia de construção de quimeras virais pela troca dos genes que codificam as proteínas estruturais prM/E do YFV-17D pelos genes homólogos de outros *Flavivirus*, também conhecida como ChimeriVax™, foi aplicada inicialmente no desenvolvimento de vacina contra o JEV (GUIRAKHOO et al., 1999; MONATH et al., 1999). A segurança e imunogenicidade da vacina ChimeriVax™-JEV revelaram níveis semelhantes aos da vacina YF-17D (MONATH et al., 2002a) e abriram perspectivas para a aplicação desta tecnologia no desenvolvimento de vacinas contra o DENV e o WNV (ARROYO et al., 2001; GUIRAKHOO, 2001; GUIRAKHOO et al., 2002; JOHNSON et al., 2002, 2003). Essas quimeras virais replicaram a títulos elevados em cultivo celular, induziram imunidade protetora em roedores e macacos e apresentaram o mesmo perfil de segurança de neurovirulência em macacos (GUIRAKHOO et al., 2004; MONATH et al., 2003). A vacina Chimerivax™-WNV se encontra em fase de avaliação clínica mais adiantada e assim como a Chimerivax™-DENV e ChimeriVax™-JEV, os estudos preclínicos demonstraram a sua segurança. A vacina ChimeriVax-JEV™ é a vacina quimérica YFV-17D mais próxima de ser licenciada (GUY et al. 2010).

Uma estratégia alternativa para o uso do YFV-17D como vetor para antígenos heterólogos é a construção de YFV-17D com inserção de sequências heterólogas e não apenas substituição das proteínas prM/E como na tecnologia ChimeriVax™. A inserção dessas sequências deve ocorrer em regiões específicas do genoma, de forma que não comprometa a estrutura e função viral (BONALDO et al., 2006). A elucidação da estrutura 3D da proteína E do *Flavivirus* TBEV, tornou viável a avaliação dos sítios de inserção com menor probabilidade de interferência na estrutura geral da proteína, e abriu perspectivas para diferentes manipulações genéticas do YFV-17D e inserção de genes heterólogos (REY et al., 1995).

Sequências pequenas (9-16 aa) podem ser inseridas no gene da proteína E sem influenciar negativamente na sua estrutura e atenuação viral (BONALDO et al., 2006). Epítomos de células T (10 aa) inseridos entre os genes das proteínas não-estruturais NS2B/NS3 resultaram em uma quimera viral estável após sucessivas passagens em cultivo celular, e uma dose única de 10^5 PFU induziu resposta imune robusta e duradoura contra esporozoítos altamente infecciosos de *Plasmodium yoelli* (TAO et al., 2005).

Adicionalmente, outras manipulações genéticas consideraram os sítios de

clivagem/processamento da protease viral NS2B/NS3 para atenuação e utilização como vetor viral (MCALLISTER et al., 2000). A inserção de 84 nt em três regiões do genoma (porção N-terminal de C, junções C/prM e NS2B/NS3), alternativamente, produziu recombinantes viáveis que replicaram em taxas semelhantes ao YFV-17D, embora apenas a quimera com inserção entre NS2B/NS3 apresentasse cinética de replicação e título idênticos ao YFV-17D, além de conferir proteção contra o gene heterólogo.

Novas estratégias foram desenvolvidas para a construção de quimeras virais com inserção de sequências maiores. Bonaldo et al. (2007) demonstraram uma estratégia de inserção de epítopos heterólogos na região intergênica das proteínas E e NS1 utilizando o sítio de clivagem de protease celular para o processamento do gene repórter *Green Fluorescent Protein* (GFP). Esta estratégia baseou-se na presença de sítios funcionais e na conservação da sequência de aa que flanqueiam a região intergênica E/NS1. Baseado nesta estratégia foi construída a quimera YFV-17D/DENV-4 com inserção do gene GFP na junção das proteínas E/NS1 e duplicação dos 288 nt C-terminais da proteína E do DENV-4 (correspondentes à região *stem-anchor*) na extremidade C-terminal do gene repórter. Este vírus recombinante permaneceu estável após sucessivas passagens em cultivo celular (BONALDO et al., 2007).

Bredenbeek et al. (2006) utilizaram a mesma região intergênica E/NS1 para a construção de uma quimera YFV-17D/LASV-GPC contendo o gene da proteína GPC do vírus Lassa (*Lassa virus* - LASV), um arenavírus causador de doença hemorrágica. A quimera viral replicou pobremente em porquinhos-da-índia, contudo, induziu a produção de anticorpos neutralizantes contra proteínas do LASV e YFV-17D, além de uma resposta imune protetora contra febre de lassa fatal (BREDENBEEK et al., 2006). Avaliações subsequentes, no entanto, revelaram que este recombinante era geneticamente instável. Dois novos recombinantes foram construídos expressando as subunidades da proteína precursora GPC (GP1 ou GP2), e apresentaram ser geneticamente estáveis com replicação a títulos razoáveis em cultivo celular (JIANG et al., 2011).

Uma quimera constituída de região 5'-UTR do YFV-17D seguida pela ORF codificante de 25 aa C-terminais da proteína C do YFV-17D, fusionada com o gene repórter GFP, com a protease 2A do vírus da febre aftosa (*Foot-and-mouth disease virus* - FMDV) e a poliproteína (C-prM-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5) do

YF-17D, mostrou-se geneticamente instável. Após cinco passagens em cultivo celular, apenas 89% das células infectadas pelo vírus recombinante expressavam o gene repórter GFP, contudo expressavam proteínas do YFV-17D (SHUSTOV; MASON; FROLOV, 2007).

Quimeras do YFV-17D representam uma estratégia promissora para o desenvolvimento de vacinas. Todavia, existem dúvidas quanto ao potencial patogênico dessas construções (CHAMBERS et al., 1999) e quanto à possibilidade de surgimento de quimeras patogênicas durante o processo de replicação desses vírus (PUGACHEV et al., 2004).

O estudo dos vírus e suas interações com as células hospedeiras tem se beneficiado da praticidade de inserir mutações nos genomas virais pela tecnologia de genética reversa (PEKOSZ; HE; LAMB, 1999). Clones infecciosos, dos quais um RNA infeccioso pode ser transcrito *in vitro*, constituem ferramentas valiosas para estudos da biologia molecular de vírus RNA (BOYER; HAENNI, 1994).

Estudos recentes indicam que proteínas estruturais de alguns vírus são dispensáveis para a replicação do RNA genômico. Os genes dessas proteínas podem ser total ou parcialmente deletados, e tais genomas defectivos (replicons) continuam replicando e sendo capazes de expressar as suas proteínas não-estruturais sem que ocorra o empacotamento mediado pelas proteínas estruturais, e consequente formação das partículas virais (KHROMYKH; WESTAWAY, 1997). Em consequência, os replicons mostram-se adequados para estudos de aspectos da replicação do genoma viral, que ocorrem independentemente do processo de morfogênese, e sua amplificação no citoplasma celular faz deles excelentes vetores para expressão transiente e estável de genes heterólogos (JONES; PATKAR; KUHN, 2005).

A construção de replicons já foi demonstrada para diversos vírus com RNA de cadeia positiva como: vírus Sindbis (XIONG et al., 1989), vírus Semliki Forest (LILJESTROM; GAROFF, 1991; TANNIS et al., 2005), vírus da Encefalite Venezuelana Equina (PUSHKO et al., 1997), vírus da rubéola (TZENG et al., 2001), poliovírus (KAPLAN; RACANIELLO, 1988), KUNV (HARVEY et al., 2004; KHROMYKH; WESTAWAY, 1997; TANNIS et al., 2005), vírus da diarreia viral bovina (ANSARI et al., 2004; BEHRENS et al., 1998), vírus da hepatite C (BLIGHT; MCKEATING; RICE, 2002; LOHMANN et al., 1999), TBEV (YOSHII et al., 2005), WNV (ROSSI et al., 2005; SHI; TILGNER; LO, 2002), YFV (JONES; PATKAR;

KUHN, 2005), DENV-2 (JONES et al., 2005; PANG; ZHANG; DAYTON, 2001a; b) e DENV-3 (MOSIMANN et al., 2010).

A tecnologia de replicons constitui um modelo seguro e efetivo para induzir imunidade protetora (ABERLE et al., 2005; KOFLER et al., 2004) e estes podem ser introduzidos em células na forma de RNA transcrito *in vitro*, empacotado em partículas pseudo-infecciosas (PPIs) ou na forma de DNA, sob o controle de um promotor celular da RNA polimerase II. Essas três modalidades são efetivas, porém o sistema de PPIs mostrou ser a mais eficiente (ABERLE et al., 2005; ANRAKU et al., 2002),

A aplicação de PPIs no desenvolvimento de vacinas requer sua produção em larga escala, o que não tem sido alcançado por nenhuma estratégia desenvolvida até o momento. As estratégias se baseiam no fornecimento dessas proteínas *in trans* (trans-empacotamento) por meio de replicons, principalmente alfavírus (WHITE, 2007; MASON; SHUSTOV; FROLOV, 2006; SUZUKI; WINKELMANN; MASON, 2009; YOSHII et al., 2005) ou linhagens celulares recombinantes (CHIH-YUN LAI, 2008; FAYZULIN et al., 2006; GEHRKE et al., 2003; HARVEY et al., 2004; SCHOLLE et al., 2004). O desenvolvimento de linhagens celulares que empacotem os genomas defectivos em partículas infecciosas parece conferir melhores resultados (MASON; SHUSTOV; FROLOV, 2006). Essas PPIs podem ser amplificadas na linhagem celular recombinante em larga escala, porém, este não representa o único meio de propagação em larga-escala. Shustov, Mason e Frolov (2007) desenvolveram um sistema de replicação de dois componentes do genoma do YFV. Nesse sistema, cada genoma codifica o conjunto completo das proteínas não-estruturais expressando, alternativamente, apenas a proteína do capsídeo ou prM/E ao invés do conjunto completo das proteínas estruturais. A infecção de uma mesma célula com os dois genomas produz todas as proteínas estruturais e ambos os genomas são empacotados em partículas distintas (SHUSTOV; MASON; FROLOV, 2007).

Vários estudos com *Flavivirus* têm demonstrado a utilização de replicons para expressão de genes heterólogos, geralmente inseridos na região deletada das proteínas estruturais ou no início da extremidade 3'-UTR. A expressão de sequências heterólogas em replicons de *Flavivirus* também pode ser mediada pela construção de replicons bicistrônicos, com a tradução do segundo cistron regulada por um sítio interno para a ligação do ribossomo (*Internal Ribosome Entry Site* –

IRES (FAYZULIN et al., 2006; KHROMYKH, 2000; KHROMYKH and WESTAWAY, 1997; SHI et al., 2002; SCHOLLE et al., 2004, ROSSI et al., 2005). Inserções na extremidade N-terminal da NS1 de replicons *Flavivirus* são seguidas pela sequência da protease 2A do vírus da febre aftosa (*foot and mouth disease virus* - FMDV) para assegurar um processamento adequado da proteína heteróloga (SHUSTOV; MASON; FROLOV, 2007) ou IRES-ECMV (JONES et al., 2005; NG et al., 2007).

Replicons YFV foram construídos por deleção das proteínas estruturais C (PATKAR et al., 2007, 2009; MASON; SHUSTOV; FROLOV, 2006; SHUSTOV; MASON; FROLOV, 2007), prM/E (SHUSTOV; MASON; FROLOV, 2007) e C/prM/E (JONES et al., 2006). Proteínas não-estruturais foram também deletadas sem interferir na capacidade replicativa destes replicons (JONES et al., 2005; LINDENBACH and RICE, 1997). Embora alguns estudos preliminares indiquem que tais replicons sejam seguros (SHUSTOV; MASON; FROLOV, 2007) e capazes de induzir reposta imune protetora (MASON; SHUSTOV; FROLOV, 2006), as investigações nessa área ainda são escassas.

A aplicação de replicons, no entanto, está mais adiantada com a utilização de outros vírus, dentre os quais vacinas de replicon do gênero alfavírus (os quais incluem os vírus Sindbis, Semliki Forest virus, encefalite Venezuela equina) demonstraram ser capazes de induzir potente resposta humoral e celular (linfócitos T, CD8⁺) em camundongos, coelhos, cobaias e macacos, e têm sido utilizados para o desenvolvimento de vacinas contra o HIV (DONG et al., 2003; GUPTA et al., 2005; HARVEY et al., 2003; JOHNSTON et al., 2005; MEGEDE et al., 2006; NORDSTROM et al., 2005), tuberculose (KIRMAN et al., 2003), câncer (GOLDBERG et al., 2005; LEITNER et al., 2003; NI et al., 2004; WANG et al., 2005), Marburg (HEVEY et al., 1998), *Neisseria gonorrhoeae* (THOMAS et al., 2006; ZHU et al., 2005), sarampo (CAPOZZO et al., 2006; PAN et al., 2005) e peste suína clássica (MAURER et al., 2005). Replicons de *Flavivirus* como KUNV e TBEV também são potentes ativadores da resposta celular em camundongos (ABERLE et al., 2005; ANRAKU et al., 2002), e têm sido utilizados para o desenvolvimento de vacinas contra o HIV (HARVEY et al., 2003) e papiloma vírus (HERD et al., 2004). Vetores vacinais de replicon de poliovírus também vêm sendo utilizado para o desenvolvimento de vacinas contra HIV (FULTZ et al., 2003) e *Helicobacter pylori* (SMYTHIES et al., 2005), em ambos os estudos observaram-se aumento da resposta imune celular.

Os resultados satisfatórios dos candidatos vacinais para diferentes enfermidades, baseados na tecnologia de replicon, são um incentivo para a utilização de replicons YFV como vetor vacinal. Aliado à segurança da cepa vacinal 17D, replicon YFV constitui uma ferramenta promissora no desenvolvimento de novas vacinas.

2 JUSTIFICATIVA

A vacina atenuada contra o vírus da febre amarela YFV-17D tem sido utilizada desde 1937 com um notável índice de segurança e eficácia. Uma única imunização com esta vacina é capaz de induzir a produção de anticorpos protetores e resposta de células T detectáveis por longos períodos.

Atualmente, o YFV-17D vem sendo utilizado como vetor para o desenvolvimento de vacinas contra outros *Flavivirus* (JEV, DENV1-4, WNV, LASV) e agentes infecciosos, sugerindo que o YFV-17D pode ser um vetor adequado para o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra esses agentes infecciosos.

Diferentes estratégias foram desenvolvidas para manipulação genética do YFV-17D para seu uso como vetor viral. No entanto, não existe até o momento um consenso quanto a melhor estratégia a ser utilizada no desenvolvimento de uma vacina eficaz contra doenças causadas por *Flavivirus* e outros agentes infecciosos, e qual seria a manipulação genética mais adequada para tornar o YFV-17D um vetor vacinal competente e estável geneticamente.

O uso de quimeras virais com substituição das proteínas prM e E tem mostrado ser seguro para o desenvolvimento de vacinas. Esse sistema está bem estabelecido, e vacinas para os vírus JEV, WNV e DENV encontram-se em fases avançadas de avaliação clínica.

A tecnologia do YFV-17D recombinante com inserção de genes heterólogos, no entanto, só poderá ser aplicada no desenvolvimento de vacinas quando o vírus recombinante for considerado estável geneticamente. Isso implica na expressão do gene heterólogo pelo vírus por longos períodos, o que ainda não foi claramente assegurado pelas manipulações genéticas propostas até o momento.

Além disso, a tecnologia do uso de replicons empacotados em PPIs é limitado pelas dificuldades de produção em larga escala e diferentes estratégias estão sendo desenvolvidas para resolver esse entrave.

Embora tenham sido elaboradas e testadas por diferentes pesquisadores, faz-se necessário a avaliação de estratégias de inserção de genes heterólogos no genoma viral do YFV-17D e de produção de PPIs para validação da melhor estratégia de utilização da cepa vacinal 17D como vetor vacinal.

3 HIPÓTESE

A otimização de diferentes estratégias de manipulação genética do YFV-17D poderá validar a melhor estratégia para seu uso como vetor viral no desenvolvimento de vacinas contra diversas enfermidades que acometem humanos e animais.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar diferentes estratégias de manipulação e utilização da cepa vacinal 17D do vírus da febre amarela como vetor vacinal.

4.2 Objetivos específicos

- a) Construir e caracterizar a estabilidade fenotípica e genotípica de dois vírus recombinantes da YF para serem utilizados como vetor vacinal;
- b) Construir e caracterizar a replicação de dois replicons subgenômicos do YFV:
- c) Desenvolver e caracterizar uma linhagem celular expressando os genes prM/E do YFV;
- d) Verificar a capacidade da linhagem celular recombinante e empacotar replicons subgenômicos do YFV.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

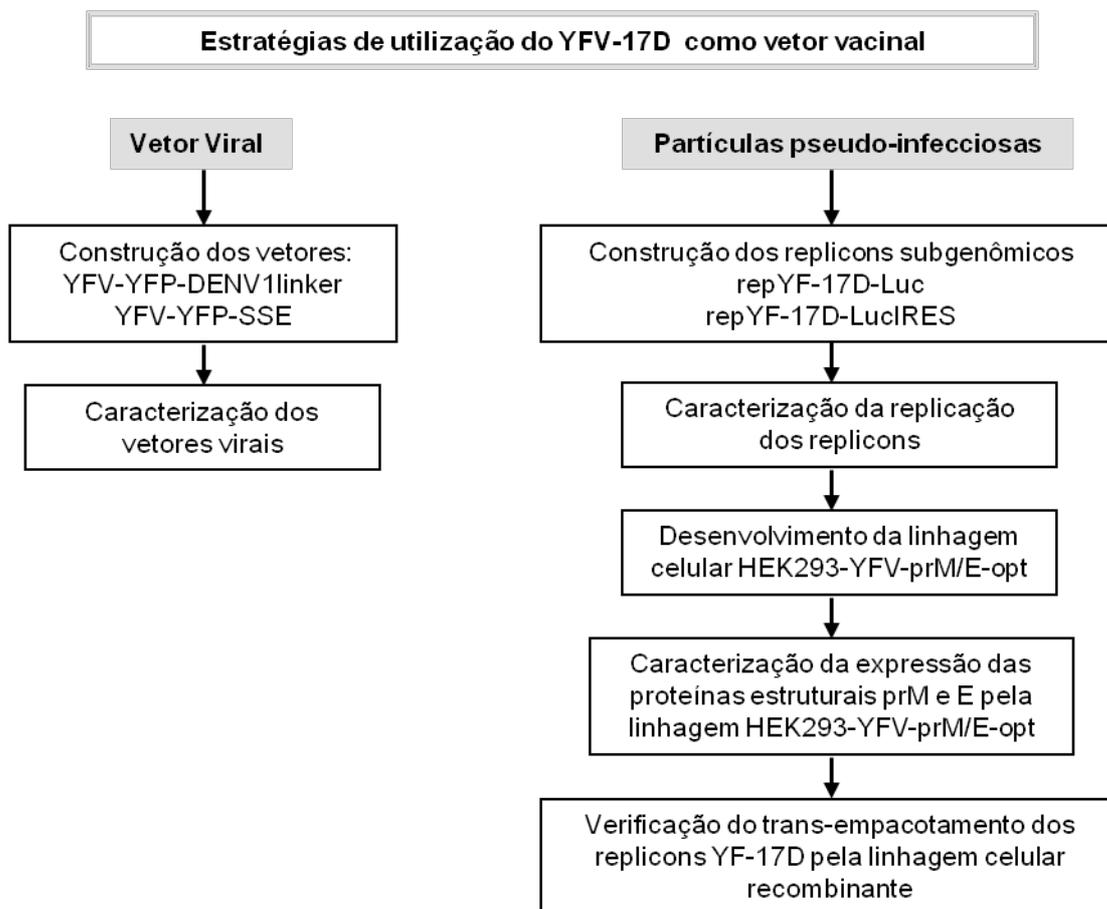


Figura 7. Fluxograma esquemático da metodologia empregada.

5.1 Cultivo de células e vírus

Células BHK21 (*baby hamster kidney*) e HEK293 (*human embrionic kidney*) foram mantidas em meio MEM (*minimal essential medium* – SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, EUA) e DMEM (*Dulbecco's modified eagle's medium* - SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, EUA), respectivamente, suplementados com 10% soro bovino fetal, 2 mM L-glutamina, penicilina (100 U/mL) e streptomicina (100 µg/mL). O vírus vacinal YFV-17D foi obtido do clone infeccioso pBSC-YFV-17D (em fase de elaboração)¹. O vírus YFV-17D foi amplificado e titulado em células BHK21 por ensaio de placas e estocado a -80°C para utilização como controle positivo nos experimentos.

¹ Construção de um clone infeccioso do vírus da febre amarela pela técnica de recombinação homóloga em levedura. Gil, et al. Manuscrito em fase de elaboração.

5.2 Clonagem das quimeras YFV-17D pela recombinação homóloga em levedura

5.2.1 Construção do vírus YFV-YFP-DENV1linker

O vírus YFV-YFP-DENV1linker foi construído segundo a estratégia utilizada por Bonaldo et al. (2007), para a construção de um vírus YFV-17D quimérico expressando o gene repórter *green fluorescent protein* (GFP) entre os genes das proteínas E e NS1 do YFV-17D. No entanto, o gene repórter utilizado nessa construção foi o *yellow fluorescent protein* (YFP).

A técnica de recombinação homóloga foi utilizada nas manipulações genéticas do plasmídeo pBSC-YFV-17D que contém o clone infeccioso do YFV-17D. O sítio de restrição para a enzima *NarI* localizado entre as proteínas E e NS1 do clone infeccioso pBSC-YFV-17D permitiu a linearização do vetor por esta enzima. O plasmídeo pBSC-YFV-17D, foi digerido com a enzima *NarI* na junção das proteínas prM/E, e posteriormente ligado por recombinação homóloga com dois fragmentos amplificados por PCR. Cada um dos fragmentos de PCR possuía sequências homólogas entre si e o vetor (Figura 8).

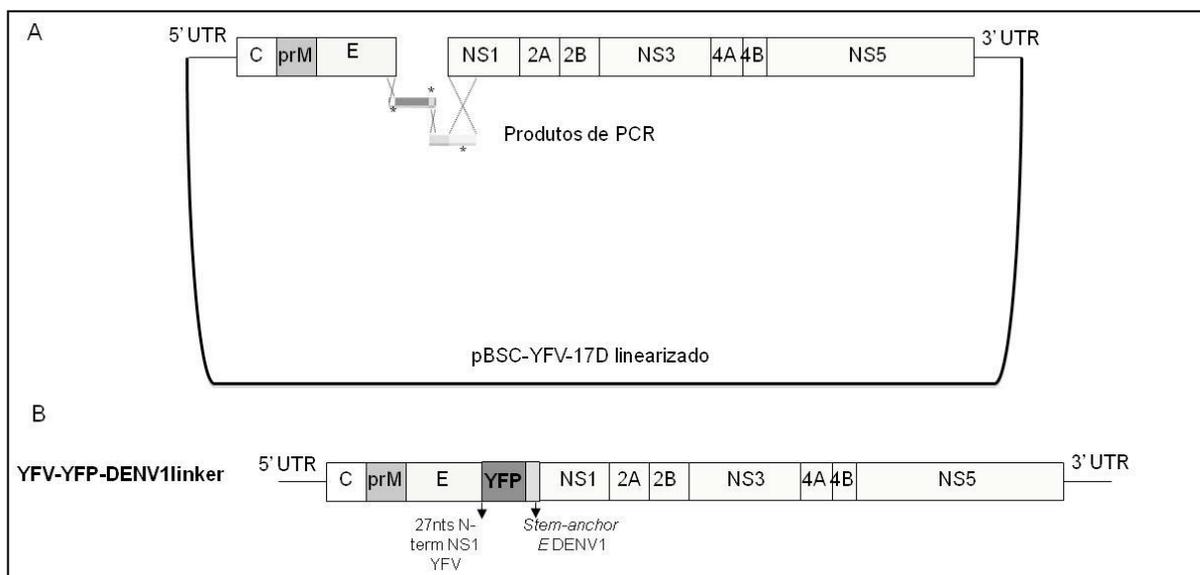


Figura 8. Representação esquemática da construção do vírus YFV-YFP-DENV1linker.

Nota: (A) Recombinação homóloga em levedura entre dois produtos de PCR e o vetor pBSC-YFV17D digerido pela enzima *NarI*. Os produtos de PCR estão representados com a indicação das sequências contidas em cada um; (B) Organização do genoma do vírus recombinante. * Sequências homólogas (25 nt) para recombinação em levedura, exceto em NS1 para a qual toda a sequência presente no produto (460 nt) participa da recombinação.

5.2.1.1 Preparação do vetor

Aproximadamente 4 µg do plasmídeo pBSC-YFV17D foi digerido com a enzima *NarI* a 37°C por oito horas, seguido da desfosforilação com 5 U da enzima fosfatase alcalina (CIAP - NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich, Massachusetts) durante 30min a 37°C. O produto digerido e desfosforilado foi visualizado em gel de agarose a 1% com brometo de etídio, e a banda específica do vetor digerido foi posteriormente excisada do gel e purificada com a utilização do kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, Hilden, Germany) segundo instruções do fabricante.

5.2.1.2 Reação de PCR para a recombinação

A construção do vírus YFV-YFP-DENV1linker foi realizada por recombinação homóloga em levedura de dois produtos de PCR contendo extremidades homólogas e o vetor pBSC-YFV-17D linearizado pela enzima *NarI* (NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich - Massachusetts). O primeiro fragmento (808 pb) foi amplificado com os *primers* YFV-E-YFP-F e Denv1linker-YFP-R e continha sequências dos 27 nt N-terminais do gene NS1 do YFV e o gene repórter YFP. O segundo fragmento (754 pb) foi amplificado com o par de *primers* *NarI*-Denv1linker-F e YFV-2812-R.e continha os 288 nt C-terminais do gene da proteína E do DENV1 (288 pb; DENV1-BR42735). Os *primers* utilizados nas reações de PCR são apresentados no Quadro 1. Um sítio de restrição *NarI* foi adicionado em cada uma das extremidades do gene YFP para viabilizar a substituição posterior do gene repórter por outros genes heterólogos.

Primer ^a	Sequência
YFV-E-YFP-F ^b	<u>GATGTTTTTGTCTCTAGGAGTTGGGGCCG</u> GACCAGGGCTGTGCAATTAATTTCCG GGCGCC ATGGTGAGCAAGGGCGAGG
Denv1linker-YFP-R ^c	<u>TCGGGCGGTTGCTTCGAACATTTTGGCGCC</u> CTTGTACAGCTCGTCCATGC
<i>NarI</i> -Denv1linker-F	<u>GGCGCCAAAATGTTTCGAAGCAACCGCC</u>
YFV-2812-R	GGAAAGAATTCCAGACCCGG

Quadro 1. *Primers* utilizados na construção do vírus YFV-YFP-Denv1linker.

Nota: As sequências homólogas para recombinação em levedura estão sublinhadas. Os sítios *NarI* inseridos pelos *primers* estão em negrito. ^a Os *primers* são identificados de acordo com as sequências que possuem e/ou amplificam. ^b F- *forward*. ^c R- *reverse*.

Para 40µL de reação de PCR foram utilizados tamp específico de PCR (ROCHE, Switzerland), 375 µg de cada dNTP, 2,5 mM MgCl, 1U da polimerase de alta fidelidade TGO (ROCHE, Switzerland), 15 pmol de *primers* específicos e aproximadamente 50 ng de DNA molde. As condições de PCR foram: 5 min a 95°C para desnaturação inicial, seguidos de 32 ciclos de 30 s de desnaturação a 95°C, 30 s. de anelamento a 55°C, 1 min de extensão para cada 1.000 pares de base (pb) a 72°C, e 20 min de extensão final a 72°C.

5.2.1.3 Transformação de levedura

Os fragmentos de PCR e o vetor pBSC-YFV-17D digerido com a enzima *NarI* foram introduzidos em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, cepa RFY-206, pela transformação com acetato de lítio (LiOAc) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). As leveduras foram amplificadas em meio líquido YPD (*Yeast Peptone Dextrose* – 20 g peptona, 10 g extrato de levedura, 20 g glucose, H₂O q.s.p 1 L), a 30°C por 8-10 h. No dia seguinte, meio YPD foi inoculado com a levedura em uma densidade ótica (DO) de 0,1, e posteriormente incubado a 30°C, até alcançar uma DO de 0,55. Em seguida, as leveduras foram concentradas por centrifugação, lavadas e transformadas com acetato de lítio (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Após a transformação, as leveduras foram plaqueadas em placas de YNB (*Yeast Nitrogen Base* – 6,7 g *Yeast nitrogen base w/o amino acids, w/ ammonium sulfate* – SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, EUA - 20g glucose, 1:10 V/V solução de aminoácidos 10X – *Yeast synthetic drop-out medium without tryptophan* – SIGMA-ALDRICH, St Louis,

MO, EUA) sólido na ausência do aminoácido triptofano (trp) e mantidas a 30°C por três dias.

5.2.1.4 Extração de DNA de levedura e confirmação dos clones

Colônias positivas para a recombinação entre os fragmentos de DNA (vetor e inserto) foram cultivadas em 20 mL de meio YNB líquido, na ausência de trp por 18-24 h a 30°C. Após o período de incubação, as células foram concentradas por centrifugação, lavadas com ddH₂O e ressuspensas em 400 µl de tampão SCE (1 M Sorbitol, 100 mM NaAc e 60mM EDTA). Em seguida, foram adicionados 4 µl de *Zymolase* (200 mg/ml) e 2 µl β-mercaptoetanol. As células foram incubadas a 37°C por 1 h e depois concentradas por centrifugação. A extração de DNA plasmideal foi realizada com o kit QIAprep Spin MiniPrep (QIAGEN, Hilden, Germany), seguindo recomendações do fabricante. A construção foi confirmada por PCR com par de *primer* específico para amplificar um produto contendo parte do vetor e dos produtos recombinados. As condições de PCR foram as mesmas descritas no item 5.2.1.2.

5.2.2 Construção do vírus YFV-YFP-SSE

A construção do vírus YFV-YFP-SSE baseou-se na estratégia de Bredenbeek et (2006) que construíram um vírus YFV-17D recombinante com inserção de um gene heterólogo entre as proteínas E e NS1 seguido por uma duplicação da sequência dos 23 aa C-terminais da proteína do envelope. Essa sequência duplicada corresponde à sequência sinal da proteína E (*signal sequence envelope – SSE*).

A recombinação em leveduras foi realizada com o vetor pBSC-YFV-17D linearizado com a enzima *NarI* e dois fragmentos de PCR contendo extremidades com sequências homólogas entre si e o YFV-17D (Figura 9). O primeiro produto (792 pb) foi amplificado com o seguinte par de *primers*: E-YFV-eYFP-F e eYFP-SSE-R e continha o gene YFP e os 44 nt N-terminais da sequência sinal da proteína E.

O segundo produto (586 pb) amplificado pelo par de *primers* ssE-NS1YFV-F e YFV-2980-R, continha 44 nt C-terminais da sequência sinal de E seguidos por 536 nt N-terminais do gene NS1. A sequência sinal do envelope foi inserida pelos *primers* (eYFP-SSE-R e ssE-NS1YFV-F).

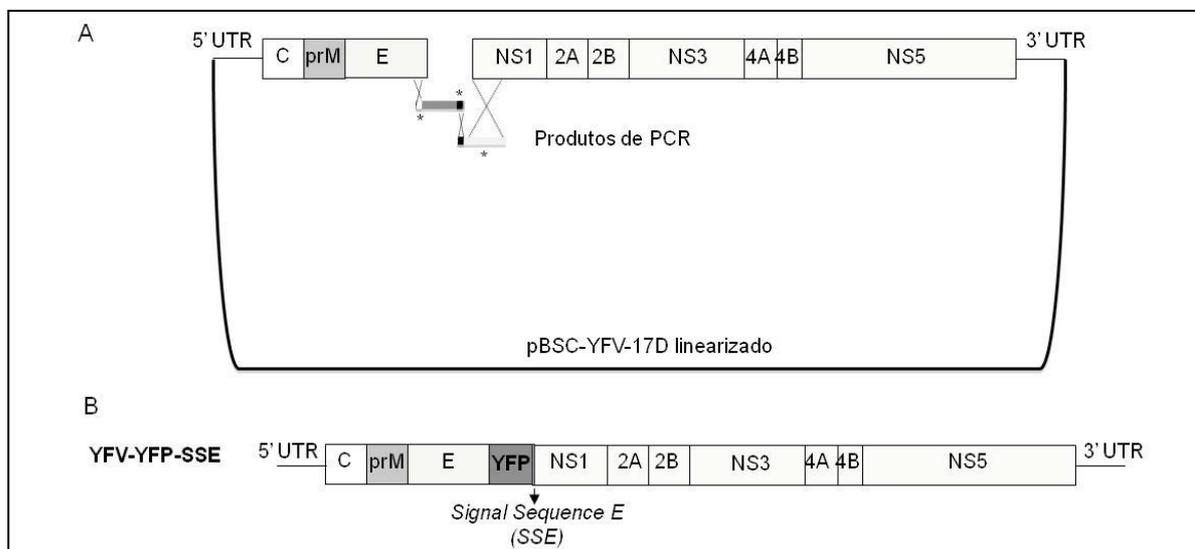


Figura 9. Representação esquemática da construção do vírus YFV-YFP-SSE.

Nota: (A) Recombinação homóloga em levedura entre dois produtos de PCR e o vetor pBSC-YFV17D digerido pela enzima *NarI*. Os produtos de PCR estão representados com a indicação das sequências contidas em cada um; (B) Organização do genoma do vírus recombinante. * Sequências homólogas (25 nt) para recombinação em levedura, exceto em NS1 para a qual toda a sequência presente no produto (536 nt) participa da recombinação.

Os *primers* utilizados para as reações de PCR estão apresentados no Quadro 2. Um sítio de restrição para *NarI* foi inserido nas extremidades do gene repórter e estão indicadas na sequência dos *primers*. Essa inserção visou à substituição posterior do gene repórter por outra sequência heteróloga.

Primer ^a	Sequência
E-YFV-eYFP-F ^b	<u>GT</u> TTTTGTCTCTAGGAGTT GGCGCC CATGGTGAGCAAGGGCGGAGG
eYFP-SSE-R ^c	ATCATTATGACGCCAACTAATATCATACTCATTGACATAGTCAT GGCGCC CCTTGT ACAGCTCGTCCATG
ssE-NS1YFV-F	<u>TGATATTAGTTGGCGTCATAATGATGTTCTTATCACTTGGTGTAGGGGCGGATCA</u> AGGATGCGCCATCAAC
YFV-2980-R	CAGTCTATGGTGTATTCAAAG

Quadro 2. *Primers* utilizados na construção do vírus YFV-YFP-SSE.

Nota: As sequências homólogas para recombinação em levedura estão sublinhadas. ^a Os *primers* são identificados de acordo com as sequências que possuem e/ou amplificam. ^b F- *forward*. ^c R- *reverse*.

Os procedimentos de preparação do vetor, condições das reações de PCR, transformação em leveduras, extração de DNA da levedura e confirmação dos clones foram realizados como descrito nos itens 5.2.1.1, 5.2.1.2, 5.2.1.3 e 5.2.1.4.

5.3 Caracterização *in vitro* das quimeras virais construídas

Para a caracterização dos vírus YFV quiméricos construídos, RNA sintetizados *in vitro* de cada construção foram introduzidos em células eucarióticas por eletroporação. A replicação viral e a expressão das proteínas virais foram avaliadas por fluorescência do gene repórter e imunofluorescência indireta (IFI).

5.3.1 PCR do genoma completo e transcrição *in vitro*

A amplificação completa do genoma viral foi realizada em uma reação de 50 µL utilizando a enzima KlenTaq-LA (CLONTECH, Mountain View, CA). A reação foi composta de 100 ng de DNA plasmideal de levedura, 1X do tampão KlenTaq-LA (CLONTECH, Mountain View, CA), 1,3% Dimetil-sulfóxido (DMSO – *Dimethyl sulfoxide*, SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, EUA), 0,4 M betaína (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, EUA), 200 µM de cada dNTP, 1U KlenTaq-LA *polymerase* e 20 pmol de *primers* específicos (PBSC-*RSRII-T7-5'-YFV-F* e YFV-3'UTR F). Esses *primers* se alinham nas extremidades 5'-UTR e 3'UTR do genoma YFV-17D, respectivamente. O primer PBSC-*RSRII-T7-5'-YFV-F* contém a sequência do promotor para RNA polimerase de bacteriófago T7, o que permite a transcrição *in vitro* do produto de PCR amplificado com este par de *primers*. As condições de amplificação foram: 4 min a 95°C para desnaturação inicial, seguido de 32 ciclos de 1 min de desnaturação a 93°C, 1 min de anelamento a 56°C, 13 min de extensão a 72°C com acréscimos de 10 s a cada ciclo e 20 min finais de extensão a 72°C.

O produto de PCR, contendo a sequência completa do genoma viral, possuía na região 5' terminal a sequência para o promotor bacteriófago T7, o qual foi inserido através do *primer* utilizado para a amplificação. Após purificação com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol, a transcrição *in vitro* foi realizada utilizando-se o kit T7 MEGAscript (AMBION, Foster City, CA, USA), com a adição do análogo 7-metil-guanina (cap), seguindo as recomendações do fabricante.

5.3.2 Transfecção do RNA viral em células BHK21 por eletroporação

Para a eletroporação de células BHK21 foram utilizados: 20 µg do RNA transcrito *in vitro* e 2×10^6 células BHK21 em 100 µl de cytomix (ANSARI et al., 2004). A eletroporação foi realizada em cuvetas de 2 mm, seguindo as seguintes condições: 600V, 99 µseg, 5 pulsos, 1 s de intervalo entre os pulsos (eletroporador ECM-830, BTX). As células foram individualizadas com tripsina 0,02% por 5 min (tripsinizadas), lavadas uma vez com meio MEM (sem suplementos e antibióticos) e ressuspensas em Cytomix. Após a eletroporação, as células foram mantidas em repouso à temperatura ambiente por aproximadamente 5 min, antes de serem ressuspensas em meio MEM completo e distribuídas em frascos de cultura de 25 cm². Estas condições de eletroporação foram testadas previamente e apresentaram eficiência de transformação de aproximadamente 70%.

5.3.3 Ensaios de fluorescência e imunofluorescência indireta

As células eletroporadas com o RNA viral foram acompanhadas nos dias 1–10 após eletroporação, pela visualização de fluorescência para a detecção da expressão do gene repórter YFP e imunofluorescência indireta. Foram utilizados anticorpos policlonais específicos para *Flavivirus* produzidos em camundongos (fluido ascítico hiperimune anti-*Flavivirus* grupo B - Instituto Evando Chagas, Belém; diluição 1:100 em PBS pH 7,2) e anticorpos secundários anti-camundongo IgG conjugados com isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate* –FITC) (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, EUA; diluição 1:100 em PBS pH 7,2). A microscopia de fluorescência e imunofluorescência indireta foram realizadas utilizando-se o microscópio Leica DMI 4000B.

A expressão do gene repórter foi detectada por visualização direta de células transfectadas (ou infectadas) ao microscópio. As células foram lavadas com PBS para melhor visualização da fluorescência.

Para a detecção de antígenos virais por imunofluorescência indireta, células BHK21 transfectadas e cultivadas em placas de cultura foram fixadas em solução de

acetona 50% (em PBS pH 7,2) por 10 min a -20°C. Posteriormente, foram incubadas a 37°C por 1h com os anticorpos primários, lavadas duas vezes com PBS (p.H 7,2) e secadas à temperatura ambiente. Após incubação a 37°C por 1 h com os anticorpos secundários, as células foram novamente lavadas com PBS, secas e montadas para leitura com glicerol (50% em PBS) e lamínula de vidro.

5.3.4 Extração de RNA

A extração do RNA viral de amostras do sobrenadante de células infectadas foi realizada através do kit *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany) de acordo com instruções do fabricante. Amostras de 200 µl de sobrenadante clarificado por centrifugação (335 g por 5 min) foram lisadas por tampão de lise correspondente e, em seguida, foram carregadas em coluna de purificação. Após a ligação do RNA a membrana de sílica-gel, os contaminantes foram removidos por duas lavagens com dois tampões específicos. O RNA foi eluído da coluna com uma solução tamponada livre de RNase e armazenado a -70°C até o momento do uso.

5.3.5 Transcrição Reversa e PCR

A transcrição reversa foi realizada utilizando-se a enzima *Superscript III reverse transcriptase* 200 U/µl (INVITROGEN, Carlsbad, CA, EUA), *primers* específicos para cada construção e inibidor de RNase - RNase OUT 40 U/µl (INVITROGEN, Carlsbad, CA, EUA), seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante (INVITROGEN, Carlsbad, CA, EUA) para 20 µl de reação. As condições das reações de PCR foram semelhantes aquelas descritas no item 5.2.1.2.

5.3.6 Sequenciamento

As regiões recombinadas de cada construção, correspondente ao gene heterólogo, foram sequenciadas. Posteriormente, foi realizado o sequenciamento do genoma completo das construções plasmideais e do vírus recombinante YFV-YFP-DENV1linker recuperado. As reações de sequenciamento foram realizadas com o mix *BigDye terminator* (Applied Biosystem) de acordo com instruções do fabricante. As análises das sequências de nt foram realizadas com *softwares* do pacote Lasergene® (DNASTAR Inc.) e uma sequência consenso de cada vírus foi gerada pelo *software* SeqMan II (Lasergene®, DNASTAR Inc.).

5.3.7 Curva de replicação e caracterização de placas virais

As curvas de replicação de cada vírus construído foram determinadas por infecção de células BHK21 com multiplicidade de infecção (*multiplicity of infection - MOI*) de 0,02. As células foram distribuídas em placa de 12 poços (2×10^5 células/poço) e infectadas quatro horas depois. Alíquotas do sobrenadante foram coletadas, em intervalos de 24 horas pós-infecção, durante cinco dias. O meio de cultura foi repostado a cada coleta e a quantificação das partículas virais foi realizada por ensaio de placas em células BHK21. Para o ensaio de placa, os vírus foram amplificados em células BHK21 distribuídas em placas de 24 poços (10^5 células/poço) com meio semi-sólido de 1% agarose (INVITROGEN, Carlsbad, CA, EUA) em MEM 2X suplementado com 2,5% de SFB, penicilina (100 U/mL), streptomomicina (100 µg/mL) e anfotericina B (250 ng/mL). Após cinco dias de incubação a 37°C e 5% CO₂, as placas formadas foram reveladas pela coloração com solução de MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*) 5 mg/mL em PBS. O YFV-17D foi usado como controle em todos os ensaios. O experimento foi realizado em duplicata.

5.4 Construção dos replicons subgenômicos do YFV-17D expressando o gene repórter luciferase (Luc)

5.4.1 Clonagem do replicon monocistrônico repYF-17D-Luc

O replicon repYF-17D-Luc foi construído pela técnica de recombinação homóloga em levedura com a utilização do replicon repYFV-17D anteriormente construído em nosso laboratório (em fase de elaboração)² Essa estratégia teve por objetivo a construção de um replicon subgenômico YFV-17D que expressasse o gene repórter Luc entre os 63 nt N-terminal do capsídeo e os 72 nt C-terminal da proteína E, seguido pelo restante das proteínas virais NS1-NS5 (Figura 10).

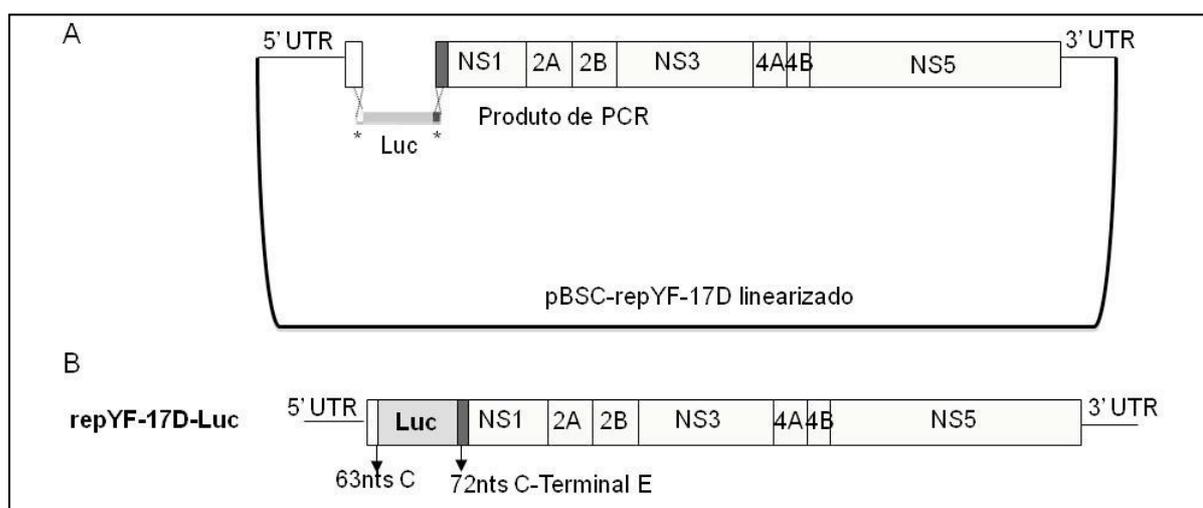


Figura 10. Representação esquemática da construção do replicon monocistrônico repYF-17D-Luc. Nota: (A) Recombinação homóloga em levedura entre um produto de PCR e o vetor pBSC-repYFV-17D digerido pela enzima *NarI*. O produto de PCR está representado com a indicação das sequências que ele contém (B) Organização do genoma do replicon monocistrônico repYF-17D-Luc. * Sequências homólogas (25 nt) para recombinação em levedura.

5.4.1.1 Amplificação dos fragmentos de recombinação por PCR e digestão do vetor pBSC-repYF-17D

² Replicon do vírus febre amarela desprovido de proteínas estruturais C, prM e E construído pela técnica de recombinação homóloga em levedura. Gil et al. Manuscrito em fase de elaboração.

O gene da enzima luciferase necessário para a recombinação foi amplificado por PCR usando como molde o plasmídeo LNBr-WT (cedido gentilmente pelo Dr. Ruben Donis, CDC, Atlanta – E.U.A.). Os *primers* são demonstrados no Quadro 3 e as condições de PCR foram descritas no item 5.2.1.2. O plasmídeo pBSC-repYF-17D foi linearizado com a enzima *NarI*, desfosforilado e, juntamente com o produto de PCR, purificado como descrito no item 5.2.1.1.

Primer ^a	Sequência
Rep-YFV-Luc-F ^b	<u>CAATATGGTACGACGAGGAGTTTCGCATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG</u>
Rep-YFV-Luc-R ^c	<u>TCATGCTCATGGACATTGTCATGTTCAATTTGGACTTCCGCCCTTCTTG</u>

Quadro 3. *Primers* utilizados na construção do replicon monocistrônico repYF-17D-Luc.

Nota: As sequências homólogas para recombinação em levedura estão sublinhadas. ^a Os *primers* são identificados de acordo com as sequências que possuem e/ou amplificam. ^b F- *forward*. ^c R- *reverse*.

5.4.1.2 Transformação da levedura e extração de DNA plasmideal de levedura

Os procedimentos realizados são os mesmos descritos nos itens 5.2.1.3 e 5.2.1.4.

5.4.1.3 Transformação e extração de DNA plasmideal de bactérias

O DNA extraído de levedura foi utilizado para transformar células de *E. coli* (linhagem DH10B) por eletroporação. As condições para cuvetas de 2 mm foram: 2,75 kV, 5 pulsos de 99 µs e intervalo de 1 entre os pulsos. Após a eletroporação, as bactérias foram distribuídas em placas de meio LB sólido contendo cloranfenicol (10 mg/mL) e incubadas a 37°C durante 16-20 horas. Colônias positivas foram confirmadas contendo o plasmídeo recombinante por PCR e, posteriormente, foram crescidas em 5 mL de meio LB contendo cloranfenicol (20 mg/mL) a 37°C sob agitação durante 16-20 horas. Este pré-inóculo foi inoculado em 500 mL de meio LB com o antibiótico de seleção e incubado a 37°C por 16-20 horas. Posteriormente, as

células foram concentradas por centrifugação e o DNA plasmideal preparado utilizando-se o kit *Plasmid Midi* (QIAGEN, Hilden, Germany), seguindo as recomendações do fabricante.

5.4.2 Clonagem do replicon bicistrônico repYF-17D-LucIRES

O replicon bicistrônico repYF-17D-LucIRES foi construído a partir do clone infeccioso do vírus da febre amarela 17D (pBSC-YFV-17D) utilizando-se a técnica de recombinação homóloga em leveduras como descrito anteriormente (5.2.1.3). Os genes das proteínas estruturais prM e E foram deletados, restando apenas seis resíduos da proteína prM e 24 resíduos C-terminais da proteína E, para o correto processamento da proteína C e sinalização para a proteína NS1, respectivamente. O gene repórter Luc e o IRES do vírus da encefalomiocardite (ECMV) foram clonados no local dos genes das proteínas estruturais deletados. O elemento IRES foi inserido entre o códon de parada do gene repórter Luc e o códon de iniciação da sequência sinal de NS1 (24 aa da proteína E) (Figura 11).

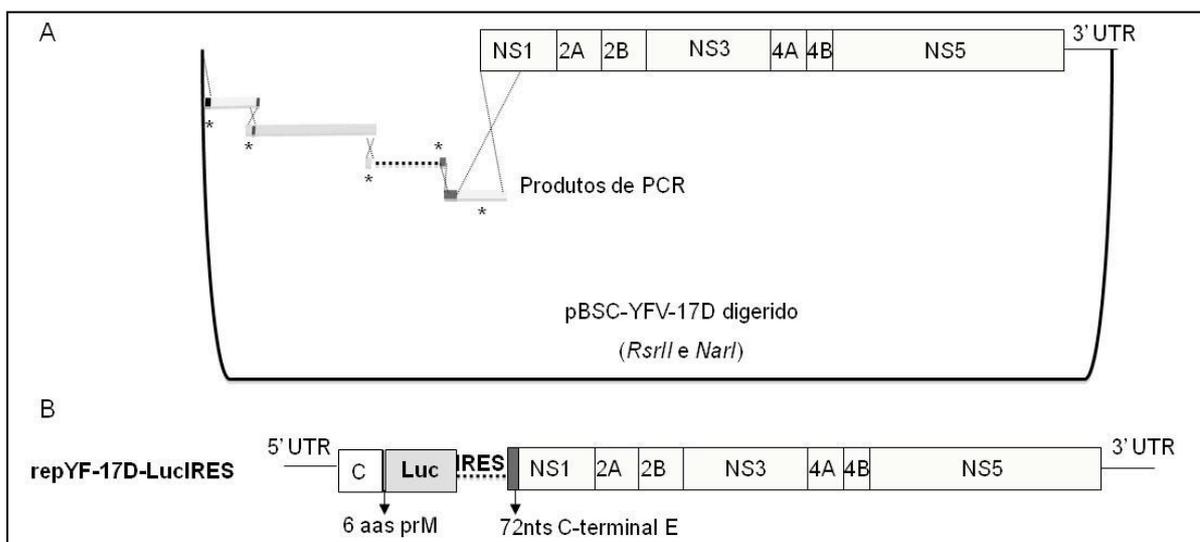


Figura 11. Representação esquemática da construção do replicon bicistrônico repYF-17D-LucIRES. Nota: (A) Recombinação homóloga em levedura entre quatro produtos de PCR e o vetor pBSC-YFV-17D digerido pela enzimas *RsrII* e *NarI*. Os produtos de PCR estão representados pela cor das sequências que eles contém (B) Organização do genoma do replicon bicistrônico repYF-17D-LucIRES. * Sequências homólogas (25 nt) para recombinação em levedura, exceto em NS1, para a qual toda a sequência presente no produto (536 nt) participa da recombinação.

As metodologias utilizadas para a clonagem do replicon repYF-17D-LucIRES foram semelhantes às aquelas descritas nos itens 5.2.1.1, 5.2.1.2, 5.2.1.3 e 5.2.1.4. O vetor pBSC-YF-17D foi digerido pelas enzimas *RsrII* e *NarI* para liberação das proteínas estruturais prM e E. Posteriormente, a recombinação homóloga foi realizada entre o vetor pBSC-YF-17D digerido/purificado e quatro produtos de PCR. O primeiro produto (549 pb) contém a região 5'-UTR e o gene da proteína C, seguido pela sequência dos seis aa da prM; o segundo produto (2.332 pb) contém os sete nt N-terminais de C, a sequência dos seis aa da prM e o gene repórter Luc; o terceiro produto contém a sequência IRES-ECMV (676 pb); o quarto produto contém os 72 nt da sequência sinal da proteína E seguidos pela sequência N-terminal de NS1. Os *primers* utilizados nas reações de PCR são mostrados no Quadro 4.

Primer ^a	Sequência
pBSC- <i>RsrII</i> -T7-	<u>CAAGCATGTAAATATCGTTTGAGTTCGGTCCGTAATACGACTCACTATAGAGTAAA</u>
5'YFV-F ^b	TCCTGTGTGCTAATTGAGG
PrM/Cap-R ^c	TTCCGCACCAAGGTCCTC
YFV Luc Neo-F	<u>CGGTGGAGTGACCTTGGTGCGGAAAATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG</u>
rep-YFV-LUC-R	TCATGCTCATGGACATTGTCATGTTCAATTTGGACTTTCGCCCTTCTTG
Luc-EMCV-F	<u>CAAGAAGGGCGGAAAGTCCAAATTGTGAGGCCCGCCAGACCACAACGGTTTCCC</u> TC
EMCVYFVc'Env-R	<u>TCATGGACATTGTCATGTTTCTTGTCATGGTATTATCGTGTTTTTCAAAGG</u>
YFV-2375-F	ACAAGAAACATGACAATGTCC
YFV-2980-R	CAGTCTATGGTGATTCAAAG

Quadro 4. *Primers* utilizados na construção do replicon bicistrônico repYF-17D-LucIRES.

Nota: As sequências homólogas para recombinação em levedura estão sublinhadas. ^a Os *primers* são identificados de acordo com as sequências que possuem e/ou amplificam. ^b F- forward. ^c R- reverse.

A confirmação da recombinação foi realizada por amplificação dos produtos de PCR esperados, contendo os genes inseridos durante a recombinação. Após, extração do DNA plasmideal de levedura, este foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* DH10B como descrito no item 5.4.1.3.

5.5 Caracterização dos replicons repYF-17D-Luc e repYF-17D-LucIRES

A replicação dos replicons subgenômicos do YFV foi avaliada por imunofluorescência indireta e níveis de luciferase após a transfecção de células BHK21 com RNAs transcritos *in vitro*. Para a confirmação e caracterização dos replicons foram realizados procedimentos semelhantes aos descritos para os vírus repórter YFV-17D. Os procedimentos de PCR do genoma completo e transcrição *in vitro*, transfecção de células BHK21 e imunofluorescência indireta foram realizados como descritos nos itens 5.3.1, 5.3.2 e 5.3.3, respectivamente.

5.5.1 Teste de atividade luciferase

Para a preparação do extrato celular utilizado no teste de atividade da enzima luciferase, células BHK21 transfectadas com o RNA transcrito *in vitro* de cada replicon foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,2 e lisadas pela adição do reagente de lise celular (PROMEGA, Fitchburg, Wisconsin). O extrato celular foi clarificado e 20 µL do sobrenadante foram misturados com 100 µL do substrato luciferina (PROMEGA, Fitchburg, Wisconsin). A atividade da luciferase foi mensurada usando o luminômetro Mithras LB 940 (Berthold).

5.6 Desenvolvimento de uma linhagem celular expressando os genes estruturais prM e E do YFV

5.6.1 Otimização e síntese da sequência dos genes prM e E do YFV para expressão em células eucariotas

A sequência dos 84 nt C-terminais do gene da proteína C foram submetidos à otimização do uso do códon para expressão em células eucariotas juntamente com as sequências completas dos genes das proteínas prM e E (Leto 1.0 *Software*). As sequências otimizadas foram sintetizadas comercialmente (GENEART, Regensburg, Germany) e, posteriormente clonadas no vetor comercial pcDNA3.1™(+) (INVITROGEN, Carlsbad, CA, EUA) para expressão em células eucariotas. Os sítios de restrição *NheI* e *KpnI* inseridos nas extremidades da sequência na otimização foram utilizados para a clonagem das proteínas virais no vetor (Figura 12).

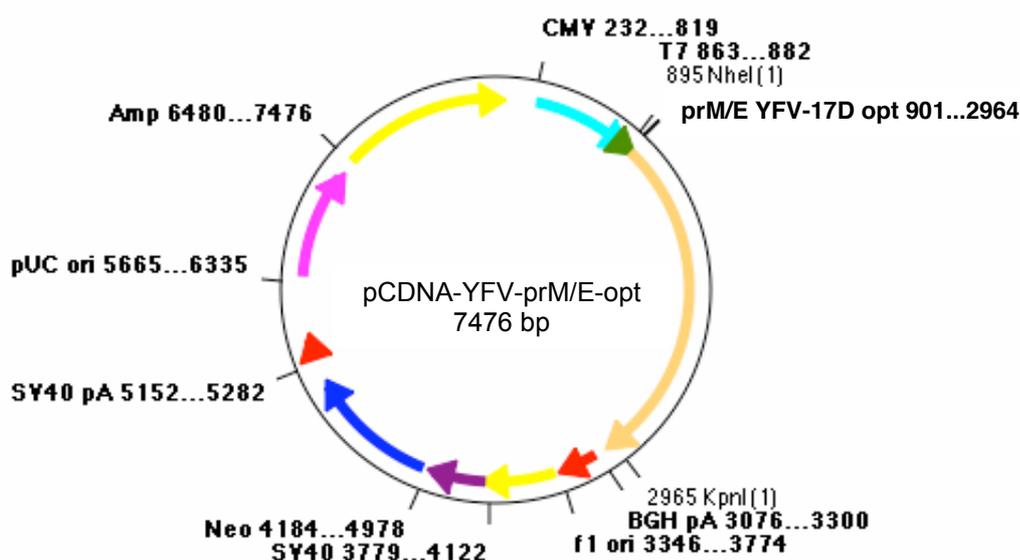


Figura 12. Mapa do plasmídeo pCDNA-YFV-prM/E-opt elaborado pelo programa Ape-A plasmid Editor v1.10.4.

Nota: A posição das principais sequências do vetor e os sítios de restrição *NheI* e *KpnI* usados na clonagem da sequência alvo estão identificados.

5.6.2 Transformação de *E. coli* e confirmação de clonagem

Bactérias *E. Coli* (DH10B) foram transformadas por eletroporação com o DNA plasmideal pCDNA-YFV-prM/E-opt e colônias positivas, confirmadas por PCR com par de *primers* específicos, foram crescidas para preparação de DNA plasmideal como descrito no item 5.4.1.3.

5.6.3 Eletroporação de células HEK293 e seleção das células transformadas

Células HEK293 foram eletroporadas com 10 µg de DNA pCDNA-YFV-prM/E-opt plasmideal como descrito no item 5.3.3 com algumas modificações. Uma suspensão de 4×10^6 células HEK293 em 400 µL de Cytomix (ANSARI et al., 2004) foram eletroporadas em cuvetas de 4mm, seguindo as seguintes condições: 600V, 100 µs, 4 pulsos, 1 s de intervalo entre os pulsos (eletroporador ECM-830, BTX). Após 48h de eletroporação, as células foram cultivadas diariamente em meio DMEM suplementado com 10% soro bovino fetal, 2 mM L-glutamina, penicilina (100 U/mL), streptomicina (100 µg/mL) e Geneticin® (GIBCO BRL Life Technologies, São Paulo, Brasil) (700 ug/mL) para seleção das células transformadas durante, aproximadamente, 15 dias.

5.6.4 Seleção dos clones celulares por diluição limitante

Após a seleção das células transformadas foi realizada uma diluição limitante para seleção de clones individuais. Em resumo, foi realizada uma diluição das células selecionadas para isolamento de clones em placa de 96 poços para posterior cultivo com 500 µg/mL de Geneticin® (GIBCO BRL Life Technologies, São Paulo, Brasil) e estoque a -80 °C. Os clones foram avaliados por imunofluorescência indireta, *Western Blotting* e citometria de fluxo.

5.7 Caracterização da linhagem celular HEK293-YFV-prM/E-opt

5.7.1 Imunofluorescência indireta

Células HEK293 transformadas e selecionadas foram fixadas com metanol (P.A.) por 5 min a -20°C . Depois de fixadas, a imunofluorescência indireta foi realizada como descrito no item 5.3.3. As células foram observadas ao microscópio de fluorescência confocal Leica SP2 AOBS e as imagens analisadas pelo *software* Lit Leica Confocal.

5.7.2 Curvas de multiplicação celular

As taxas de multiplicação das células da linhagem HEK293-YFV-prM/E-opt foram quantificadas por contagem diária com intervalo de 24 h durante cinco dias. As células foram individualizadas com tripsina 0,02% EDTA por 5 min e em seguida ressuspensas em DMEM suplementado com 10% de SFB numa concentração final de 1×10^5 células/mL. Em seguida, 2 mL da suspensão de células foram distribuídos em cada poço de uma placa de seis poços e individualizadas diariamente por tripsinização para contagem no contador de células Vi-Cell (*Beckman Coulter*). Dois experimentos independentes foram realizados.

5.7.3 Citometria de fluxo

Células da linhagem HEK293-YFV-prM/E-opt foram tripsinizadas e em seguida ressuspensas em 5 mL de DMEM, suplementado com 10% de SFB. Subsequentemente, as células foram lavadas duas vezes com solução de lavagem *PBS-Wash* (0,5% BSA/0,1% azida sódica) e incubadas por 10 min com solução *PBS-P* (0,5% BSA/ 0,1% azida sódica/ 0,5% saponina). Após incubação à temperatura ambiente, as células foram lavadas com *PBS-Wash*, centrifugadas a 335 g/10 min e ressuspensas em 20 μL de um anticorpo oligoclonal anti-proteína do E de YFV-17D (diluição 1:100 em PBS), produzido e caracterizado anteriormente em nosso laboratório. Após incubação de 30 min a 37°C em ambiente protegido da luz, as células foram lavadas mais uma vez e o *pellet* foi ressuspensado em 20 μL de uma diluição 1:100 em PBS do anticorpo anti-IgG de coelho (SIGMA-ALDRICH, St

Louis, MO, EUA). Após uma segunda incubação no escuro a 37 °C, as células foram lavadas com as soluções PBS-*Wash* e PBS-P, ressuspendidas em 500 µL de formaldeído (1 x 10⁶ células) e mantidas a 4 °C até o momento das análises. Células não transfectadas foram usadas como controle negativo. As amostras foram lidas em um citômetro FACSCalibur (Becton Dickson Immunocytometry Systems, Texas, U.S.) e analisadas pelo *software* CellQuestPro.

5.7.4 Concentração das partículas subvirais recombinantes (RSPs)

Sobrenadantes de cultivo celular foram coletados, clarificados (600 g/10 min) e o *pellet* de RSPs foi obtido por ultracentrifugação a 63.000 *g* por 2 h na ultracentrífuga Optima™ LE-80K (Beckman Coulter). O *pellet* foi ressuspendido em 1:100 (V:V) do volume inicial em uma solução de 5% de albumina sérica bovina (BSA) em PBS e mantidos a -80C até o uso.

5.7.5 *Western blotting*

Os ensaios de *Western blotting* foram realizados sob condições desnaturantes. As células da linhagem HEK293-YFV-prM/E-opt e o *pellet* de RSPs foram lisados com tampão Laemmli e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%. As bandas protéicas no gel, depois da eletroforese SDS-PAGE, foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpo oligoclonal anti-E YFV (*in house*- Diluição 1:250) por 1 h, e depois com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, EUA) na diluição 1:500, por 1 h à temperatura ambiente. As bandas da proteína E foram visualizadas com substrato *Immobilon Western Chemiluminiscent HRP* (MILLIPORE, Billerica, MA, EUA).

5.7.6 Trans-empacotamento

A habilidade de trans-empacotamento foi avaliada utilizando-se os replicons repYF-17D-Luc e repYF-17D-LucIRES. O replicon repYF-17D-Luc possui o gene repórter Luc entre os 63 nt restantes da proteína do capsídeo e 72 nucleotídeos da proteína do envelope. Este replicon foi utilizado como controle negativo do trans-empacotamento devido à ausência da proteína do capsídeo. O segundo replicon, repYF-17D-LucIRES, possui as regiões das proteínas prM e E deletadas em sua maioria, retendo apenas as sequências sinais de processamento dessas proteínas, o que permite que este replicon seja empacotado pelo fornecimento das proteínas prM e E pela linhagem celular recombinante HEK293-YFV-prM/E-opt.

Células HEK293-YFV-prM/E-opt foram eletroporadas com 20 µg de RNA destes replicons e após detecção de uma taxa elevada de atividade luciferase, alíquotas de sobrenadante destas células foram coletadas e inoculadas em novas células HEK293 comuns, sem expressão de proteínas estruturais do YFV. Nessas novas células inoculadas foi investigada a presença do replicon empacotado, através de ensaios de imunofluorescência indireta e atividade luciferase. Células da linhagem HEK293-YFV-prM/E-opt também foram utilizadas para amplificação de PPIs. Os RNAs dos replicons foram preparados como descrito no item 5.3.1

5.7.6.1 Transfecção de células HEK293-YFV-prM/E-opt por eletroporação

Células HEK293-YFV-prM/E-opt foram eletroporadas pelo sistema Neon™ Transfection System, 100 µl Neon™ TIP (INVITROGEN, Carlsbad, CA, EUA), seguindo instruções do fabricante. As condições de eletroporação de 5×10^6 células foram: 1.100 V, 20 ms e dois pulsos. Após eletroporação, as células foram ressuspensas em 4 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB sem antibióticos e distribuídas da seguinte maneira: aproximadamente 10^6 células (por poço) em placa de seis poços e 2×10^5 células em placa de 24 poços (por poço). Essa distribuição visava uma melhor acomodação celular para multiplicação durante cinco dias (placa de seis poços) e otimização da lise diária de células para avaliação

da atividade luciferase sem estresse celular por excesso de manipulação (placa de 24 poços).

5.7.6.2 Análise da replicação de PPIs

Partículas pseudo-infecciosas produzidas pelas células HEK293-YFV-prM/E-opt eletroporadas foram coletadas com intervalos de 24 h pós-eletroporação e substituição do meio de cultura. O cultivo de PPIs foi realizado pela infecção de células HEK293 e HEK293-YFV-prM/E-opt com 750 μ L (de um total de 2 mL) de PPIs coletadas. A replicação das partículas pseudo-infecciosas foi avaliada por expressão do gene repórter Luc, como descrito anteriormente no item 5.5.1.

6 RESULTADOS

6.1 Construção dos vetores virais

6.1.2 Construção e caracterização da construção YFV-YFP-DENV1linker

Seis clones de *S. cerevisiae* RFY206 YFV-YFP-DENV1linker foram testados após a recombinação homóloga e, dentre os quais, cinco foram confirmados recombinantes pela amplificação de produtos de PCR com o padrão esperado (Figura 13).

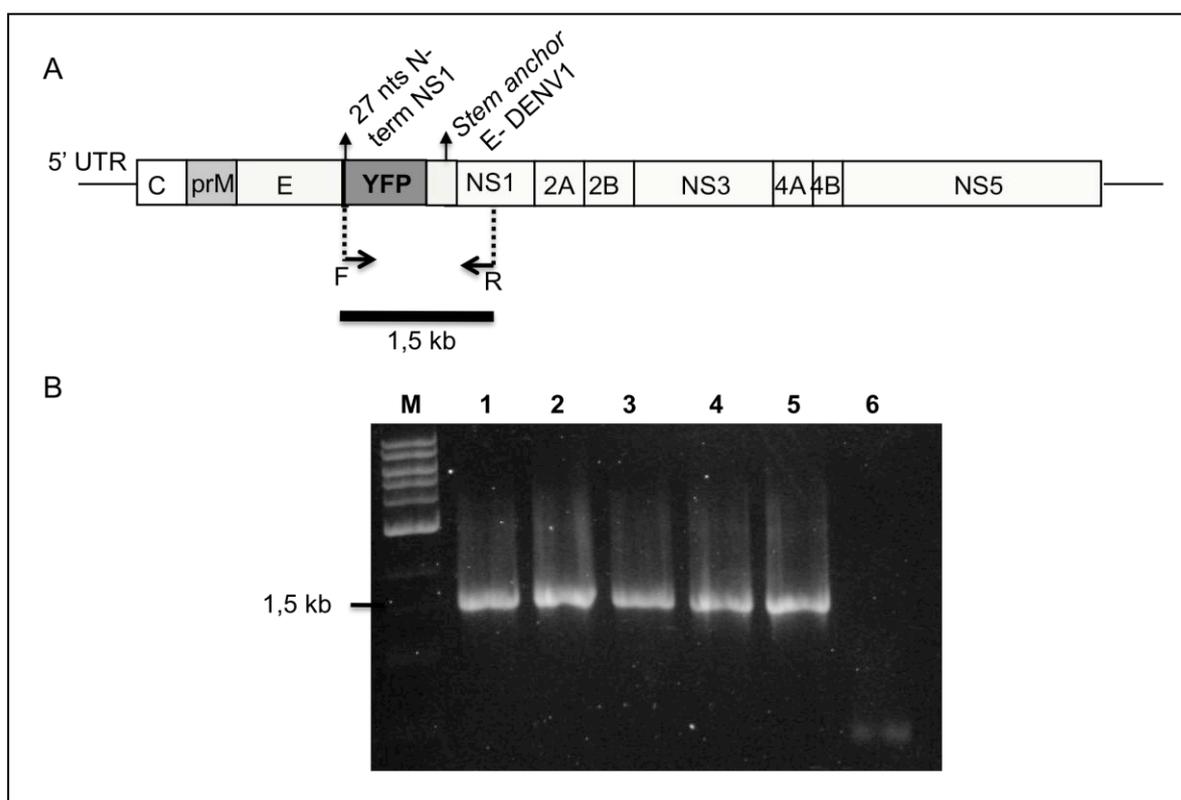


Figura 13. Confirmação da construção do vírus YFV-YFP-DENV1linker por recombinação homóloga em levedura.

Nota: (A) Representação esquemática da organização genômica do vírus YFV-YFP-DENV1linker, a localização dos primers (YFV-E-YFP-F e YFV-2912-R) utilizados para a confirmação da recombinação homóloga e a extensão do produto de PCR amplificado. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% de um produto de PCR de aproximadamente 1,5 kb contendo as sequências dos produtos de PCR recombinados com o vetor pBSC-YFV-17D. Os números indicam o clone RFY206 pBSC-YFV-17D-DENV1linker. M- marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder.

A escolha do par de *primers* (YFV-E-YFP-F e YFV-2912-R) para amplificar um produto de PCR contendo a sequência do primeiro produto de PCR (na ordem da posição no genoma viral) em sua extremidade 5', seguida por parte da sequência do vetor pBSC-YFV-17D assegurou uma maior confiabilidade na confirmação da recombinação homóloga e a orientação correta dos fragmentos.

Quatro clones recombinantes (1, 2, 3 e 4) foram selecionados para a caracterização *in vitro*. Para isso, a amplificação do genoma completo destes clones foi realizada, seguida por transcrição *in vitro* e eletroporação de células BHK21, como descrito na seção de Materiais e Métodos. Dos quatro clones, cujos RNA sintetizados *in vitro* foram usados para transfecção de células BHK21, apenas os clones 1 e 3 geraram partículas infecciosas.

Um dos vírus recuperados, clone 1, mostrou-se instável logo após a sua recuperação, evidenciado pela ausência de correlação positiva entre a expressão de gene repórter e efeito citopático nas células infectadas. A perda do repórter YFP foi confirmada pela amplificação de um produto de PCR com padrão de banda menor do que o esperado (dados não mostrados) e sequenciamento. Após três passagens em células BHK21, foi confirmada por sequenciamento a perda do gene repórter, além da sequência *stem-anchor* da proteína E-DENV1 inseridos por recombinação homóloga, com retenção de apenas seis dos nove aa de NS1 duplicados na porção N-terminal do YFP (Figura 14). O clone 3, no entanto, permaneceu expressando o gene repórter durante a terceira passagem e sugerindo maior estabilidade do que o clone 1.

A intenção de validar uma estratégia adequada para a construção de um vírus YFV-17D expressando sequências heterólogas longas motivou a caracterização *in vitro* do vírus YFV-YFP-DENV1linker clone 3 que se mostrou mais estável geneticamente (Figura 14).

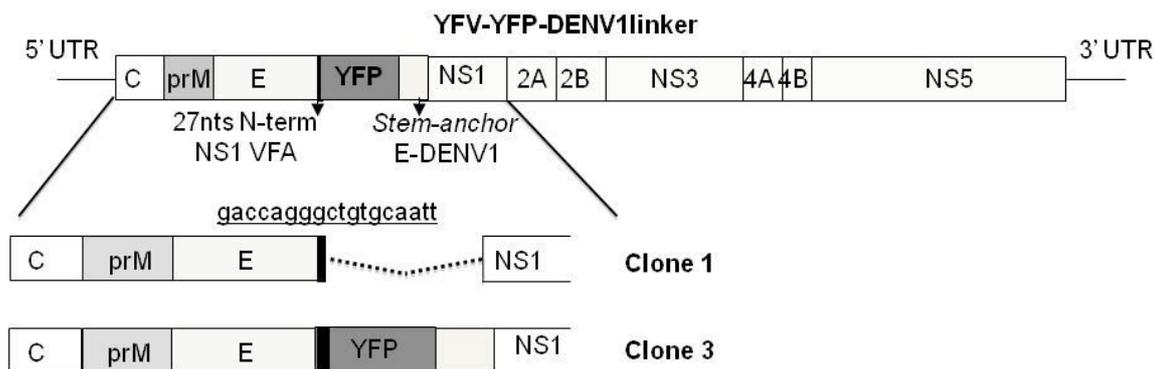


Figura 14. Representação esquemática do genoma do vírus YFV-YFP-DENV1linker: clones 1 e 3. Nota: A deleção de nt é representada por linhas tracejadas e a sequência de nt correspondentes aos seis aa preservados no clone 1 está sublinhada.

As ampliações de produtos de PCR com padrão de bandas esperado, contendo o gene YFP e a sequência *stem-anchor* E-DENV1, mostraram que o vírus YFV-YFP-DENV1linker clone 3 possuía o gene heterólogo e que esse não foi perdido durante as dez passagens em cultivo celular (Figura 15A).

A caracterização das placas formadas em cada uma das passagens em células BHK21 pelo clone 3 revelou uma progressão no tamanho das placas. Placas de tamanhos pequenos foram formadas em passagens baixas (p3 e p5), enquanto placas maiores foram observadas nas passagens posteriores. Placas de tamanho semelhante às placas formadas pelo YFV-17D foram observadas na 15ª passagem (Figura 15C).

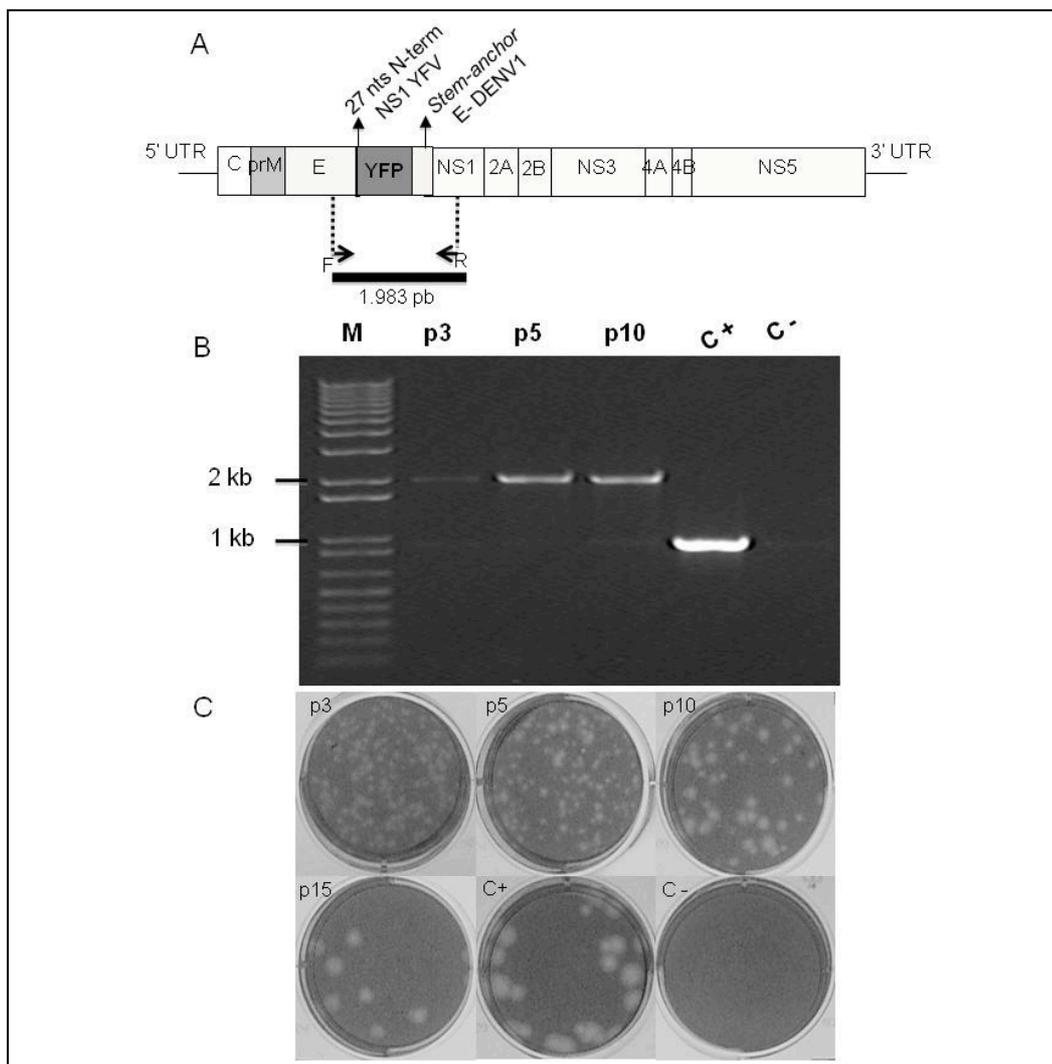


Figura 15. Avaliação da estabilidade do vírus YFV-YFP-DENV1linker clone 3.

Nota: (A) Representação esquemática da organização genômica do vírus YFV-YFP-DENV1linker e a localização dos *primers* (YFV-E-1974-F e YFV-2912-R) utilizados para a avaliação da estabilidade viral e a extensão do produto de PCR amplificado. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de PCR com padrão de banda esperado (1.983 pb) amplificado pelo par de *primers*: YFV-E-1974F e YFV-2912-R. (C) Morfologia de placas do vírus YFV-YFP-DENV1linker clone 3 de diferentes passagens em células BHK21.

Legenda: As passagens são indicadas pela letra p seguida pelo número correspondente de vezes que o sobrenadante de células infectadas foi coletado e re-inoculado em novas células BHK21 (p3, p5, p10, p15); C+: YFV-17D; C-: células BHK21 não infectadas.

A expressão do gene repórter YFP e proteínas virais do vírus recombinante YFV-YFP-DENV1linker clone 3 foram avaliadas durante 15 passagens em células BHK21 (Figura 16). O YFV-YFP-DENV1linker clone 3 mostrou-se estável durante 15 passagens com expressão constante de YFP. A replicação viral, evidenciada pela expressão das proteínas de YFV, foi proporcional à expressão do gene YFP até a 15ª passagem.

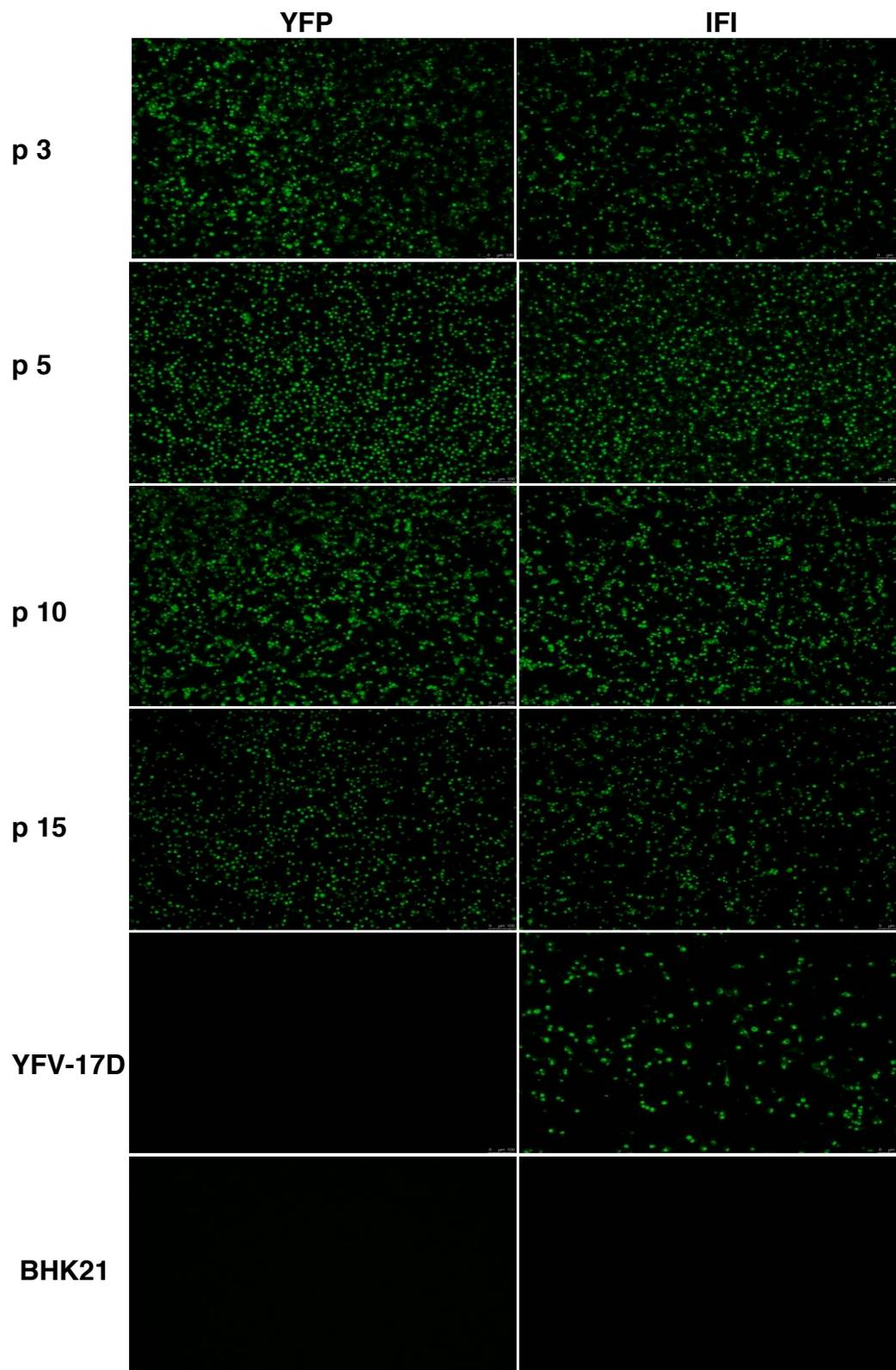


Figura 16. Replicação do vírus YFV-YFP-DENV1linker clone 3. Fluorescência do gene repórter (YFP) e imunofluorescência indireta (IFI) em células BHK21 infectadas pelo vírus YFV-YFP-DENV1linker clone 3 em diferentes passagens.

Nota: Ensaio de imunofluorescência indireta realizada com os anticorpos primários de fluido ascítico hiperimune anti-*Flavivirus* grupo B e anticorpos secundários anti-camundongo IgG conjugados com FITC (Ver Materiais e Métodos). As passagens são indicadas pela letra p seguida pelo número correspondente. Imagens coletadas da mesma lâmina processada para leitura de YFP e posteriormente para IFI. Aumento 100x.

As taxas de replicação do YFV-YFP-DENV1linker clone 3 foram monitoradas e quantificadas por ensaios de placas, como descrito em Materiais e Métodos. A Figura 17 mostra o comportamento deste vírus durante o período de cinco dias, em duas passagens diferentes: três e 15. Essas passagens foram selecionadas por corresponder a uma baixa e alta passagem do vírus, respectivamente, e desta forma representar com maior fidelidade a estabilização da capacidade replicativa ao longo de passagens sucessivas em células de cultivo.

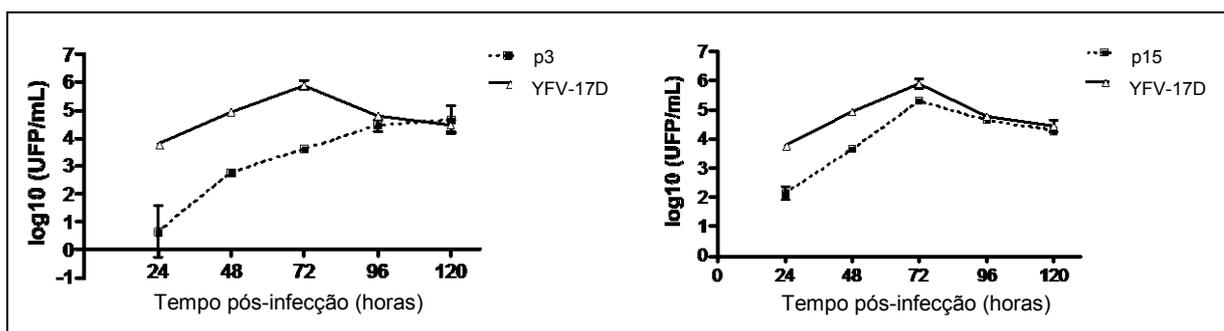


Figura 17. Curvas de replicação do vírus YFV-YFP-DENV1linker clone 3.

Nota: Células BHK21 foram infectadas com 0,02 MOI. Nos tempos indicados, alíquotas do meio de cultura foram coletadas e o título viral foi determinado por ensaio de placa como descrito em Materiais e Métodos. O desvio padrão foi obtido pela média de duas repetições.

Uma replicação lenta do vírus YFV-YFP-DENV1linker clone 3 foi observado na passagem 3, com produção de um número relativamente pequeno de partículas infecciosas após 24 h de infecção ($0,7 \log_{10}$ UFP/mL). Após quatro dias de infecção, o YFV-YFP-DENV1linker clone 3 alcançou títulos ($4,4 \log_{10}$ UFP/mL) semelhantes aos do YFV-17D ($4,8 \log_{10}$ UFP/mL). No entanto, neste último foi observado um efeito citopático acentuado que correspondeu à queda dos títulos após 96 horas de infecção.

Após 15 passagens em cultivo celular, o YFV-YFP-DENV1linker clone 3 revelou um comportamento semelhante ao observado no vírus YFV-17D, em termos de taxas de replicação. O YFV-YFP-DENV1linker clone 3 produziu um pico de $5,3 \log_{10}$ UFP/mL após 72 h da inoculação, enquanto o YFV-17D produziu $5,9 \log_{10}$ UFP/mL no mesmo intervalo de tempo. Após esse momento, foi observado declínio dos títulos virais de ambos os vírus e efeito citopático acentuado.

A investigação da estabilização do vírus YFV-YFP-DENV1linker clone 3 (p 15) em nível genético levou à identificação de algumas mutações ao longo do genoma viral (Quadro 5).

Posição ^a	Gene	Mutação	
		Sequência	Mudança de Aminoácido
2679	YFP	T para C	F65L
5186	NS2a	C para T	Não (silenciosa)
6977	NS3	C para G	Não (silenciosa)
9514	NS5	G para A	E279K

Quadro 5. Diferenças entre as sequências do plasmídeo pBSC-YFV-17D-YFP-DENV1linker e do vírus YFV-17D-YFP-DENV1linker clone 3.

Legenda: ^a Numerada de acordo com a posição do nucleotídeo no genoma viral.

As quatro mutações identificadas, exceto a mutação F65L (fenilalanina para leucina) no gene YFP, estavam localizadas em proteínas não-estruturais. Destas, a maioria constitui mutação silenciosa (posições 5186 e 6977) localizadas nas regiões codificantes das proteínas NS2A e NS3. A mutação identificada na proteína NS5 E279K (glutamato para lisina) foi a que despertou maior atenção, devido à importância dessa proteína na replicação viral. O número limitado de alterações em nível de nt e os tipos de mutações (maioria silenciosa e dentro de proteínas não-estruturais) indicam a estabilidade genética do YFV-YFP-DENV1linker clone 3.

6.1.3 Construção e caracterização do vetor YFV-YFP-SSE

A recombinação homóloga em leveduras para construção do vetor YFV-YFP-SSE foi realizada com sucesso entre o vetor pBSC-YFV17D linearizado e dois fragmentos de PCR (792 pb e 586 pb, respectivamente). Uma eficiência de recombinação satisfatória foi revelada pela confirmação de todos os 5 clones da construção YFV-YFP-SSE testados (Figura 18).

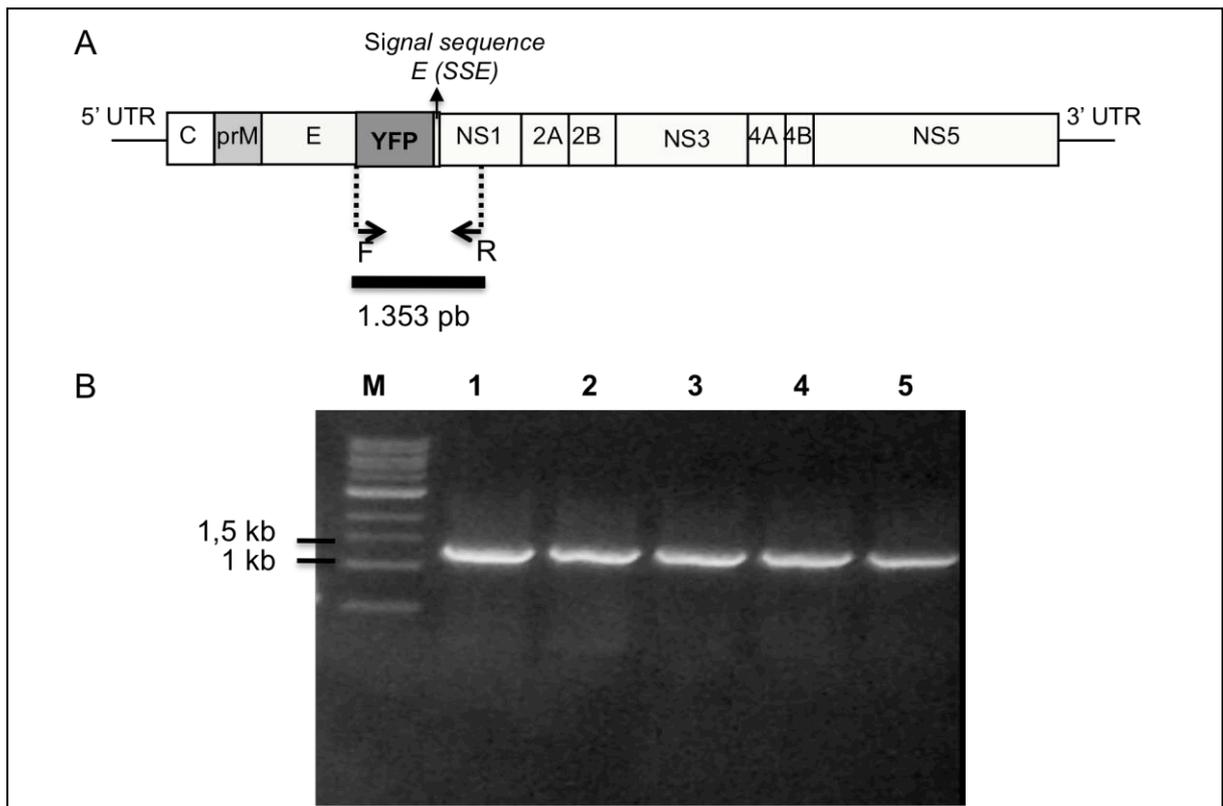


Figura 18. Confirmação da construção do vírus YFV-YFP-SSE por recombinação homóloga em levedura.

Nota: (A) Representação esquemática da organização genômica do vírus YFV-YFP-SSE e a localização dos *primers* (EYFV-YFP-F e YFV-2980-R) utilizados para a confirmação da recombinação homóloga e a extensão do produto de PCR amplificado. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% de um produto de PCR de aproximadamente 1.353 pb contendo o gene repórter YFP e a sequência sinal do envelope (SSE).

Legenda: Os números indicam os clones de pBSC-YFV-17D-SSE (1 e 2); M- marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder.

Quatro clones foram selecionados para transcrição *in vitro* e eletroporação de células BHK21. Destes, apenas dois (1 e 2) geraram partículas infecciosas após a transfecção de células BHK21 com os transcritos *in vitro* de cada clone. Um dos clones (clone 2) mostrou-se instável após quatro passagens em cultivo celular. Os produtos de PCR possuíam peso molecular menor do que o padrão esperado para o gene repórter e o segmento SSE (dados não mostrados). Análises de sequenciamento revelaram perda total do gene repórter e da maioria da sequência SSE, com retenção de apenas 19 nt C-terminais (Figura 19).

O segundo clone (clone 1) apresentou-se aparentemente estável até a 5ª passagem, com expressão de gene repórter e amplificação de um produto de PCR contendo o gene YFP e SSE. Sendo assim, a caracterização do YFV-YFP-SSE prosseguiu com apenas este clone.

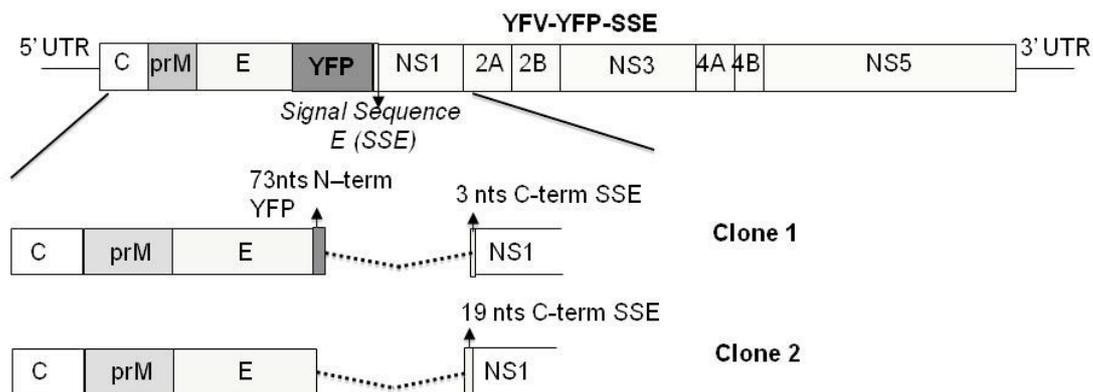


Figura 19. Representação esquemática do genoma dos vírus YFV-YFP-SSE clones 1 e 2. Nota: A deleção de nt é representada por linhas tracejadas e a sequência de nt de SSE preservada nos clones está sublinhada. O número indica a posição do nucleotídeo a partir do qual iniciam as mutações (deleções/substituições).

As amplificações de produtos de PCR com padrão de bandas esperado para o gene repórter YFP e a sequência sinal de E estão apresentadas na Figura 20. O padrão de banda esperado de 1.731 pb foi observado até a passagem 9. Em passagens consecutivas, foram visualizadas bandas correspondentes a outros padrões de peso molecular, indicando a instabilidade viral com deleção do fragmento inserido, e conseqüentemente, geração de amplicons de diferentes extensões (Figura 20 B).

A caracterização das placas virais formadas revelou um padrão diversificado em cada uma das passagens (Figura 20 C). Placas pequenas foram observadas nas 3^a e 9^a passagens, porém, na 10^a passagem foi observada a formação de placas de diferentes tamanhos indicando a presença de uma população viral mista. Essa suspeita foi confirmada pela heterogeneidade de amplicons produzidos nas reações de RT-PCR (Figura 20 B). Por fim, as placas formadas na 15^a passagem apresentavam aspecto semelhante àquelas formadas pelo YFV-17D. A homogeneidade das placas virais observada nessa passagem viral (Figura 20 C) indica a estabilização do YFV-YFP-SSE pela deleção de grande parte do fragmento inserido e, conseqüentemente, melhor replicação em células BHK21.

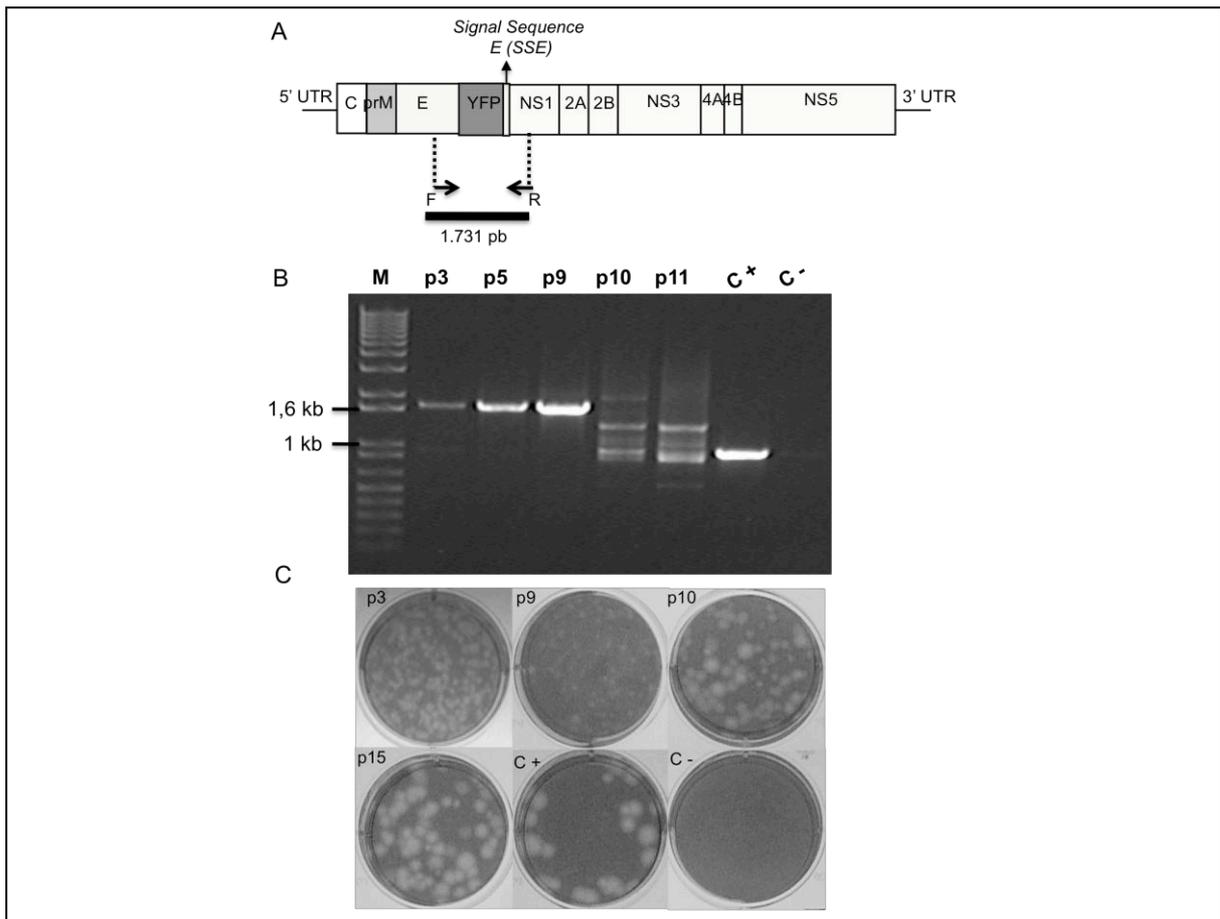


Figura 20. Avaliação da estabilidade do vírus YFV-YFP-SSE clone 1.

Nota: (A) Representação esquemática da organização genômica do vírus YFV-YFP-SSE, a localização dos *primers* (YFV-E-1974-F e YFV-2912-R) utilizados para a avaliação da estabilidade viral e a extensão do produto de PCR amplificado. (B) Produtos de PCR amplificados pelo par de *primers*: YFV-1974F e YFV-2912R; (C) Morfologia de placas do vírus YFV-YFP-SSE clone 1 em diferentes passagens em células BHK21.

Legenda: As passagens são indicadas pela letra p seguida pelo número correspondente de vezes que o sobrenadante de células infectadas foi coletado e re-inoculado em novas células BHK21 (p3, p9, p10, p15); C+: YFV-17D; C-: células BHK21 não infectadas.

A expressão do gene repórter YFP e proteínas virais pelo vírus YFV-YFP-SSE clone 1 foram avaliadas durante 15 passagens em células BHK21 (Figura 21). Em passagens baixas, 3^a e 5^a, o gene repórter foi expresso, entretanto, uma intensidade maior de expressão foi observada nas passagens nove e 10. Uma correlação positiva entre a expressão de YFP e proteínas de YFV foi observada até a 9^a passagem. A partir da 10^a passagem, um número cada vez menor de células permaneceu expressando o gene repórter quando comparado ao número de células que expressavam proteínas de YFV. Esses resultados confirmam a instabilidade do vírus YFV-YFP-SSE clone 1 e sugerem que esse processo teve início na 9^a passagem.

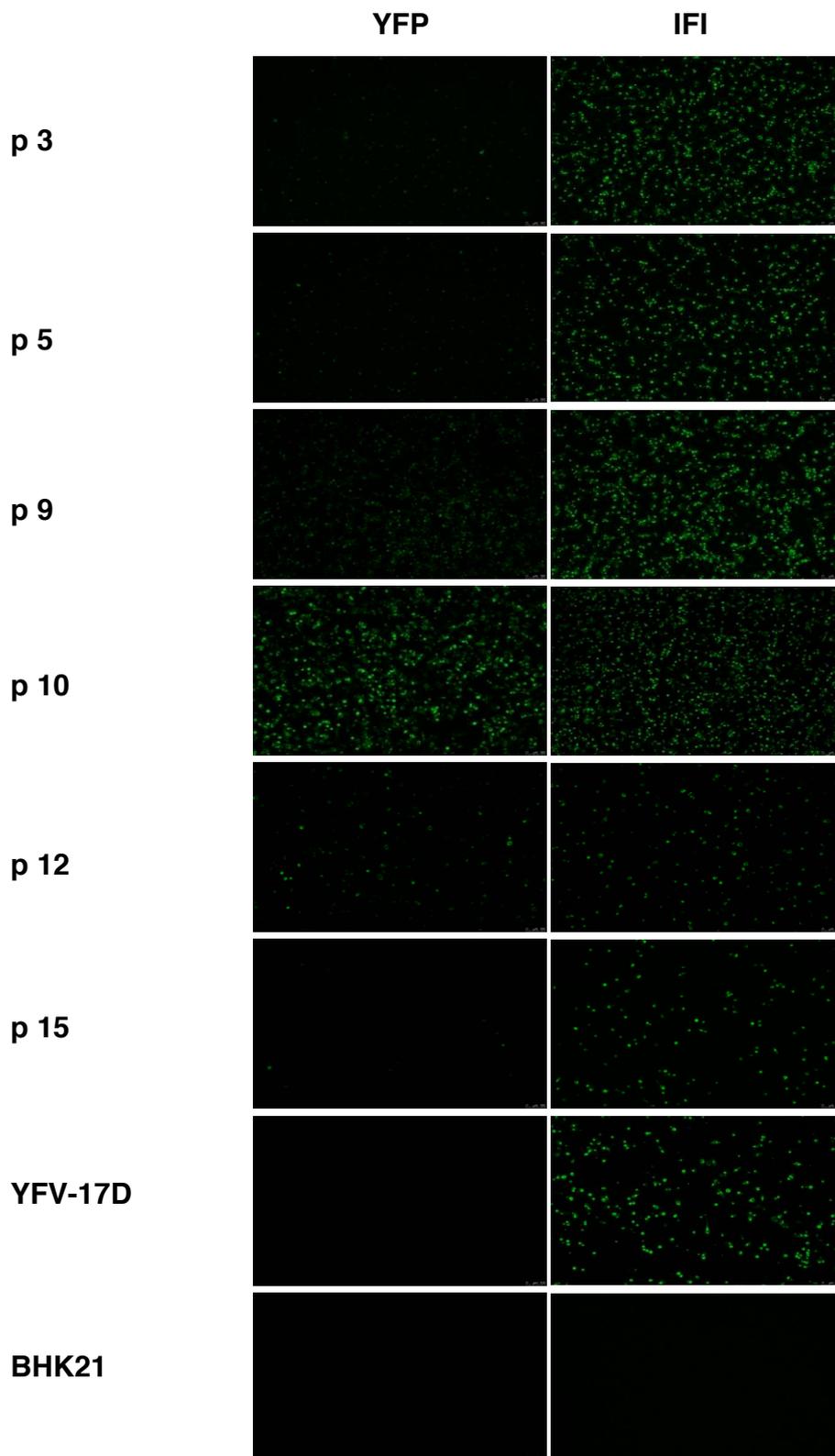


Figura 21. Replicação do vírus YFV-YFP-SSE clone 1. Fluorescência do gene repórter (YFP) e imunofluorescência indireta (IFI) em células BHK21 infectadas pelo vírus YFV-YFP-SSE clone 1 em diferentes passagens.

Nota: Ensaio de imunofluorescência indireta realizada com os anticorpos primários de fluido ascítico hiperimune anti-*Flavivirus* grupo B e anticorpos secundários anti-camundongo IgG conjugados com FITC (Ver Materiais e Métodos). As passagens são indicadas pela letra p seguida pelo número correspondente. Imagens coletadas da mesma lâmina processada para leitura de YFP e posteriormente para IFI. Aumento 100x.

As curvas de replicação do vírus YFV-YFP-SSE clone 1 foram avaliadas por um período de cinco dias e quantificadas por ensaios de placas, como descrito em Materiais e Métodos. A Figura 22 mostra o comportamento deste vírus durante duas diferentes passagens (três e 15). As curvas de replicação revelaram que, em passagem baixa, o vírus YFV-YFP-SSE clone 1 multiplicou-se lentamente e produziu um título de $5,3 \log_{10}$ UFP/mL com 96 h de infecção, próximo ao que o vírus YFV-17D produziu ($4,9 \log_{10}$ UFP/mL) em 48 h. Um pico máximo de infecção foi alcançado após 96 h de infecção com $5,2 \log_{10}$ UFP/mL. Porém, na passagem quinze, esse vírus apresentou uma replicação semelhante ao YFV-17D cujo pico máximo foi observado com 72 h de infecção com títulos de $5,3 \log_{10}$ UFP/mL e $5,9 \log_{10}$ UFP/mL para o YFV-YFP-SSE e YFV-17D, respectivamente.

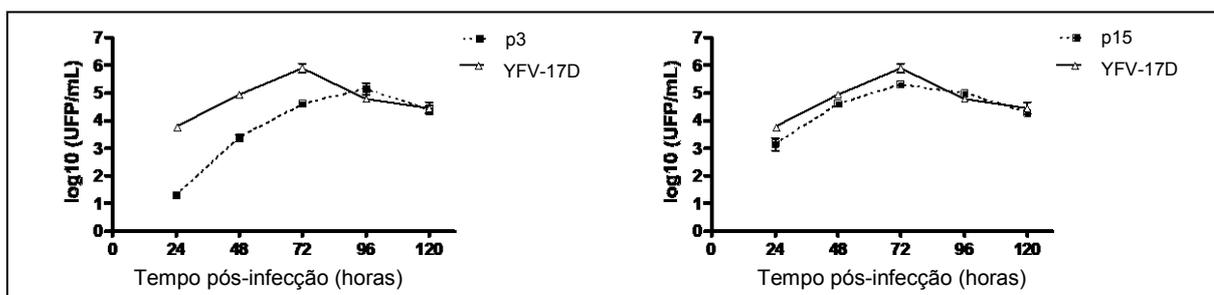


Figura 22. Curvas de replicação do vírus YFV-YFP-SSE clone 1.

Nota: Células BHK21 foram infectadas com 0,02 MOI em duas diferentes passagens, passagem três (p3) e passagem 15 (p15). Nos tempos indicados alíquotas do meio de cultura foram coletadas e o título viral foi determinado por ensaio de placa como descrito em Materiais e Métodos. O desvio padrão foi obtido da média de duas repetições.

6.2 Construção dos replicons subgenômicos do YFV

6.2.1 Construção e caracterização do replicon monocistrônico repYF-17D-Luc

O vetor pBSC-repYF-17D apresenta um sítio único de restrição para a enzima *NarI*, que foi utilizado para a sua linearização. O gene repórter Luc amplificado por PCR e o vetor pBSC-repYF-17D linearizado foram utilizados para transfectar leveduras e, por recombinação homóloga, geraram o pBSC-repYF-17D-Luc. A confirmação da recombinação foi revelada por amplificação de produto de PCR com

padrão de banda esperado de 2,3 kb, contendo o gene repórter Luc em todos os quatro clones RFY206 selecionados (Figura 23).

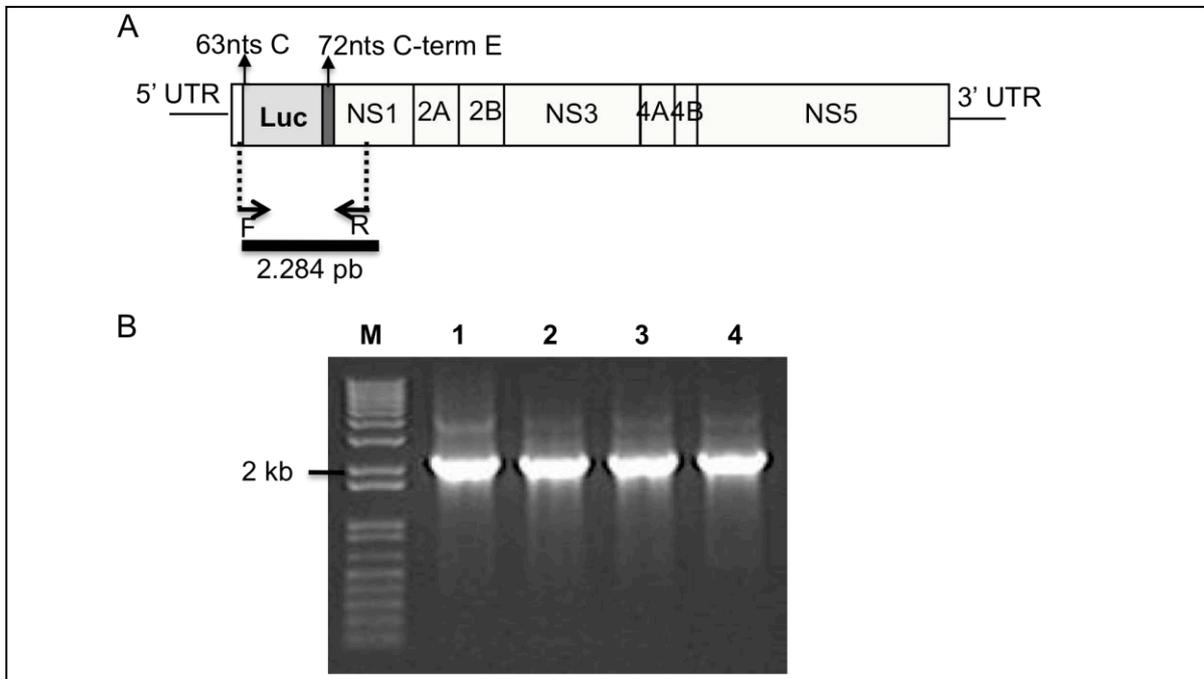


Figura 23. Confirmação da construção do replicon repYF-17D-Luc por recombinação homóloga em levedura.

Nota: (A) Representação esquemática da organização genômica do replicon repYF-17D-Luc, a localização dos *primers* (repYFV-Luc-F e YFV-2980-R) utilizados para a confirmação da recombinação homóloga e a extensão do produto de PCR amplificado. Amplificação de um produto de PCR de aproximadamente 2,3 kb contendo o gene repórter.

Legenda: Os números indicam os clones da construção pBSC-repYF-17D-Luc (1, 2, 3 e 4); M-marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder.

Células BHK21 transfectadas com RNA sintetizado *in vitro* do replicon repYF-17D-Luc (clone 2) foram avaliadas 48 h pós-eletroporação quanto à expressão de luciferase e proteínas virais. Ensaio de imunofluorescência revelaram que o repYF-17D-Luc é funcional, apresentando capacidade de replicação autônoma (Figura 24 A). O ensaio de atividade da luciferase em células BHK21 transfectadas com o RNA transcrito *in vitro* do replicon repYFP-17-Luc clone 2, demonstrou um pico de expressão do gene luciferase 48 h pós-eletroporação, e uma diminuição acentuada após seis dias de eletroporação (Figura 24 B).

A expressão do gene repórter Luc indicou replicação eficiente do replicon, além da transcrição e processamento adequados do gene heterólogo inserido no replicon. Esses resultados juntos confirmam a viabilidade do replicon monocistrônico repYF-17D-Luc.

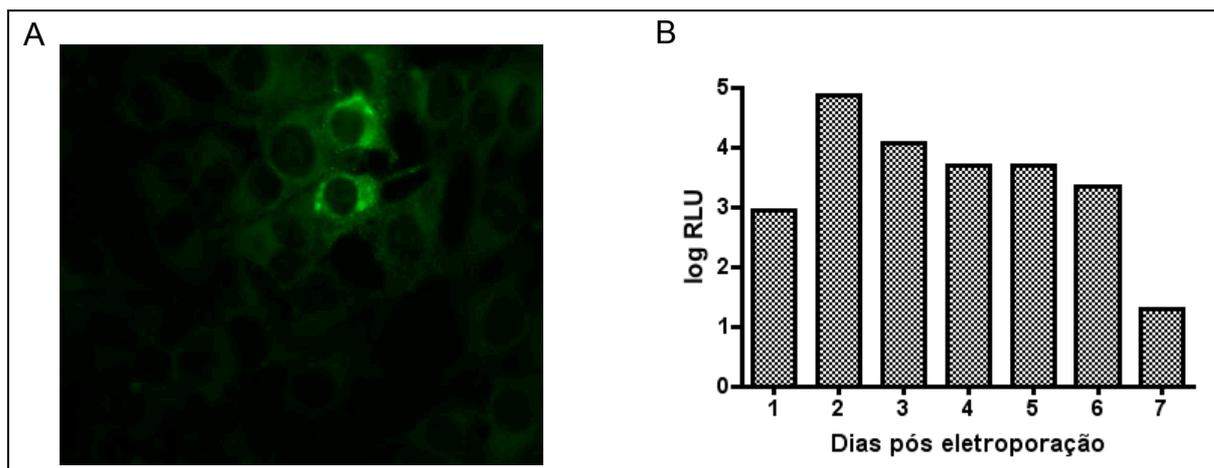


Figura 24. Replicação do replicon subgenômico repYF-17D-Luc em células BHK21

Nota: (A) Ensaio de imunofluorescência indireta em células BHK21 transfectadas com RNA sintetizado *in vitro*, realizado 48 h pós-eletroporação com os anticorpos primários de fluido ascítico hiperimune anti-*Flavivirus* grupo B e anticorpos secundários anti-camundongo IgG conjugados com FITC (Ver Materiais e Métodos). Aumento de 400X. (B) Atividade luciferase detectada em extratos de células BHK21 eletroporadas com RNA sintetizado *in vitro* em intervalos de 24 horas durante sete dias. Dados apresentados em *Raw Luciferase Units* (RLU).

6.2.2 Construção e caracterização do replicon bicistrônico repYF-17D-LucIRES

A construção do replicon bicistrônico repYF-17D-LucIRES foi realizada com sucesso pela técnica de recombinação homóloga em levedura *Saccharomyces cerevisiae* com a seleção de um clone recombinante confirmado por PCR. Após a extração do DNA plasmideal de levedura foram realizadas duas reações de PCR por clone: uma PCR para amplificação da primeira metade do inserto (*primers*: pBSC-*RsrII*-T7-5'YFV-F e REP-YFV-LUC-R) e outro para a segunda metade (*primers*: Luc EMCV-F e YFV-2980-R) correspondendo a produtos de 2800 pb e 1685 pb, respectivamente (dados não mostrados).

A replicação e viabilidade do replicon repYF-17D-LucIRES clone 6 foram avaliados pela detecção da expressão de proteínas virais por ensaio de imunofluorescência indireta e pela mensuração da atividade do gene repórter luciferase em células eletroporadas com o RNA transcrito *in vitro* (Figura 25). Os resultados desses ensaios confirmaram a eficiente replicação do replicon bicistrônico repYF-17D-LucIRES clone 6 em células BHK21.

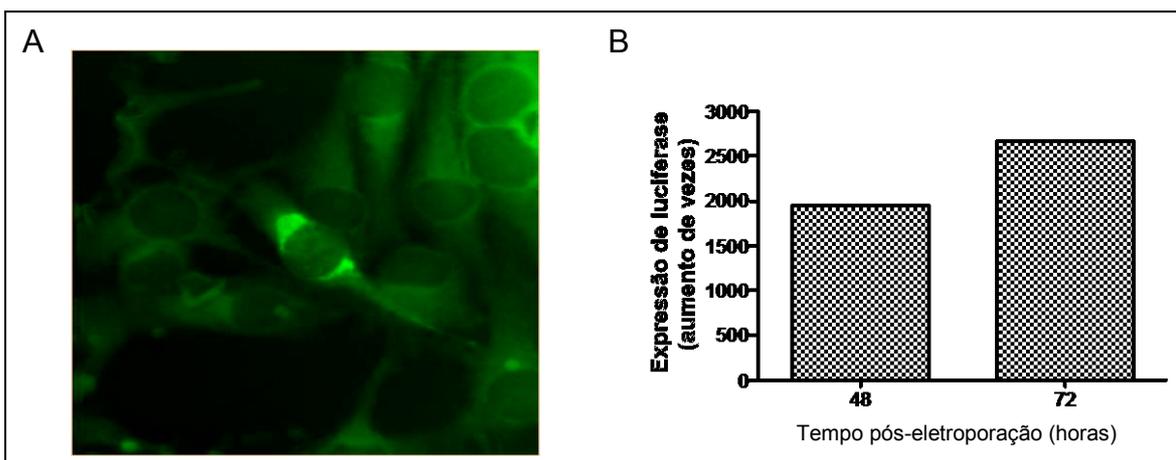


Figura 25. Replicação do replicon subgenômico repYF-17D-LucIRES clone 6 em células BHK21.

Nota: (A) Detecção da expressão de proteínas virais em células BHK21 transfetadas com o RNA transcrito *in vitro*, realizado pela técnica de imunofluorescência indireta 48 h após eletroporação com anticorpos primários de fluido ascítico hiperimune anti-*Flavivirus* grupo B e anticorpos secundários anti-camundongo IgG conjugados com FITC (Ver Materiais e Métodos). Aumento 630X. (B) Atividade do gene repórter luciferase em extratos de células BHK21 eletroporadas com RNA *in vitro* do replicon repYF-17D-LucIRES clone a 48 h e 72 h pós-eletroporação. A atividade luciferase é apresentada em número de aumento de vezes na expressão de Luc em relação ao controle negativo (células BHK21 não eletroporadas).

6.3 Desenvolvimento da linhagem celular HEK293-YFV-prM/E-opt

Para o empacotamento dos replicons subgenômicos do YFV em PPIs, foi desenvolvida uma linhagem celular expressando as proteínas prM e E do YFV. A clonagem destas proteínas, otimizadas para expressão em células eucariotas, foi realizada em vetor comercial pCDNA3.1 (+) como descrito em Materiais e Métodos.

As células HEK293 transfetadas com o plasmídeo pCDNA-YFV-prM/E-opt foram selecionadas pela adição da droga Geneticin® no meio de cultura e monitoradas para expressão das proteínas estruturais do YFV (dados não mostrados). Foi observado que 50-70% das células expressavam proteínas do YFV após seleção por Geneticin®. Devido a essa heterogeneidade, ensaios de diluição limitante foram realizados na tentativa de se obter uma população mais homogênea de expressão protéica recombinante e em taxas elevadas. Três clones (3, 16 e 17) com melhor expressão dessas proteínas foram selecionados e, subsequentemente, caracterizados. A Figura 26 mostra a expressão de proteínas do YFV identificada por imunofluorescência positiva na linhagem HEK293-YFV-prM/E-opt desenvolvida.

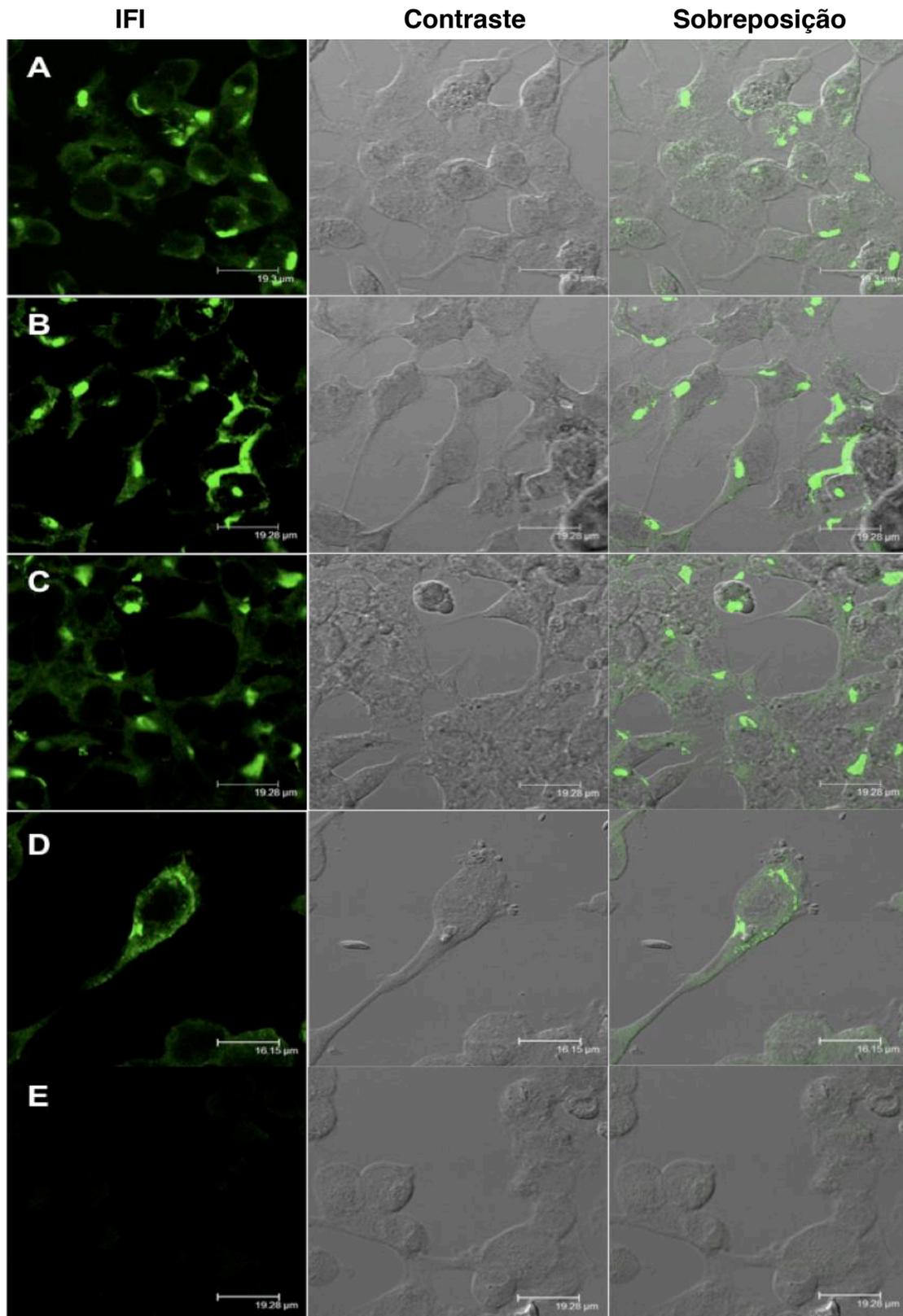


Figura 26. Expressão de proteínas estruturais prM e E do YFV pela linhagem celular HEK293-YFV-prM/E-opt.

Nota: Imunofluorescência indireta.

Legenda: A- células HEK293-YFV-prM/E-opt clone 3; B- células HEK293-YFV-prM/E-opt clone 16; C- células HEK293-YFV-prM/E-opt clone 17; D- células HEK293 infectadas com YFV-17D; E- células HEK293 não infectadas. Aumento 630X.

Todos os três clones selecionados (3, 16 e 17) mostraram-se expressando proteínas do YFV na maioria das células, com taxas de multiplicação mais lentas em relação às células HEK293 (Figura 27). A proteína E do YFV foi detectada por *western blotting*, no lisado celular e sobrenadante de células HEK293-YFV-prM/E-opt, indicando produção e liberação de RSPs por esta linhagem celular (Figura 27 B). A análise por citometria de fluxo da linhagem celular HEK293-YFV-prM/E-opt revelou 59% a 90% de células positivas para expressão de proteína E do YFV nos três clones analisados (Figura 27 C) e confirmou o maior número de células positivas para a expressão da proteína E no clone 16.

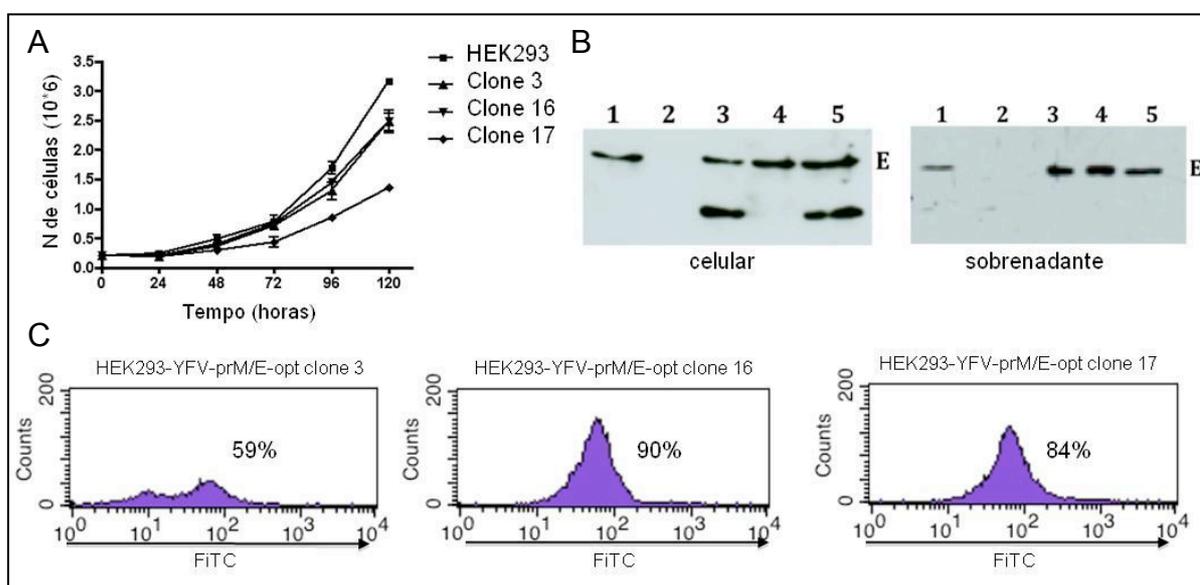


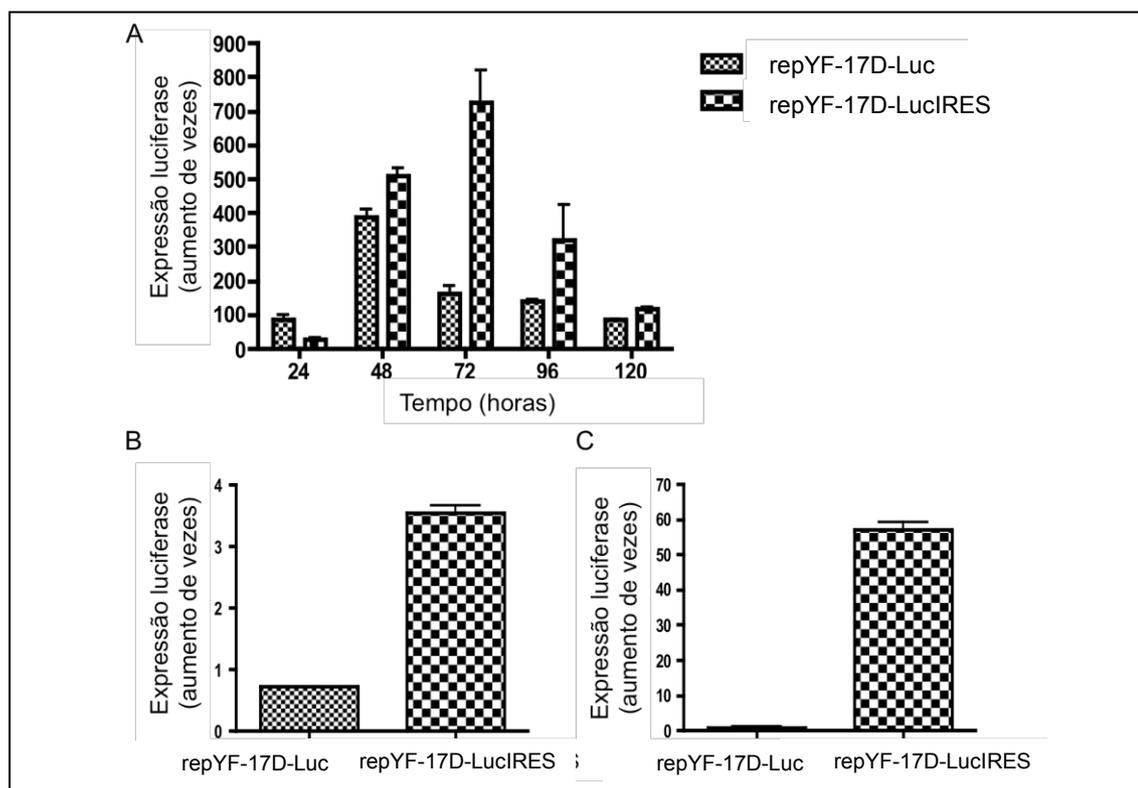
Figura 27. Caracterização da linhagem celular HEK293-YFV-prM/E-opt.

Nota: (A) Curva de replicação dos três clones (3, 16 e 17) da linhagem HEK293-YFV-prM/E-opt. (B) Detecção de proteínas específicas de YFV-17D em extratos celular e de sobrenadante de células da linhagem HEK293-YFV-prM/E-opt. (C) Citometria de fluxo das células HEK293-YFV-prM/E-opt clones 3, 16 e 17 com anticorpos específicos para proteínas do YFV.

Legenda: 1- células HEK293 infectadas com YFV-17D; 2- células HEK293 não infectadas; 3- células da linhagem HEK293-YFV-prM/E-opt clone 3; 4- clone 16; 5- clone 17.

A Figura 28 A demonstra a replicação destes replicons na linhagem HEK293-YFV-prM/E-opt clone 16 revelada pelas taxas de expressão da atividade luciferase. Um aumento de aproximadamente 390 vezes na expressão de Luc após 48 h da transfecção em relação ao controle negativo, correspondendo ao pico máximo de expressão do gene repórter pelo replicon repYF-17D-Luc. Por outro lado, a expressão máxima de atividade luciferase detectada pela replicação do replicon bicistrônico repYF-17D-LucIRES foi de 724 vezes em relação a atividade basal após 72 h da eletroporação.

Na tentativa de recuperar PPIs, sobrenadantes das células eletroporadas com os respectivos replicons foram inoculadas em células HEK293 (não transformadas) e posteriormente avaliadas para expressão de atividade do gene repórter luciferase e proteínas não-estruturais do YFV. A atividade luciferase foi detectada em lisado de células inoculadas com sobrenadante da eletroporação com o replicon bicistrônico repYF-17D-LucIRES (Figura 28 B), o que indicou que apenas esse replicon foi empacotado em PPIs. A falha no trans-empacotamento do replicon repYF-17D-Luc já era esperada e por isso foi utilizado como controle negativo. Este replicon não possui a proteína do capsídeo que é essencial para o trans-empacotamento (JONES; PATKAR; KUHN, 2005; KHRAMYKH; VARNAVSKI; WESTAWAY, 1998.). O replicon repYF-17D-LucIRES, no entanto, possui a proteína C e por isso foi trans-empacotado pelo fornecimento de proteínas prM e E pela linhagem HEK293-YFV-prM/E-opt.



7 DISCUSSÃO

O presente trabalho descreve a construção e caracterização dos YFV recombinantes YFV-YFP-DENV1linker e YFV-YFP-SSE que expressam o gene repórter YFP, baseados nas estratégias de Bonaldo et al. (2007) e Bredenbeek et al. (2006), respectivamente.

A inserção de genes repórter é amplamente utilizada em manipulações genéticas de *Flavivirus* (JONES; PATKAR; KUHN, 2005; PIERSON et al., 2005; SHUSTOV; MASON; FROLOV, 2007) e foi empregada nas presentes construções para otimizar a sua caracterização e avaliação.

Genes repórter constituem uma alternativa rápida e fácil para avaliar a replicação do genoma viral. Uma das vantagens do uso de genes repórter é a correlação direta da expressão do gene repórter com a viabilidade e replicação viral (FAYZULIN et al., 2006; KHROMYKH, 2000; KHROMYKH and WESTAWAY, 1997; PIERSON et al., 2005; ROSSI et al., 2005; SCHOLLE et al., 2004; SHI et al., 2002; SHUSTOV; MASON; FROLOV, 2007) além da facilidade de serem substituídos posteriormente por outros genes de interesse. Assim, genes repórter constituem uma ferramenta valiosa para validação de estratégias de manipulação genética de vetores vacinais competentes. Para isso, dois sítios de restrição para a enzima *NarI* foram inseridos nas duas extremidades do gene repórter YFP, com o intuito de posteriormente substituir este gene por outros genes de interesse.

A estratégia de inserção de sequência heteróloga na junção E/NS1 proposta por Bonaldo et al. (2007) levou em consideração a presença de regiões funcionais para o processamento da poliproteína, além da conservação de aa que flanqueiam essa junção. Esta manipulação genética visa um processamento adequado, tanto das proteínas virais quanto das exógenas, resultando em uma melhor eficiência da viabilidade dos vírus clonados após inserção de sequências longas de nt exógenos.

Para avaliação dessa estratégia foi construído um vírus quimérico YFV-YFP-DENV1linker com inserção do gene repórter YFP entre os genes das proteínas E e NS1 por duplicação de nove aa de NS1 do YFV na porção N-terminal do gene YFP e o domínio *stem-anchor* do DENV1 na sua porção C-terminal (DENV1linker).

O domínio *stem-anchor*, reponsável pela acomodação da proteína E na membrana do RE, é constituído por quatro estruturas bem definidas: duas hélices (H1 e H2) e duas regiões transmembranas (TM1 e TM2) (Figura 29). A sua

duplicação visa uma inserção mais adequada do gene heterólogo na junção dos genes E/NS1 sem alteração da estrutura tridimensional da proteína E. A duplicação dos nove aa de NS1 visa o correto processamento do gene heterólogo por proteases celulares.

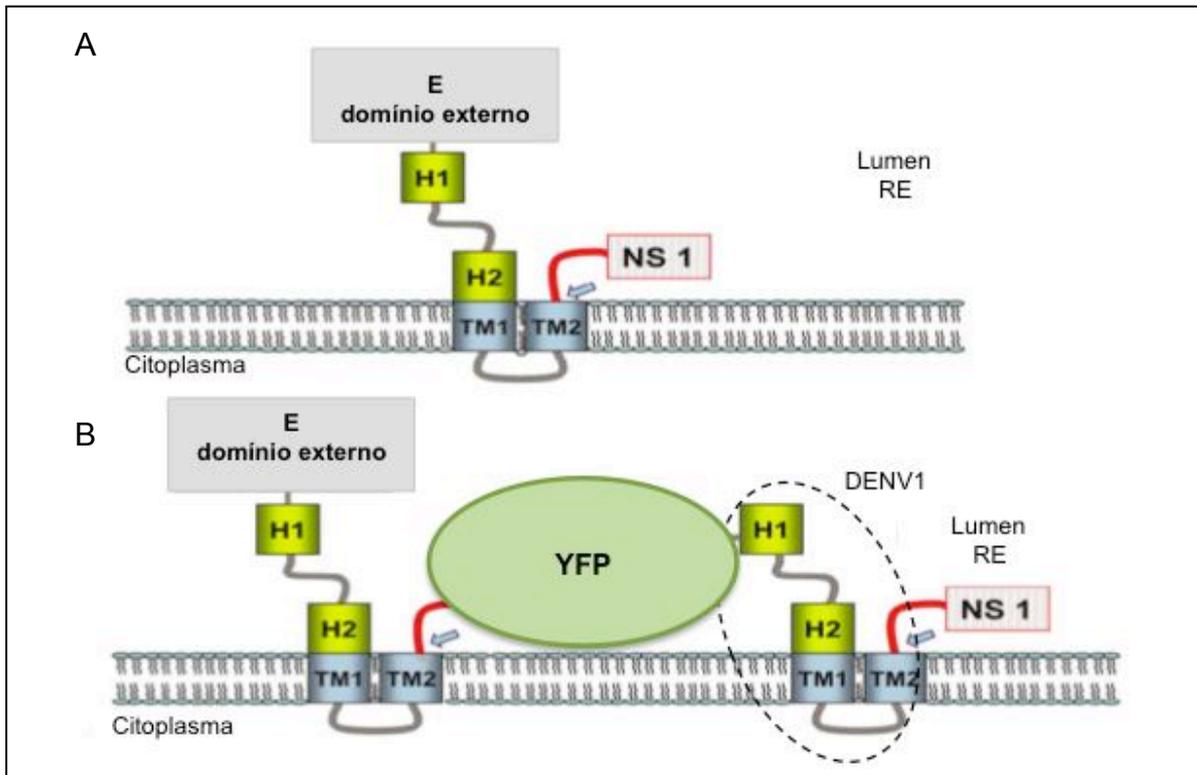


Figura 29. Diagrama esquemático da organização das proteínas E e NS1 na membrana celular.

Fonte: Adaptado de Bonaldo et al. (2007).

Nota: A) Representação de parte da poliproteína (E-NS1) do YFV, sua inserção na membrana citoplasmática do retículo endoplasmático (RE), o sítio de clivagem proteolítica por proteases celulares (seta azul) e a região *stem-anchor* da proteína E com seus diferentes elementos (H1 e H2; TM1 e TM2); B) Representação da mesma região com inserção do gene repórter *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) fusionado em sua extremidade N-terminal com nove aa da proteína NS1 do YFV-17D, e a sequência *stem-anchor* do vírus da dengue tipo 1 (DENV1) em sua extremidade C-terminal. As setas azuis indicam os sítios de clivagem proteolítica por proteases celulares.

O vírus quimérico denominado YFV-YFP-DENV1linker, construído pela técnica de recombinação homóloga em levedura, apresentou a mesma organização genética proposta por Bonaldo e colaboradores (2007) (Figura 8). Os códons dos nove primeiros aa da NS1 duplicados na porção N-terminal do gene repórter YFP foram manipulados manualmente para minimizar o risco de recombinação homóloga.

Estudos anteriores relatam que homologias de 20 a 30 nt são suficientes para recrutar a maquinaria de recombinação em células eucariotas (GIBSON, 2009;

GIBSON et al., 2008b; MANIVASAKAM et al., 1995). Nesse sentido, é possível que a perda do gene repórter durante sucessivas passagens em cultivo celular identificada na construção de recombinantes com duplicação de sequências gênicas deva-se principalmente à recombinação homóloga entre as sequências duplicadas.

A homologia de 68% entre as duas regiões *stem-anchor* do gene E (YFV e DENV1) foram suficientes para garantir a estabilidade observada após 15 passagens em cultivo celular. Acredita-se que homologias inferiores a 58% possam assegurar maior estabilidade ao genoma viral, como sugerido por BONALDO et al. (2007), no entanto, homologias superiores podem conferir estabilidade ao genoma viral semelhante ao observado com 58% de homologia entre essas duas regiões.

Os YFV recombinantes contendo inserções genéticas devem ser estáveis geneticamente para o desenvolvimento de vacinas vivas atenuadas serem utilizados no desenvolvimento de novas vacinas virais atenuadas. Desta forma, a estabilidade genética do vírus YFV-YFP-DENV1linker foi avaliada por passagens sucessivas em cultivo celular. Células BHK21 foram infectadas com 0,02 MOI para induzir taxas replicativas elevadas do genoma viral permitindo a ocorrência de processos de recombinação homóloga e, possivelmente, conduzindo à eliminação do cassete de expressão do gene repórter YFP. Entretanto, esse vírus mostrou-se geneticamente estável e manteve o cassete YFP durante 15 passagens (Figura 15 e dados não mostrados).

A morfologia de placas formadas durante sucessivas passagens em células BHK21 foi se modificando (Figura 15 B), de placas pequenas nas passagens três e cinco, para placas maiores nas passagens seguintes, alcançando aspecto semelhante ao do YFV-17D na 15^a passagem. A expressão de YFP até essa última passagem (Figura 16) confirmou a estabilidade viral, e a alteração na morfologia de placas sugeriu uma adaptação da replicação viral em células BHK21.

Evidências indicam que a estabilidade de YFV recombinantes avaliada *in vitro* correlaciona-se com a estabilidade *in vivo* (FRANCO et al., 2010). Assim, uma avaliação de até 10 passagens em cultivo celular é suficiente para assegurar a estabilidade genética de construções recombinantes de YFV para utilização no desenvolvimento de vacinas vivas atenuadas (GUY et al., 2010).

Quatro mutações foram encontradas na 15^a passagem (Quadro 5), sendo duas mutações silenciosas e duas com alteração de aa. Exceto pela mutação no

gene YFP, as outras foram localizadas em proteínas não-estruturais do genoma, e provavelmente, refletem uma adaptação viral para replicação em cultivo celular.

O genoma do YFV é altamente estável comparado com a maioria dos vírus RNA, ambos *in vivo* e *in vitro* (BARBAN et al., 2007). Essa estabilidade genômica elevada pode ser atribuída à baixa taxa de erro da polimerase viral do vírus YFV-17D (PUGACHEV et al., 2004). Todas as mutações encontradas na região que codifica as proteínas não-estruturais do vírus recombinante YFV-YFP-DENV1linker estavam localizadas nos mesmos genes (NS2A, NS3 e NS5) daquelas observadas, como adaptativas, no YFV-17D ao longo de 12 anos (BARBAN et al., 2007).

As taxas de replicação de duas diferentes passagens, 3^a e 15^a, mostraram a diferença desse vírus em passagens baixa e tardia (Figura 17) e confirmaram a adaptação ao cultivo celular depois de sucessivas passagens. As taxas de replicação alcançaram níveis semelhantes aos do YFV-17D na 15^a passagem, com pico máximo após 72 h de infecção.

A replicação mais lenta do vírus YFV-YFP-DENV1linker passagem baixa, em relação ao YFV-17D, pode ser explicada, em parte, pelo seu genoma extenso e por carrear um gene heterólogo. Dessa forma, a mutação no gene da proteína NS5 (E279K) pode ter contribuído para uma taxa replicativa do vírus recombinante YFV-YFP-DENV1linker semelhante às do YFV-17D (Figura 17). A avaliação criteriosa de uma construção de um novo YFV-YFP-DENV1linker com essa mutação poderia contribuir para elucidar sua importância na replicação viral, manipulação possível graças a genética reversa desenvolvida para esse vírus.

A literatura relata que essa estratégia de inserção de um gene repórter entre as proteínas E e NS1 seguidos por duplicação de nove aa NS1 na extremidade 5' e da sequência *stem-anchor* de E na extremidade 3' proposta por Bonaldo et al. (2007) originou um YFV recombinante instável geneticamente durante o seu desenvolvimento. Posteriormente, esse vírus foi estabilizado por troca da sequência *stem-anchor* do YFV por DENV4 (BONALDO et al., 2007). Aplicações subsequentes desta estratégia foram realizadas para inserção de 692 nt correspondentes ao gene *Gag* do vírus da imunodeficiência de símios (SIV) (BONALDO et al., 2010) e do gene *p24* do vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV) (FRANCO et al., 2010). Não há informações sobre a estabilidade genética do vírus recombinante rYFV17D/SIVGag45-269, porém o recombinante YF-E/p24/NS1 mostrou-se estável durante apenas seis passagens em cultivo celular (BONALDO et al., 2010; FRANCO

et al., 2010). Instabilidade foi adicionalmente observada na inserção, nesta mesma região do genoma do YFV, de uma sequência de 690 nt contendo epítomos conservados entre os quatro sorotipos DENV após poucas passagens em células BHK21 (em elaboração)³.

A estratégia de inserção de sequências heterólogas entre E e NS1 de Bredenbeek et al. (2006) foi também reproduzida e avaliada no presente trabalho. A organização genômica do vírus YFV-YFP-SSE foi a mesma descrita anteriormente (BREDENBEEK et al., 2006), porém a SSE duplicada na porção 3' do gene repórter teve a utilização dos códons otimizados. Essa sequência foi duplicada para assegurar a inserção da proteína NS1 na membrana do RE e, portanto, chamada de sequência sinal do envelope para a NS1. Os códons correspondentes aos 23 aa da SSE foram substituídos por outros códons correspondentes e uma nova sequência SSE foi gerada com menor grau de homologia com a sequência do genoma do YFV-17D. Essa estratégia foi utilizada para minimizar o risco de recombinação homóloga e perda do gene repórter YFP por deleção desta região.

Embora tivesse sido eficientemente recuperado de células BHK21 eletroporadas com RNA sintetizado *in vitro*, o vírus YFV-YFP-SSE não se mostrou estável por muitas passagens em cultivo celular.

A perda parcial do gene que codifica a proteína YFP do vírus YFV-YFP-SSE clone 1 (Figura 19) interferiu negativamente na sua expressão. O gene repórter foi eficientemente expresso pelo clone 1 até a 9ª passagem, a partir da qual foi perdendo gradativamente o potencial de expressão (Figuras 20 e 21). A expressão do YFP pôde ser diretamente associada com a replicação viral, e a perda deste gene foi claramente evidenciada pela diminuição da expressão de YFP pelo vírus recombinante (Figura 21).

A instabilidade do YFV-YFP-SSE clone 1 foi acompanhada por ensaios que revelaram placas com tamanhos e morfologias variadas ao longo das diferentes passagens em células BHK21 (Figura 20 C). As placas formadas na 15ª passagem possuíam aspecto semelhante às formadas pelo YFV-17D e confirmaram a reversão do vírus observada pela amplificação de produtos de PCR com padrão de banda semelhante ao YFV-17D e ausência de expressão do gene repórter.

³ Avaliação preliminar da resposta imune induzida por construções vacinais contendo epítomos conservados entre os quatro sorotipos do vírus da dengue. Manuscrito em elaboração.

Bredenbeek et al. (2006) também relataram dificuldades em recuperar um YFV recombinante geneticamente estável após sucessivas passagens em cultivo celular. A inserção de um gene de aproximadamente 1.300 nt entre as proteínas E e NS1, seguido pela duplicação da sequência sinal de E na extremidade 3', alcançou relativa estabilidade genética quando essa duplicação foi substituída pela sequência homóloga do WNV (JIANG et al., 2011). Porém, essa estabilidade foi assegurada por pelo menos até 10 passagens em cultivo celular, apenas com inserção de genes menores (600 e 693 nt).

Existem evidências de que a replicação dos *Flavivirus* é semi-conservativa, utilizando uma forma replicativa intermediária de RNA dupla fita para a síntese de apenas uma fita de RNA por ciclo (CHU; WESTAWAY, 1985). Assim, uma das explicações para a perda de parte do gene repórter YFP é a possibilidade de pareamentos entre as sequências de 69 nt das regiões SSE durante o processo replicativo. Em consequência, partículas virais contendo RNA com deleções no gene repórter YFP seriam amplificadas e prevaleceriam na população viral após vários ciclos replicativos.

Tentativas de substituir essa sequência por outras com menor homologia foram realizadas para assegurar a estabilidade viral. A inserção da sequência SSE do WNV foi a que mais se aproximou de um modelo estável (JIANG et al., 2011). No entanto, o vírus recombinante revelou-se instável na 10^a passagem semelhante ao que foi observado nos presentes experimentos. Esses resultados sugerem que a sequência SSE do YFV-17D otimizada utilizada no presente trabalho, com 75% de homologia com a sequência do YFV-17D, e a sequência SSE do vírus do Oeste do Nilo não são distintas o suficiente de YFV-17D para evitar a perda do gene repórter. Novos experimentos devem ser realizados para elucidar essa questão.

Uma segunda explicação para a instabilidade é o tamanho da inserção genética. O vírus YFV/ Δ GPC (BREDENBEEK et al., 2006), cuja inserção foi de 1.299 nt, mostrou-se instável após seis passagens em cultivo celular. Na tentativa de alcançar uma estabilidade maior, Jiang et al. (2011) distribuíram essa mesma sequência em duas menores, de 600 e 693 nt, e obtiveram vírus geneticamente estáveis. Nenhuma outra informação foi obtida sobre o tamanho de inserção gênica limítrofe de instabilidade dessa estratégia de manipulação do YFV. Dessa forma, é possível que uma sequência de 717 nt do gene YFP utilizada no presente trabalho seja suficiente para conferir essa instabilidade.

A inserção de fragmentos extensos é de grande interesse no desenvolvimento de vacinas, e poderia permitir a expressão simultânea de um número maior de epítopos. Para isso, tentativas de inserção de sequências maiores foram realizadas também na região 5'-UTR do genoma YFV (FRANCO et al., 2010; SHUSTOV; MASON; FROLOV, 2007) com duplicação da sequência de ciclização da replicação viral na região 5' do gene heterólogo, entretanto, não resultou em vírus geneticamente estáveis. A região 3'UTR de *Flavivirus* foi alvo de inserção de um cassete genético contendo a sequência IRES de um picornavírus e um gene repórter, porém a instabilidade genética desse recombinante tornou inviável tal estratégia para a manipulação de um vetor YFV-17D (PIERSON et al., 2005).

Diante das dificuldades de obter um vírus recombinante viável com inserção de peptídeos maiores que 36 aa, as duas estratégias de inserção na junção E/NS1 (BONALDO et al., 2007; BREDENBEEK et al., 2006) consideradas adequadas para a manipulação genética do YFV foram testadas no presente estudo. Essas estratégias basearam-se no princípio de que, tratando-se de uma região do genoma viral de transição de genes estruturais para não-estruturais, inserções extensas na junção E/NS1 afetariam menos o ciclo viral do que em outras regiões do genoma.

Embora quimeras de *Flavivirus* possam constituir um modelo universal para produção de novas vacinas vivas atenuadas, ainda existem dúvidas sobre a patogenicidade dessas construções em indivíduos imunocomprometidos e a possibilidade de surgimento de quimeras patogênicas devido à ocorrência de mutações durante o processo replicativo desses vírus (MASON; SHUSTOV; FROLOV, 2006).

Assim, a preocupação crescente com a segurança vacinal tem incentivado o uso de replicons em estudos de desenvolvimento vacinal que, em suma, constituem um grande avanço nesta área do conhecimento. A segurança no uso de replicons é conferida pela ausência de formação de partículas virais infecciosas devido à ausência, neste sistema, de proteínas estruturais para o empacotamento viral (MASON; SHUSTOV; FROLOV, 2006; SHUSTOV; MASON; FROLOV, 2007). Essa tecnologia é considerada mais segura do que o sistema tradicional de atenuação viral cujos fenômenos de mutação e reversão gênica podem converter as vacinas para formas mais virulentas dos vírus (PUGACHEV et al., 2004).

Neste trabalho, apresentou-se a construção de dois replicons subgenômicos do YFV. O replicon monocistrônico repYF-17D-Luc possui deleção completa das

proteínas estruturais retendo apenas a sequência dos 21 aa N-terminais do capsídeo, responsável pela ciclização da replicação, e os 72 nt C-terminais da proteína E para sinalização e direcionamento das proteínas não-estruturais para o RE; e o replicon bicistrônico repYF-17D-LucIRES possui deleção apenas das proteínas estruturais prM/E retendo a proteína do capsídeo intacta. Nesse replicon bicistrônico, o primeiro cistron compreende a região 5'-UTR, o gene da proteína do capsídeo seguidos pelos seis primeiros aa da proteína prM para o correto processamento da proteína do capsídeo, e pelo gene repórter Luc. O segundo cistron, por sua vez, compreendia o elemento IRES do EMCV, os 24 resíduos da região C-terminal da proteína E, seguidos pelo restante do genoma viral (NS1-NS5-3'UTR). Para monitorar a infecção e replicação de ambos replicons em cultivo celular, o gene repórter Luc foi inserido na região dos genes das proteínas estruturais deletados e mostrou-se eficientemente expresso e processado por ambos replicons (Figuras 24 e 25).

A técnica de recombinação homóloga em levedura como método de clonagem tem contribuído para a construção e estabilidade do genoma de alguns *Flavivirus* em levedura, os quais muitas vezes são instáveis em *E. coli*. Esse método foi empregado com sucesso para a construção de clones infecciosos (GIBSON, 2009; GIBSON et al., 2008a; 2008b; POLO et al., 1997) e possui, entre outras, a vantagem de não depender de sítios de restrição ou de inserções de mutações como no sistema de clonagem em bactéria (GIBSON, 2009; GIBSON et al., 2008b; OLDENBURG et al., 1997; SHANKS et al., 2009).

O sistema de replicons subgenômicos é uma ferramenta útil como vetor de expressão gênica no desenvolvimento de vacinas. Várias qualidades fazem desses vetores ideais para o desenvolvimento de vacinas altamente eficientes e seguras. Isso inclui altos níveis de expressão de genes heterólogos devido à habilidade do replicon se auto-replicar dentro da célula; replicação exclusivamente citoplasmática que elimina qualquer possibilidade de *splicing* nuclear e integração no cromossomo da célula; incapacidade do RNA do replicon sair da célula transfectada (ou infectada) e infectar outra célula, limitando a sua disseminação, o que faz desse vetor um instrumento biologicamente seguro; genoma relativamente pequeno (~9 kb), permitindo fáceis manipulações do genoma e inserção de genes heterólogos (ANRAKU et al., 2002).

A expressão de genes heterólogos por replicons *Flavivirus* tem sido demonstrada em diferentes estudos. Essas inserções geralmente são realizadas na região deletada das proteínas estruturais ou no início da extremidade 3'UTR. Por outro lado, a construção de replicons bicistrônicos tem contribuído para inovar esse campo de investigação, cuja expressão do segundo cistron é dependente de um IRES (KHROMYKH, 2000).

A capacidade de induzir resposta imune protetora foi assegurada por construções de replicons carreando diferentes tipos de sequências heterólogas (ABERLE et al., 2005; ANRAKU et al., 2002; KOFLER et al., 2004; SUZUKI; WINKELMANN; MASON, 2009) e contribuem para reforçar a sua aplicação no desenvolvimento de vacinas virais.

Por outro lado, a habilidade das proteínas do envelope dos *Flavivirus* formarem as chamadas partículas subvirais é uma característica especial desses vírus e desperta atenção para seu uso como imunógenos. Tais partículas podem ser produzidas eficientemente por células eucariotas contendo vetores de expressão para as proteínas estruturais prM/E (ABERLE et al., 1999; MASON et al., 1991) ou por um genoma defectivo de *Flavivirus* com o gene do capsídeo deletado (ABERLE et al., 2005; MASON; SHUSTOV; FROLOV, 2006). Essas RSPs são desprovidas de material genético e nucleocapsídeo completo, porém, são imunogênicas e induzem resposta imune protetora contra infecções por *Flavivirus* (ABERLE et al., 2005; MASON; SHUSTOV; FROLOV, 2006).

A estratégia de uso de replicon como vetor vacinal está sendo utilizada com êxito em diferentes estudos com *Flavivirus* e nosso grupo de pesquisa no Departamento de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE/CPqAM/FIOCRUZ-PE) vem trabalhando há alguns anos no desenvolvimento de replicons YF-17D. A utilização de replicons subgenômicos como vetor vacinal requer um suprimento *in trans* das proteínas estruturais para a encapsidação destes replicons em PPIs (Figura 30).

A aplicação de PPIs para esse fim requer uma produção em larga escala e o desenvolvimento de uma linhagem que forneça *in trans* as proteínas estruturais necessárias para empacotar esses replicons parece ser uma alternativa viável (MASON; SHUSTOV; FROLOV, 2006). Nesse sistema, os replicons podem ser empacotados e infectar novas células gerando vários ciclos de infecção, o que não ocorre em outras linhagens celulares comuns. Embora seja uma alternativa

promissora para o desenvolvimento de novas vacinas vivas atenuadas, ainda não há um modelo eficiente e padronizado para a sua produção em larga escala. Para este fim, a estratégia adotada foi desenvolver uma linhagem celular que expressasse constitutivamente os genes das proteínas estruturais prM e E do YFV.

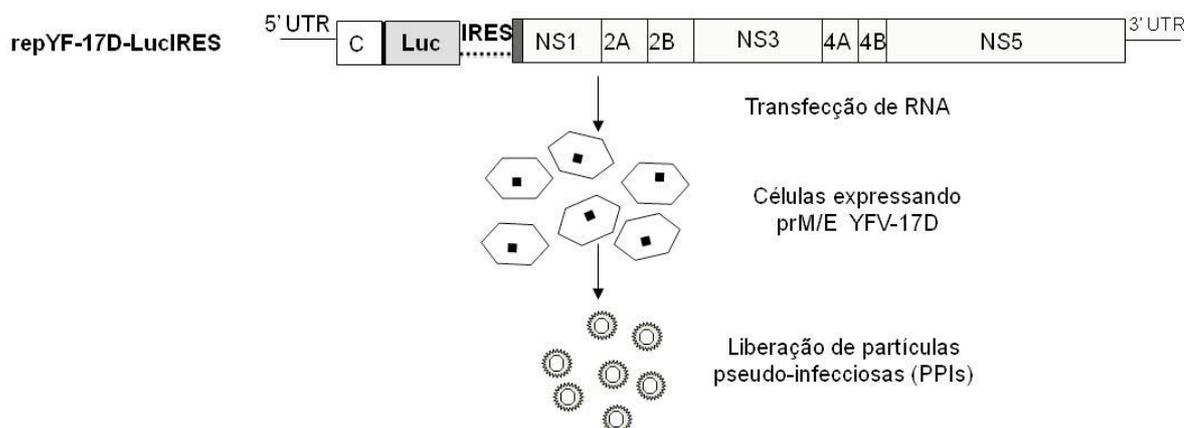


Figura 30. Representação esquemática da estratégia de trans-empacotamento do replicon repYF-17D-LucIRES por uma linhagem celular recombinante.

Neste trabalho foi demonstrado que células HEK293 expressam com eficiência, e em níveis satisfatórios, as proteínas prM/E durante mais de 20 passagens, no entanto mais experimentos são necessários para avaliar a eficiência de trans-empacotamento.

A expressão do gene repórter em células da linhagem recombinante eletroporadas com os RNAs dos replicons subgenômicos de YFV revelaram a replicação eficiente dos mesmos (Figura 28 A), e, como esperado, apenas o sobrenadante da eletroporação com o replicon biscistrônico repYF-17D-LucIRES revelou expressão de luciferase (Figura 28 B). Esse resultado confirmou a identificação anterior (JONES; PATKAR; KUHN, 2005) de que a proteína do capsídeo é essencial para o trans-empacotamento de PPIs.

Esperava-se que o clone celular recombinante que expressasse com mais eficiência as proteínas recombinantes apresentasse consequentemente as menores taxas de multiplicação. O clone 16, identificado como aquele com o maior número de células expressando a expressão da proteína E apresentou taxas de multiplicação semelhantes ao clone 3, cuja proporção de células positivas para a expressão de prM/E foi a menor dos três clones (Figura 28 C). O clone 17, por sua vez, apresentou o padrão de multiplicação mais lenta de todos os três clones (Figura 28

A).

Esses resultados indicaram que o clone 16 era o mais adequado para os ensaios de trans-empacotamento de replicons subgenômicos do YFV. A capacidade da linhagem HEK293-YFV-prM/E-opt empacotar replicons subgenômicos de febre amarela foi, portanto, avaliada pela eletroporação destas células com RNAs dos replicons repórteres repYFV-17D-Luc e repYFV-17D-LucIRES sintetizados *in vitro*.

As diferenças nas curvas de expressão do gene repórter pelos dois replicons podem ser explicadas, em parte, pela estrutura genética de cada um deles: monocitrônico e bicitrônico. O replicon repYF-17D-Luc, por ser geneticamente mais simples que o bicitrônico, apresenta vantagem replicativa e induz mortes celular mais precoce. Por outro lado, o replicon repYF-17D-LucIRES, por se replicar mais lentamente, induz morte celular mais lentamente e permanece por mais tempo expressando o gene repórter.

A expressão do gene repórter também confirmou a funcionalidade da linhagem HEK293-YFV-prM/E-opt em empacotar replicon do YFV desprovido das proteínas estruturais prM e E. Embora, a concentração de PPIs tivesse sido insuficiente para detecção em ensaios de imunofluorescência indireta (dados não mostrados), a inoculação desses sobrenadantes contendo PPIs em células da linhagem HEK293-YFV-prM/E-opt produziu taxas mais elevadas (aumento de 57 vezes) de atividade luciferase (Figura 28 C), indicando a amplificação das PPIs nessa linhagem recombinante devido ao fornecimento *in trans* das proteínas prM e E. Dessa forma, as PPIs sintetizadas e liberadas das células HEK293-YFV-prM/E-opt eletroporadas foram capazes de completar mais de um ciclo de infecção nessa linhagem celular.

Os níveis baixos de expressão de atividade luciferase no trans-empacotamento podem ser devido à baixa eficiência de transfecção e não decorrente da expressão baixa das proteínas prM/E na linhagem celular desenvolvida (o clone usado para os ensaios de trans-empacotamento apresentava a expressão destas proteínas em 90% das células). Dessa forma, poucos replicons foram introduzidos nas células e, conseqüentemente, poucas partículas foram formadas. Outro achado que reforça a hipótese de baixa eficiência de transfecção foi a ausência de detecção de imunofluorescência em células infectadas com as PPIs, embora apresentassem atividade luciferase detectável.

Além disso, é possível que as células recombinantes HEK293-YFV-prM/E-opt comportem-se de forma diferente das células HEK293, e possuem comportamento diferenciado durante processos de transfecções. A susceptibilidade ampla das células HEK293 a diferentes métodos de transfecção e sua eficiência elevada (THOMAS; SMART, 2005) fornecem subsídios para investigações de uma técnica de transfecção mais adequada à linhagem recombinante HEK293-YFV-prM/E-opt na tentativa de obter uma produção mais expressiva de PPIs.

Uma das principais dificuldades da aplicação de PPIs no desenvolvimento de vacinas é a dificuldade de produção em larga escala (GEHRKE et al., 2003; HARVEY et al., 2004). Diferentes estratégias foram utilizadas para aumentar a eficiência de trans-empacotamento de replicons subgenômicos de *Flavivirus* por linhagem celular recombinante expressando proteínas estruturais. Replicons de alfavírus são altamente replicativos, expressam PPIs em títulos elevado, porém, há relatos de citotoxicidade induzida por sua replicação em cultivo celular; replicons de *Flavivirus* para fornecer as proteínas de empacotamento, por sua vez, não induzem efeitos citopáticos, são estáveis em cultivo celular, porém, podem induzir processos de recombinação dependendo do replicon subgenômico a ser empacotado (YOSHII et al., 2005).

O risco de ocorrência de recombinação entre replicons subgenômicos *Flavivirus* e replicons expressando proteínas estruturais para o trans-empacotamento do mesmo gênero foi minimizado pelo uso de um vetor comercial para a expressão constitutiva dos genes prM/E do YFV em células HEK293. A estabilidade deste vetor foi mantida por mais de 30 passagens com expressão protéica em níveis constantes (dados não mostrados). Uma linhagem que expresse por longo período proteínas para trans-empacotamento é uma ferramenta importante para a produção em larga escala de PPIs e este é o primeiro relato de uma expressão duradoura dessas proteínas de *Flavivirus* em cultivo celular.

A linhagem celular HEK293 tem sido utilizada como ferramenta de expressão de proteínas recombinantes por mais de 25 anos. Sua maquinaria bioquímica é capaz de realizar a maioria das modificações pós-traducionais e processamentos requeridos para gerar proteínas funcionais de um amplo espectro de ácidos nucléicos (THOMAS; SMART, 2005). A principal característica dessa linhagem que motivou a sua utilização foi a elevada eficiência de transfecção e produção protéica. A fidelidade com que células HEK293 são capazes de expressar proteínas

heterólogas faz dessas células susceptíveis a diferentes tipos de transfecção, permitindo a expressão de proteínas de diferentes fontes e para diferentes fins (THOMAS; SMART, 2005).

Por fim, a utilização do YFV como vetor viral permanece promissora e de aplicabilidade ímpar no desenvolvimento de novas vacinas vivas atenuadas. As estratégias de manipulação genética desenvolvidas até o momento são viáveis e aplicáveis à rotina de laboratórios de níveis de tecnologia ímpares, como alguns dos que existem em nosso país, e merecem esforços na tentativa de melhorá-las com o intuito de validá-las para uso em larga escala.

8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os procedimentos realizados neste trabalho foram submetidos à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CEP/CPqAM) e julgados não compreender aspectos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo seres humanos de acordo com o Código de Ética resolução CNS 196/96 (ANEXO).

9 CONCLUSÃO

Este estudo de caracterização de estratégias para a utilização YFV como um vetor vacinal é inédito e de grande importância para validação de um modelo estável geneticamente e eficiente para uso como vetor viral no desenvolvimento de vacinas. Nele, duas diferentes estratégias foram avaliadas: vírus recombinante e replicons empacotados em PPIs.

Duas estratégias de construção de YFV recombinantes expressando o gene repórter YFP entre as proteínas E e NS1 do YFV-17D foram testadas. A estratégia de inserção do gene repórter YFP seguida de duplicação da sequência sinal do envelope revelou-se inadequada, com a produção de vírus que perderam o gene heterólogo durante sucessivas passagens em cultivo celular. A estratégia de inserção com duplicação da sequência dos nove aa da proteína NS1 na porção N-terminal do YFP e da sequência *stem-anchor* da proteína E do DENV1 gerou vírus recombinantes estáveis e pode ser considerada a estratégia mais adequada para a construção de YFV recombinantes expressando genes heterólogos longos, com aproximadamente 240 aa (que corresponde ao tamanho do gene repórter YFP).

Replicons subgenômicos do YFV desprovidos de proteínas estruturais (C-prM-E ou prM-E) expressaram o gene repórter luciferase de forma monocistônica ou bicistônica (nesse último, sob o controle do elemento IRES do ECMV). Esses replicons foram competentes em replicar e induziram a expressão de luciferase em níveis detectáveis confirmando sua capacidade vetorial para genes heterólogos.

O desenvolvimento da linhagem celular HEK293-YFV-prM/E-opt expressando proteínas estruturais prM e E do YFV revelou uma fonte eficiente de produção dessas proteínas e de RSPs, além da capacidade de empacotar o replicon do vírus da febre amarela desprovido de proteínas estruturais prM e E.

Conclui-se, por fim, que as diferentes estratégias de manipulação genética do YFV avaliadas neste trabalho constituem ferramentas viáveis e aplicáveis ao processo de desenvolvimento de vacinas contra doenças que acometem humanos e animais. No entanto, há necessidade de otimização dessas estratégias para assegurar maiores segurança e eficácia ao seu uso.

10 PERSPECTIVAS

Esse trabalho resultou em conhecimentos e ferramentas para um grande número de novas investigações visando a validação de estratégias mais adequadas e seguras no desenvolvimento de vacinas contra doenças causadas por *Flavivirus* e outros agentes infecciosos pela utilização da cepa vacinal 17D do YFV como vetor vacinal.

A avaliação das estratégias propostas para a construção de vírus recombinantes com inserção de sequências heterólogas longas forneceu subsídio para o desenvolvimento de um vetor viral YF-17D mais estável geneticamente. A inserção das mutações adaptativas encontradas no genoma viral do YFV-YFP-DENV1linker em uma nova construção deste vírus poderá minimizar os riscos de mutações indesejáveis ao longo de sucessivas passagens em cultivo celular. Uma vez estabelecido um vetor plasmideal contendo o genoma do vírus recombinante YFV-YFP-DENV1linker com as mutações adaptativas, o gene repórter poderá ser substituído por outras sequências heterólogas (por exemplo, epítomos conservados do DENV) e para aplicação no desenvolvimento de vacinas contra diferentes agentes infecciosos. Posteriormente, tentativas de produção em larga escala desse vírus poderiam ser realizadas em ovos embrionados de galinha.

Uma avaliação quantitativa da produção de RSPs pela linhagem HEK-YFV-prM/E-opt poderia contribuir para validação do seu uso como uma fonte mais potente de produção de RSPs em relação às outras linhagens produtoras de proteínas estruturais de *Flavivirus* descritas na literatura. Para otimização do empacotamento de replicons em PPIs pela linhagem HEK-YFV-prM/E-opt, deverão ser padronizadas novas técnicas de transfecção do RNA transcrito *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ABERLE, J. H. et al. A DNA immunization model study with constructs expressing the tick-borne encephalitis virus envelope protein E in different physical forms. Journal of Immunology, Baltimore, v.163, n.12, p.6756-6761, 1999.

_____. Humoral and cellular immune response to RNA immunization with flavivirus replicons derived from tick-borne encephalitis virus. Journal of Virology, Washington, v.79, n.24, p.15107-15113, 2005.

ALLISON, S. L. et al. Synthesis and secretion of recombinant tick-borne encephalitis virus protein E in soluble and particulate form. Journal of Virology, Washington, v.69, n.9, p.5816-5820, 1995.

_____. Mapping of functional element in the stem-anchor region of tick-borne encephalitis virus envelope protein E. Journal of Virology, Washington, v.73, n.7, p.5605-5612, 1999.

ANRAKU, I. et al. Kunjin virus replicon vaccine vectors induce protective CD8+ T-cell immunity. Journal of Virology, Washington, v.76, n.8, p.3791-3799, 2002.

ANSARI, I. H. et al. Involvement of a bovine viral diarrhea virus NS5b locus in virion assembly. Journal of Virology, Washington, v.78, n.18, p.9612-9623, 2004.

ARROYO, J. et al. Chimerivax-West Nile virus live-attenuated vaccine: Preclinical evaluation of safety, immunogenicity, and efficacy. Journal of Virology, Washington, v.78, n.22, p.12497-12507, 2004.

_____. Yellow fever vector live-virus vaccines: West Nile virus vaccine development. Trends in Molecular Medicine, Cambridge, v.7, n.8, p.350-354, 2001.

BARBA-SPAETH, G. et al. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant t cell epitopes. The Journal of Experimental Medicine, New York, v.202, n.9, p.1179-1184, 2005.

BARBAN, V. et al. High stability of yellow fever 17D-204 vaccine: A 12-year retrospective analysis of large-scale production. Vaccine, Guildford, v.25, n.15, p.2941-2950, 2007.

BARRETT, A. D.; MONATH, T. P. Epidemiology and ecology of yellow fever virus. Advances in Virus Research, New York, v.61, p.291-315, 2003.

BARRETT, A. D.; TEUWEN, D. E. Yellow fever vaccine - how does it work and why do rare cases of serious adverse event take place? Current Opinion in Immunology, Mayland, v.21, n.3, p.308-313, 2009.

BEHRENS, S. E. et al. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. Journal of Virology, Washington, v.72, n.3, p.2364-2372, 1998.

BLIGHT, K. J.; MCKEATING, J. A.; RICE, C. M. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. Journal of Virology, Washington, v.76, n.24, p.13001-13014, 2002.

BONALDO, M. C. et al. Surface expression of an immunodominant malaria protein B cell epitope by yellow fever virus. Journal of Molecular Biology, London, v.315, n.4, p.873-885, 2002.

_____. Expression of foreign protein epitopes at the surface of recombinant yellow fever 17D viruses based on three-dimensional modeling of its envelope protein. Cell Biochemistry and Biophysics, New York, v.44, n.3, p.313-324, 2006.

_____. Attenuation of recombinant yellow fever 17D viruses expressing foreign protein epitopes at the surface. Journal of Virology, Washington, v.79, n.13, p.8602-8613, 2005.

_____. Recombinant yellow fever vaccine virus 17D expressing SIVmac239 gag induces SIV-specific CD8+ T cell responses in rhesus macaques. Journal of Virology, Washington, p.3699-3706, 2010.

_____. Construction and characterization of recombinant flaviviruses bearing insertions between E and NS1 genes. Journal of Virology, Washington, v.4, p.115, 2007.

BOYER, J. C.; HAENNI, A. L. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. Virology, New York, v.198, n.2, p.415-426, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Febre amarela. Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1552>.
Acesso em: 23 mar. 2011.

_____. Manual de vigilância de epizootias em primatas não-humanos. Brasília, DF. 2005. 56 p.

_____. Febre Amarela. In: Guia de Vigilância Epidemiológica. 6. ed., Brasília, DF, 2005b, Cap 9, p. 307-324.

BREDENBEEK, P. J. et al. A recombinant yellow fever 17D vaccine expressing lassa virus glycoproteins. Virology, New York, v.345, n.2, p.299-304, 2006.

CAMACHO, L. A. et al. Immunogenicity of WHO-17D and Brazilian 17DD yellow fever vaccines: a randomized trial. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v.38, n.5, p.671-678, 2004.

CAPOZZO, A. V. et al. Neonatal immunization with a sindbis virus-DNA measles vaccine induces adult-like neutralizing antibodies and cell-mediated immunity in the presence of maternal antibodies. Journal of Immunology, Baltimore, v.176, n.9, p.5671-5681, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (United States of America). Yellow fever vaccine. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/YellowFever/vaccine/index.html>>. Acesso em: 21 mar 2011.

_____. Yellow Fever Vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Morbidity and Mortality Weekly Report, v.59, n.RR-7, p.1-27, 2010.

CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v.44, p.649-688, 1990a.

_____. Yellow fever/japanese encephalitis chimeric viruses: construction and biological properties. Journal of Virology, Washington, v.73, n.4, p.3095-3101, 1999.

CHAMBERS, T. J.;NICKELLS, M. Neuroadapted yellow fever virus 17D: Genetic and biological characterization of a highly mouse-neurovirulent virus and its infectious molecular clone. Journal of Virology, Washington, v.75, n.22, p.10912-10922, 2001.

CHAMBERS, T. J. et al. Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America, Washington, v.87, n.22, p.8898-8902, 1990b.

CHIH-YUN LAI, H.-P. H., CHWAN-CHUEN KING; WEI-KUNG WANG. Incorporation of dengue virus replicon into virus-like particles by a cell line stably expressing precursor membrane and envelope proteins of dengue virus type 2. Journal of Biomedical Science, Dordrecht, v.15, p.15-27, 2008.

CHU, P. W.; WESTAWAY, E. G. Replication strategy of kunjin virus: evidence for recycling role of replicative form RNA as template in semiconservative and asymmetric replication. Virology, New York, v.140, n.1, p.68-79, 1985.

CORVER, J. et al. Fine mapping of a cis-acting sequence element in yellow fever virus RNA that is required for RNA replication and cyclization. Journal of Virology, Washington, v.77, n.3, p.2265-2270, 2003.

CRILL, W. D.;CHANG, G. J. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. Journal of Virology, Washington, v.78, n.24, p.13975-13986, 2004.

DONG, M. et al. Induction of primary virus-cross-reactive human immunodeficiency virus type 1-neutralizing antibodies in small animals by using an alphavirus-derived in vivo expression system. Journal of Virology, Washington, v.77, n.5, p.3119-3130, 2003.

FAYZULIN, R. et al. Evaluation of replicative capacity and genetic stability of West Nile virus replicons using highly efficient packaging cell lines. Virology, New York, v.351, n.1, p.196-209, 2006.

FRANCO, D. et al. Evaluation of yellow fever virus 17D strain as a new vector for HIV-1 vaccine development. Vaccine, Guildford, v.28, n.35, p.5676-5685, 2010.

FRIERSON, J. G. The yellow fever vaccine: a history. Yale Journal of Biology and Medicine, New Haven, v.83, n.2, p.77-85, 2010.

FULTZ, P. N. et al. Immunogenicity in pig-tailed macaques of poliovirus replicons expressing HIV-1 and SIV antigens and protection against SHIV-89.6p disease. Virology, New York, v.315, n.2, p.425-437, 2003.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Manual de Vigilância Epidemiológica da Febre Amarela. Brasília, DF, 1999. 60 p.

GARDNER, C. L.;RYMAN, K. D. Yellow fever: A reemerging threat. Clinics in Laboratory Medicine, Philadelphia, v.30, n.1, p.237-260, 2010

GAUCHER, D. et al. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. Journal of Experimental Medicine, New York, v.205, n.13, p.3119-3131, 2008.

GEHRKE, R. et al. Incorporation of tick-borne encephalitis virus replicons into virus-like particles by a packaging cell line. Journal of Virology, Washington, v.77, n.16, p.8924-8933, 2003.

GERSHMAN, M.; SCHROEDER, B.; STAPLES J. E. Travelers' Health - Yellow Book. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2011. Disponível em <<http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2010/chapter-2/yellow-fever.aspx#669>>. Acesso em 23 de março de 2011.

GIBSON, D. G. Synthesis of DNA fragment in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. Nucleic Acids Research, Oxford, v.37, n.20, p.6984-6990, 2009.

GIBSON, D. G. et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. Science, Washington, v.319, n.5867, p.1215-1220, 2008a.

_____. One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragment to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America, Washington, v.105, n.51, p.20404-20409, 2008b.

GOLDBERG, S. M. et al. Comparison of two cancer vaccines targeting tyrosinase: Plasmid DNA and recombinant alphavirus replicon particles. Clinical Cancer Research, Philadelphia, v.11, n.22, p.8114-8121, 2005.

GUBLER, D. J. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases, New York, v.27, n.5, p.319-330, 2004.

GUBLER, D. J.; KUNO, G.; MARHOFF, L. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. Fields' virology. 5th ed. Philadelphia: Quebecor Versailles, 2007. v.1, p.1153-1252.

GUIRAKHOO, F. et al. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. Journal of Virology, Washington, v.75, n.16, p.7290-7304, 2001.

_____. 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, New York, v.298, n.1, p.146-159, 2002.

_____. Safety and efficacy of chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine formulations in nonhuman primates. Journal of Virology, Washington, v.78, n.9, p.4761-4775, 2004.

_____. 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, New York, v.257, n.2, p.363-372, 1999.

GUPTA, S. et al. Characterization of human immunodeficiency virus gag-specific gamma interferon-expressing cells following protective mucosal immunization with alphavirus replicon particles. Journal of Virology, Washington, v.79, n.11, p.7135-7145, 2005.

GUY, B. et al. Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese Encephalitis viruses. Vaccine, Guildford, v.28, n.3, p.632-649, 2010.

GUY, B.;SAVILLE, M.;LANG, J. Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. Human Vaccine, Georgetown, v.6, n.9, p.632-649, 2010.

HAHN, C. S. et al. Comparison of the virulent asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America, Washington, v.84, n.7, p.2019-2023, 1987.

HARVEY, T. J. et al. Kunjin virus replicon vectors for human immunodeficiency virus vaccine development. Journal of Virology, Washington, v.77, n.14, p.7796-7803, 2003.

_____. Tetracycline-inducible packaging cell line for production of flavivirus replicon particles. Journal of Virology, Washington, v.78, n.1, p.531-538, 2004.

HERD, K. A. et al. Recombinant Kunjin virus replicon vaccines induce protective T-cell immunity against human papillomavirus 16 E7-expressing tumour. Virology, New York, v.319, n.2, p.237-248, 2004.

HEVEY, M. et al. Marburg virus vaccines based upon alphavirus replicons protect guinea pigs and nonhuman primates. Virology, New York, v.251, n.1, p.28-37, 1998.

JIANG, X. et al. Yellow fever 17D-vectored vaccines expressing Lassa virus GP1 and GP2 glycoproteins provide protection against fatal disease in guinea pigs. Vaccine, Guildford, v.29, n.6, p.1248-1257, 2011.

JOHNSON, B. W. et al. Growth characteristics of the veterinary vaccine candidate Chimerivax-West Nile (WN) virus in *Aedes* and *Culex* mosquitoes. Medical and Veterinary Entomology, Singapore, v.17, n.3, p.235-243, 2003.

_____. Growth characteristics of Chimerivax-DEN2 vaccine virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore,, v.67, n.3, p.260-265, 2002.

JOHNSTON, R. E. et al. Vaccination of macaques with SIV immunogens delivered by Venezuelan equine encephalitis virus replicon particle vectors followed by a mucosal challenge with SIVsmE660. Vaccine, Guildford, v.23, n.42, p.4969-4979, 2005.

JONES, C. T.; PATKAR, C. G.; KUHN, R. J. Construction and applications of yellow fever virus replicons. Virology, New York, v.331, n.2, p.247-259, 2005.

JONES, M. et al. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing Stat2 expression. Journal Virology, Washington, v.79, n.9, p.5414-5420, 2005.

JULANDER, J. G. et al. Comparison of the inhibitory effects of interferon alfacon-1 and ribavirin on yellow fever virus infection in a hamster model. Antiviral Research, Amsterdam, v.73, n.2, p.140-146, 2007.

KAPLAN, G.; RACANIELLO, V. R. Construction and characterization of poliovirus subgenomic replicons. Journal of Virology, Washington, v.62, n.5, p.1687-1696, 1988.

KHROMYKH, A. A. Replicon-based vectors of positive strand RNA viruses. Current Opinion in Molecular Therapeutics, London, v.2, n.5, p.555-569, 2000.

KHROMYKH, A. A.; VARNAVSKI, A. N.; WESTAWAY, E. G. Encapsidation of the flavivirus Kunjin replicon RNA by using a complementation system providing Kunjin virus structural proteins *in trans*. Journal of Virology, Washington, v.72, p. 5967-5977, 1998

KHROMYKH, A. A.; WESTAWAY, E. G. Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. Journal of Virology, Washington, v.71, n.2, p.1497-1505, 1997.

KIRMAN, J. R. et al. Enhanced immunogenicity to *Mycobacterium tuberculosis* by vaccination with an alphavirus plasmid replicon expressing antigen 85a. Infection and Immunity, Washington, v.71, n.1, p.575-579, 2003.

KOFLER, R. M. et al. Mimicking live flavivirus immunization with a noninfectious RNA vaccine. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v.101, n.7, p.1951-1956, 2004.

KÜMMERER, B. M. The molecular biology of yellow fever virus. In: KALITZKY, M.;BOROWSKI, P. (Ed.). Molecular biology of the flavivirus. Norfolk UK: Cromwell Press, 2006. The molecular biology of yellow fever virus, p.1-16.

LANG, J. et al. Comparison of the immunogenicity and safety of two 17D yellow fever vaccines. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v.60, n.6, p.1045-1050, 1999.

LEE, E. et al. Mutagenesis of the signal sequence of yellow fever virus prM protein: enhancement of signalase cleavage *in vitro* is lethal for virus production. Journal of Virology, Washington, v.74, n.1, p.24-32, 2000.

LEITNER, W. W. et al. Alphavirus-based DNA vaccine breaks immunological tolerance by activating innate antiviral pathways. Nature Medicine, London, v.9, n.1, p.33-39, 2003.

LILJESTROM, P.; GAROFF, H. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. Biotechnology, New York, v.9, n.12, p.1356-1361, 1991.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Trans-complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. Journal of Virology, Washington, v.71, n.12, p.9608-9617, 1997.

_____. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4a as a determinant of replicase function. Journal of Virology, Washington, v.73, n.6, p.4611-4621, 1999.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H.-J.; RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. Fields' virology. Fifth edition. Philadelphia: Quebecor Versailles, 2007. v.1, p.1100-1152.

LOHMANN, V. et al. Replication of subgenomic hepatitis C virusRNAs in a hepatoma cell line. Science, Washington, v.285, n.5424, p.110-113, 1999.

MANDL, C. W. et al. Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutant of a flavivirus. Journal of Virology, Washington, v.72, n.3, p.2132-2140, 1998.

MANIVASAKAM, P. et al. Micro-homology mediated PCR targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Research, Oxford, v.23, n.14, p.2799-2800, 1995.

MASON, P. W. et al. Japanese Encephalitis virus-Vaccinia recombinant produce particulate forms of the structural membrane proteins and induce high levels of protection against lethal JEV infection. Virology, New York, v.180, n.1, p.294-305, 1991.

MASON, P. W.; SHUSTOV, A. V.; FROLOV, I. Production and characterization of vaccines based on flaviviruses defective in replication. Virology, New York, v.351, n.2, p.432-443, 2006.

MAURER, R. et al. Oronasal vaccination with Classical Swine Fever Virus (CSFV) replicon particles with either partial or complete deletion of the E2 gene induces partial protection against lethal challenge with highly virulent CSFV. Vaccine, Guildford, v.23, n.25, p.3318-3328, 2005.

MCALLISTER, A. et al. Recombinant yellow fever viruses are effective therapeutic vaccines for treatment of murine experimental solid tumors and pulmonary metastases. Journal of Virology, Washington, v.74, n.19, p.9197-9205, 2000.

MEGEDE, J. Z. et al. Evaluation of human immunodeficiency virus type 1 subtype C gag, pol, and gagpol DNA and alphavirus replicon vaccines. Vaccine, Guildford, v.24, n.15, p.2755-2763, 2006.

MILLER, J. D. et al. Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. Immunity, Philadelphia v.28, n.5, p.710-722, 2008.

MONATH, T. P. Treatment of yellow fever. Antiviral Research, Amsterdam, v.78, n.1, p.116-124, 2008.

MONATH, T. P. et al. Chimeric live, attenuated vaccine against Japanese encephalitis (Chimerivax-JE): Phase 2 clinical trials for safety and immunogenicity, effect of vaccine dose and schedule, and memory response to challenge with inactivated Japanese encephalitis antigen. The Journal of Infectious Disease, Boston, v.188, n.8, p.1213-1230, 2003.

_____. Clinical proof of principle for Chimerivax: recombinant live, attenuated vaccines against flavivirus infections. Vaccine, Guildford, v.20, n.7-8, p.1004-1018, 2002a.

_____. Comparative safety and immunogenicity of two yellow fever 17D vaccines (Arlivax and YF-Vax) in a phase III multicenter, double-blind clinical trial. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v.66, n.5, p.533-541, 2002b.

_____. Recombinant, chimaeric live, attenuated vaccine (Chimerivax) incorporating the envelope genes of Japanese Encephalitis (SA14-14-2) virus and the capsid and nonstructural genes of yellow fever (17D) virus is safe, immunogenic and protective in non-human primates. Vaccine, Guildford, v.17, n.15-16, p.1869-1882, 1999.

MOSIMANN, A. L. et al. Construction and characterization of a stable subgenomic replicon system of a Brazilian dengue virus type 3 strain (BR DEN3 290-02). Journal of Virological Methods, Amsterdam, v.163, n.1, p.147-152, 2010.

NI, B. et al. Induction of p815 tumor immunity by DNA-based recombinant Semliki forest virus or replicon DNA expressing the P1A gene. Cancer Detection and Prevention, New York, v.28, n.6, p.418-425, 2004.

NICKELLS, M.; CHAMBERS, T. J. Neuroadapted yellow fever virus 17D: Determinant in the envelope protein govern neuroinvasiveness for SCID mice. Journal of Virology, Washington, v.77, n.22, p.12232-12242, 2003.

NORDSTROM, E. K. et al. Enhanced immunogenicity using an alphavirus replicon DNA vaccine against Human immunodeficiency virus type 1. Journal of General Virology, Rio de Janeiro, v.86, n.Pt 2, p.349-354, 2005.

OLDENBURG, K. R. et al. Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction *in vivo* in yeast. Nucleic Acids Research, Oxford, v.25, n.2, p.451-452, 1997.

OP DE BEECK, A. et al. Role of the transmembrane domains of prM and E proteins in the formation of yellow fever virus envelope. Journal of Virology, Washington, v.77, n.2, p.813-820, 2003.

_____. The transmembrane domains of the prM and E proteins of yellow fever virus are endoplasmic reticulum localization signals. Journal of Virology, Washington, v.78, n.22, p.12591-12602, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Yellow fever: A current threat. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/yellowfev/impact1/en/index.html>>. Acesso em: 21 mar 2011.

PALMER, D. R. et al. Restricted replication and lysosomal trafficking of yellow fever 17D vaccine virus in human dendritic cells. Journal of General Virology, Rio de Janeiro, v.88, n.Pt 1, p.148-156, 2007.

PAN, C. H. et al. Inaugural article: modulation of disease, T cell responses, and measles virus clearance in monkeys vaccinated with H-encoding alphavirus replicon particles. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v.102, n.33, p.11581-11588, 2005.

PANG, X.; ZHANG, M.; DAYTON, A. I. Development of dengue virus replicons expressing HIV-1 gp120 and other heterologous genes: A potential future tool for dual vaccination against dengue virus and HIV. BMC Microbiology, London, v.1, p.28, 2001a.

_____. Development of dengue virus type 2 replicons capable of prolonged expression in host cells. BMC Microbiology, London, v.1, p.18, 2001b.

PEKOSZ, A.; HE, B.; LAMB, R. A. Reverse genetics of negative-strand RNA viruses: Closing the circle. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v.96, n.16, p.8804-8806, 1999.

PIERSON, T. C. et al. An infectious West Nile virus that expresses a GFP reporter gene. Virology, New York, v.334, n.1, p.28-40, 2005.

POLO, S. et al. Infectious RNA transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast. Journal of Virology, Washington, v.71, n.7, p.5366-5374, 1997.

PUGACHEV, K. V. et al. High fidelity of yellow fever virus RNA polymerase. Journal of Virology, Washington, v.78, n.2, p.1032-1038, 2004.

_____. Heterogeneous nature of the genome of the Arilvax yellow fever 17D vaccine revealed by consensus sequencing. Vaccine, Guildford, v.20, n.7-8, p.996-999, 2002.

_____. Construction and biological characterization of artificial recombinant between a wild type flavivirus (Kunjin) and a live chimeric flavivirus vaccine (Chimerivax-JE). Vaccine, Guildford, v.25, n.37-38, p.6661-6671, 2007.

PUSHKO, P. et al. Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan Equine Encephalitis virus: expression of heterologous genes *in vitro* and immunization against heterologous pathogens *in vivo*. Virology, New York, v.239, n.2, p.389-401, 1997.

QUEREC, T. D.; PULENDRAN, B. Understanding the role of innate immunity in the mechanism of action of the live attenuated yellow fever vaccine 17D. Advances in Experimental Medicine and Biology, New York, v.590, p.43-53, 2007.

REY, F. A. et al. The envelope glycoprotein from Tick-Borne Encephalitis virus at 2 Å resolution. Nature, London, v.375, n.6529, p.291-298, 1995.

RICE, C. M. et al. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. Science, Washington, v.229, n.4715, p.726-733, 1985.

ROSSI, S. L. et al. Adaptation of West Nile virus replicons to cells in culture and use of replicon-bearing cells to probe antiviral action. Virology, New York, v.331, n.2, p.457-470, 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

SAMPATH A.; PADMANABHAN R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. Antiviral Research, Amsterdam, v.81, p.6-15, 2009.

SANTOS, A. P. et al. Detection of Th1/Th2 cytokine signatures in yellow fever 17DD first-time vaccinees through ELISPOT assay. Cytokine, San Diego, v.42, n.2, p.152-155, 2008.

SBRANA, E. et al. Efficacy of post-exposure treatment of yellow fever with ribavirin in a hamster model of the disease. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v.71, n.3, p.306-312, 2004.

SCHALICH, J. et al. Recombinant subviral particles from Tick-Borne Encephalitis virus are fusogenic and provide a model system for studying flavivirus envelope glycoprotein functions. Journal of Virology, Washington, v.70, n.7, p.4549-4555, 1996.

SCHOLLE, F. et al. Trans-packaged West Nile virus-like particles: Infectious properties *in vitro* and in infected mosquito vectors. Journal of Virology, Washington, v.78, n.21, p.11605-11614, 2004.

SHANKS, R. M. et al. New yeast recombineering tools for bacteria. Plasmid, New York, v.62, n.2, p.88-97, 2009.

SHI, P. Y.; TILGNER, M.; LO, M. K. Construction and characterization of subgenomic replicons of New York strain of West Nile virus. Virology, New York, v.296, n.2, p.219-233, 2002.

SHUSTOV, A. V.; MASON, P. W.; FROLOV, I. Production of pseudoinfectious yellow fever virus with a two-component genome. Journal of Virology, Washington, v.81, n.21, p.11737-11748, 2007.

SMYTHIES, L. E. et al. Poliovirus replicons encoding the B subunit of Helicobacter pylori urease protect mice against H. pylori infection. Vaccine, Guildford, v.23, n.7, p.901-909, 2005.

STAPLES, J. E.; MONATH, T. P. Yellow fever: 100 years of discovery. Journal of the American Medical Association, Chicago, v.300, n.8, p.960-962, 2008.

STEFFENS, S.; THIEL, H. J.; BEHRENS, S. E. The RNA-dependent RNA polymerases of different members of the family Flaviviridae exhibit similar properties *in vitro*. Journal of General Virology, London, v.80, pt.10, p.2583-2590, 1999.

STOCKS, C. E.; LOBIGS, M. Signal peptidase cleavage at the flavivirus C-prM junction: dependence on the viral NS2b-3 protease for efficient processing requires determinant in C, the signal peptide, and prM. Journal of Virology, Washington, v.72, n.3, p.2141-2149, 1998.

SUZUKI, R.; WINKELMANN, E. R.; MASON, P. W. Construction and characterization of a single-cycle chimeric flavivirus vaccine candidate that protects mice against lethal challenge with dengue virus type 2. Journal of Virology, Washington, v.83, n.4, p.1870-1880, 2009.

TANNIS, L. L. et al. Semliki Forest virus and Kunjin virus RNA replicons elicit comparable cellular immunity but distinct humoral immunity. Vaccine, Guildford, v.23, n.33, p.4189-4194, 2005.

TAO, D. et al. Yellow fever 17D as a vaccine vector for microbial CTL epitopes: protection in a rodent malaria model. The Journal of Experimental Medicine, New York, v.201, n.2, p.201-209, 2005.

THEILER, M.; SMITH, H. H. The effect of prolonged cultivation *in vitro* upon the pathogenicity of yellow fever virus. The Journal of Experimental Medicine, New York, v.65, n.6, p.767-786, 1937a.

_____. The use of yellow fever virus modified by *in vitro* cultivation for human immunization. The Journal of Experimental Medicine, New York, v.65, n.6, p.787-800, 1937b.

THOMAS, C. E. et al. Vaccination of mice with gonococcal TbpB expressed in vivo from Venezuelan Equine Encephalitis viral replicon particles. Infection and Immunity, Washington, v.74, n.3, p.1612-1620, 2006.

THOMAS, P.;SMART, T. G. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, London, v.51, n.3, p.187-200, 2005.

TOMLINSON, W.;HODGSON, R. S. Centennial year of yellow fever eradication in New Orleans and the United States, 1905-2005. The Journal of the Louisiana State Medical Society, Louisiana, v.157, n.4, p.216-217, 2005.

TOMORI, O. Yellow fever: The recurring plague. Critical Reviews in Clinical Laboratory Science, Washington, v.41, n.4, p.391-427, 2004.

TZENG, W. P. et al. Rubella virus DI RNAs and replicons: Requirement for nonstructural proteins acting in cis for amplification by helper virus. Virology, New York, v.289, n.1, p.63-73, 2001.

VASCONCELOS, P. F. Yellow fever. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v.36, n.2, p.275-293, 2003.

VASCONCELOS, P. F. D. C. Yellow fever: Reflections on the disease, prospects for the century and risk of re-urbanization. Revista Brasileira de Epidemiologia, São Paulo, v.5, n.2, p.244, 2002.

WANG, X. et al. Alphavirus replicon particles containing the gene for HER2/neu inhibit breast cancer growth and tumorigenesis. Breast Cancer Research, London, v.7, n.1, p.R145-155, 2005.

WENGLER, G. The NS3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. Virology, New York, v.197, n.1, p.265-273, 1993.

WHITE, L. J. et al. An immunogenic and protective alphavirus replicon particle-based dengue vaccine overcomes maternal antibody interference in weaning mice. Journal of Virology, Washington, v.81, n.19, p.10329-10339, 2007.

XIONG, C. et al. Sindbis virus: An efficient, broad host range vector for gene expression in animal cells. Science, Washington, v.243, n.4895, p.1188-1191, 1989.

YOSHII, K. et al. Packaging the replicon RNA of the far-eastern subtype of tick-borne encephalitis virus into single-round infectious particles: Development of a heterologous gene delivery system. Vaccine, Guildford, v.23, n.30, p.3946-3956, 2005.

ZHANG, W. et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. Nature Structural Biology, London, v.10, n.11, p.907-912, 2003.

ZHU, W. et al. Comparison of immune responses to gonococcal PorB delivered as outer membrane vesicles, recombinant protein, or Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles. Infection and Immunity, Washington, v.73, n.11, p.7558-7568, 2005.

ANEXO A

PARECER DO CEP/CPqAM



Título do Projeto: Construção e avaliação de vacinas recombinantes tetravalentes contra o vírus da Dengue através da utilização de epítomos virais conservados.

Pesquisador responsável: Sabrina Ribeiro de Almeida

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 07/04/2008

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 12/09

Registro no CAAE: 0011.0.095.000-08

PARECER Nº 17/2009

O Comitê avaliou e considera que o Projeto em questão não envolve procedimentos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96 e complementares.

Recife, 06 de maio de 2009.

Graciele Campozana Queiroz



Graciele Campozana Queiroz
Coordenadora
Mét. BIAPE 04/03/08
CPqAM/FIOCRUZ