

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

NOEMIA SANTANA LIMA

Estudo sobre a infecção do vírus da Febre Amarela vacinal em camundongo

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

Orientadora: Prof. Dra. Myrna Cristina Bonaldo

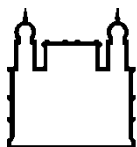
RIO DE JANEIRO

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2011.

1. Vírus Febre Amarela 2. Tropismo 3. Vacina 17D



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

NOEMIA SANTANA LIMA

Estudo sobre a infecção do vírus da Febre Amarela vacinal em camundongo

ORIENTADORA: Prof. Dra. Myrna Cristina Bonaldo

Aprovada em: 09/05/2011

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Claire Fernandes Kubelka - Presidente

Prof. Dra. Ana Maria Bispo de Filippis

Prof. Dr. Otacílio da Cruz Moreira

Prof. Dr. Ricardo Galler

Prof. Dra. Ada Maria Alves Barcelos

Rio de Janeiro, de de 2011

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram para a realização do meu mestrado e para a execução deste trabalho:

À minha família e amigos pelo apoio e companheirismo durante esta jornada.

Ao meu marido João Paulo por todo o seu amor, carinho e compreensão.

Aos meus colegas de curso e de laboratório pela companhia e pelas ajudas técnicas e discussões científicas, em especial: Marlon, Juliana, Gisela, Thiago e Taiana.

À Dra. Myrna Bonaldo por ter me aceitado no laboratório e me orientado neste trabalho.

Ao Dr. Marcelo Alves pela ajuda fundamental na análise dos meus resultados.

Ao Dr. Ricardo Galler pelas informações e discussões que acrescentou a este trabalho.

Aos membros da banca examinadora por ter aceitado meu convite.

Às plataformas tecnológicas de PCR em Tempo Real e sequenciamento do PDTIS.

Ao Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Endêmicas e, em especial, à Dra. Constança, ao Dr. Otacílio e à Angélica pelas ajudas com a PCR em Tempo Real e por ter me cedido espaço no laboratório.

Ao Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais por ter permitido o uso do equipamento Replotron e pelas dicas técnicas importantes para os meus experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação e seus docentes pela formação acadêmica que me propiciaram.

À Dra. Jussara Nascimento e Maria Luiza por terem me aberto as portas do mundo científico e me indicado o caminho para a realização deste mestrado.

“Siga a força que persegue a criança que não teme o tombo
E consegue superar a tal barreira
Brincando com a razão”

(Elysio – Raiz do Sana)

“Se as coisas são inatingíveis... Ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”

(Mario Quintana)

SIGLAS E ABREVIATURAS

AST	Aspartato aminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
cap	Resíduo G metilado (7-metil G)
°C	Graus Celsius
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
cm	Centímetro
CMC	Carboximetilcelulose
Ct	Ciclo de limiar, do inglês “ <i>Cycle threshold</i> ”
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
DTT	1,4-ditiotreitol
EB	Tampão de eluição
EDTA	Etileno-diamino tetra acetato de sódio
EGFP	Proteína fluorescente verde reforçada, do inglês “ <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> ”
ELISA	Ensaio imuno-enzimático, do inglês “ <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> ”
EUA	Estados Unidos da América
FA	Febre Amarela
g	Gramas
GOT	Glutamato oxaloacetato transaminase
GPT	Glutamato piruvato transaminase
h	Horas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina

IP	do inglês “ <i>Interferon-inducible Protein</i> ”
kDa	Kilodaltons
LD ₅₀	Dose viral capaz de matar 50% dos animais inoculados
M	Molar
MCP	do inglês “ <i>Monocyte Chemoattractant Protein</i> ”
mg	Miligramas
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade, do inglês “ <i>Major Histocompatibility Complex</i> ”
min	Minutos
MIP	do inglês “ <i>Macrophage Inflammatory Protein</i> ”
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NCR	Região não codificante
ng	Nanograma
NK	do inglês “ <i>Natural Killer</i> ”
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NS	Proteína não estrutural
nt	Nucleotídeos
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFU	Unidade formadora de placas, do inglês “ <i>Plaque Forming Unit</i> ”
pH	Potencial de hidrogênio
pM	Picomolar
PRNT	Teste de redução de placas por neutralização, do inglês “ <i>Plaque Reduction Neutralization Test</i> ”
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
qRT-PCR	Transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase quantitativa

RANTES	do inglês " <i>Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted</i> "
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
RT-PCR	Transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase
S	Unidade de sedimentação de Svedberg
seg	Segundos
SIV	Vírus da Imunodeficiência de Símios
sp	Espécie
<i>spp</i>	Espécies
STAT	do inglês " <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> "
SURE	Células <i>Escherichia coli</i> competentes, do inglês " <i>Stop Unwanted Rearrangement Events</i> "
TAE	Tris Acetato EDTA
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Fator de Necrose Tumoral
tRNA	RNA transportador
U	Unidades internacionais
UNG	Uracil-N-glicosilase
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância, do inglês " <i>United Nations Children's Fund</i> "
v	Versão
V	Volts
x g	Força gravitacional
µg	Micrograma
µL	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Focos de epidemias de febre amarela entre 1800 e 1935	2
Figura 1.2	Esquema sobre a organização dos genes e das proteínas dos flavivírus	6
Figura 1.3	Etapas do ciclo de replicação dos flavivirus	7
Figura 1.4	Estrutura da proteína E no vírion maduro dos flavivírus	10
Figura 1.5	Ciclos de transmissão do vírus Febre Amarela entre os seus hospedeiros e vetores	11
Figura 1.6	Áreas endêmicas da Febre Amarela na África e América do Sul	12
Figura 1.7	Histórico de passagens da cepa viral Asibi para obtenção das sub-cepas vacinais 17D-204 e 17DD	14
Figura 1.8	Cronologia da resposta imune promovida pela vacina FA 17D	18
Figura 3.1	Desenho experimental para o ensaio de detecção e quantificação do RNA viral	33
Figura 3.2	Esquema demonstrando a região do genoma do vírus amplificada pela RT-PCR semi-nested	35
Figura 3.3	Esquema sobre o mecanismo de emissão do sinal fluorescente pelo sistema TaqMan	36
Figura 4.1	Teste de sensibilidade da RT-PCR semi-nested para detecção do RNA viral	47
Figura 4.2	Curva padrão da qRT-PCR em duas etapas utilizando diluições seriadas de fator 10 do RNA padrão equivalentes às concentrações de 1 a 10^6 cópias/reação	48
Figura 4.3	Curva padrão do qRT-PCR em uma etapa utilizando diluições seriadas de fator 10 do RNA padrão equivalentes às concentrações de 20 a 2×10^6 cópias/reação	49

Figura 4.4	Detecção de viremia em camundongos vacinados com o vírus FA 17DD	51
Figura 4.5	Detecção de RNA viral em amostras de pele do local da inoculação com o vírus FA 17DD	52
Figura 4.6	Detecção de RNA viral em amostras de linfonodo drenante do local da inoculação com o vírus FA 17DD	53
Figura 4.7	Detecção de RNA viral em amostras de fígado de camundongos inoculados com o vírus FA 17DD	54
Figura 4.8	Detecção de RNA viral em amostras de baço de camundongos inoculados com o vírus FA 17DD	55
Figura 4.9	Curva padrão para quantificação absoluta da carga viral por qRT-PCR em uma etapa	56
Figura 4.10	Carga viral em soros de camundongos vacinados com 2×10^6 PFU do vírus 17DD	57
Figura 4.11	Curva padrão para quantificação absoluta da carga viral nas amostras de tecidos de camundongo por qRT-PCR em duas etapas	58
Figura 4.12	Curva padrão para quantificação absoluta do controle endógeno rRNA 18S	58
Figura 4.13	Quantificação normalizada de cópias de RNA viral na pele do local de inoculação com 2×10^6 PFU do vírus FA 17DD em camundongos.	60
Figura 4.14	Quantificação normalizada de cópias de RNA viral no linfonodo drenante do local da inoculação com 2×10^6 PFU do vírus 17DD em camundongos	61
Figura 4.15	Quantificação normalizada de cópias de RNA viral no fígado de camundongos inoculados com 2×10^6 PFU do vírus 17DD	62
Figura 4.16	Quantificação normalizada de cópias de RNA viral no baço de camundongos inoculados com 2×10^6 PFU do vírus 17DD	63
Figura 4.17	Quantificação não normalizada da carga viral no baço de camundongos inoculados com 2×10^6 PFU do vírus 17DD	64

Figura 4.18	Carga viral normalizada quantificada por qRT-PCR em todos os tecidos	65
Figura 4.19	Dosagem das transaminases (AST e ALT) no soro de camundongos	68
Figura 4.20	Detecção de citocinas pró-inflamatórias envolvidas com a resposta imune inata em amostras séricas de camundongos vacinados com o vírus FA 17DD	69
Figura 4.21	Detecção de citocinas mediadoras e reguladoras da resposta imune inata e adaptativa em camundongos vacinados com o vírus FA 17DD	70
Figura 4.22	Detecção de quimiocinas em amostras séricas de camundongos vacinados com o vírus FA 17DD	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Mutações comuns às sub-cepas atenuadas 17D-204 e 17DD comparadas à cepa Asibi	16
Tabela 3.1	Sequências e posições de anelamento dos “primers” utilizados na RT-PCR semi-nested	34
Tabela 3.2	Sequências e posições de anelamento dos “primers” e sonda utilizados na qRT-PCR	40
Tabela 3.3	Camundongos utilizados para dosagem de marcadores de função hepática e de citocinas	42
Tabela 4.1	Resultados em Ct da qRT-PCR em duas etapas para otimização da concentração de “primers”	45
Tabela 4.2	Resultados em Ct da qRT-PCR em uma etapa para otimização da concentração de “primers”	46
Tabela 4.3	Resultados em Ct da qRT-PCR para otimização da concentração de sonda	46
Tabela 4.4	Efeito da presença de RNA total sobre a quantificação de 10^4 cópias de RNA padrão	50
Tabela 4.5	Quantidades normalizadas obtidas por qRT-PCR para carga viral em cada amostra de soro de camundongos inoculados com 2×10^6 PFU do vírus 17DD	57
Tabela 4.6	Quantidades normalizadas obtidas por qRT-PCR para carga viral em cada amostra de pele de camundongos inoculados com 2×10^6 PFU do vírus 17DD	59
Tabela 4.7	Quantidades normalizadas obtidas por qRT-PCR para carga viral em cada amostra de linfonodo de camundongos inoculados com 2×10^6 PFU do vírus 17DD	60
Tabela 4.8	Quantidades normalizadas obtidas por qRT-PCR para carga viral em cada amostra de fígado de camundongos inoculados com 2×10^6 PFU do vírus 17DD	62
Tabela 4.9	Quantidades normalizadas obtidas por qRT-PCR para carga viral em cada amostra de baço de camundongos inoculados com 2×10^6 PFU do vírus 17DD	63

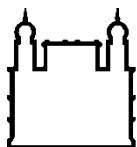
Tabela 4.10	Quantidades não normalizadas obtidas por qRT-PCR para carga viral em cada amostra de baço de camundongos inoculados com 2×10^6 PFU do vírus 17DD	64
Tabela 4.11	Comparação entre o número de amostras positivas detectadas por RT-PCR semi-nested e por qRT-PCR e o total obtido por ambas as técnicas	66
Tabela 4.12	Número de amostras positivas e negativas por RT-PCR semi-nested e qRT-PCR	66
Tabela 4.13	Resultados obtidos de todos os tecidos pelas técnicas de RT-PCR semi-nested (SN) e qRT-PCR (quantidades normalizadas)	67

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Histórico – A Febre Amarela e o desenvolvimento da vacina	1
1.2.	O Vírus Febre Amarela (FA)	4
1.2.1.	Características gerais	4
1.2.2.	Genoma e replicação viral	5
1.2.3.	Patogenicidade	10
1.2.4.	Ciclos de transmissão	11
1.2.5.	Epidemiologia	12
1.3.	A vacina FA 17D	13
1.3.1.	Histórico do desenvolvimento da vacina FA 17D	13
1.3.2.	Diferenças entre as vacinas	15
1.3.3.	Eventos adversos	17
1.3.4.	Imunidade	17
1.3.5.	Biodistribuição do vírus FA 17D	20
1.4.	Vacinas recombinantes	20
1.5.	Detecção e quantificação viral	22
1.6.	Modelos animais em febre amarela	24
1.7.	Justificativa	28
2.	OBJETIVOS	29
2.1.	Objetivo geral	29
2.2.	Objetivos específicos	29

3.	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1.	Células e vírus	30
3.1.1.	Titulação viral por contagem de placas de lise	30
3.1.2.	Controle de inóculo	31
3.2.	Animais	32
3.3.	Ensaio de detecção e quantificação da carga viral	32
3.3.1.	Desenho experimental	32
3.3.2.	Coleta das amostras de camundongos	33
3.3.3.	Extração de RNA	33
3.3.4.	RT-PCR semi-nested	34
3.3.5.	qRT-PCR	36
3.3.5.1.	Preparação do RNA padrão	37
3.3.5.2.	Quantificação da carga viral em tecidos	39
3.3.5.3.	Normalização	40
3.3.5.4.	Quantificação da carga viral em soro	41
3.4.	Ensaio para dosagem de marcadores de função hepática e citocinas séricas	42
3.4.1.	Inoculação de camundongos e coleta das amostras	42
3.4.2.	Dosagem de marcadores de função hepática	42
3.4.3.	Dosagem de citocinas séricas	43
4.	RESULTADOS	45
4.1.	Padronização dos testes de detecção e quantificação de RNA do vírus FA 17DD	45
4.1.1.	Otimização de “primers” e sonda	45
4.1.2.	Teste de sensibilidade da RT-PCR Semi-nested	47
4.1.3.	Teste de sensibilidade da qRT-PCR	48
4.2.	Detecção do RNA viral por RT-PCR semi-nested em amostras de soro e órgãos de camundongos vacinados	50

4.2.1.	Soro	50
4.2.2.	Pele	51
4.2.3.	Linfonodo drenante	52
4.2.4.	Fígado	53
4.2.5.	Baço	54
4.3.	Quantificação da carga viral por qRT-PCR em amostras de soro e órgãos de camundongos inoculados	56
4.3.1.	Soro	56
4.3.2.	Quantificação da carga viral em tecidos	57
4.3.2.1.	Pele	59
4.3.2.2.	Linfonodo drenante	60
4.3.2.3.	Fígado	61
4.3.2.4.	Baço	62
4.4.	Comparação entre os tecidos	64
4.5.	Comparação entre as técnicas	65
4.6.	Dosagem de marcadores de função hepática	68
4.7.	Dosagem de citocinas séricas	69
5.	DISCUSSÃO	71
5.1.	Aspectos técnicos	71
5.2.	O modelo murino para estudo do vírus FA vacinal	75
5.3.	Biodistribuição do vírus FA 17D	77
5.4.	Avaliação da função hepática pós-vacinação	79
5.5.	Perfil de citocinas	80
6.	CONCLUSÃO	83
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

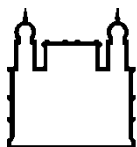
Estudo sobre a infecção do vírus da Febre Amarela vacinal em camundongo

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Noemia Santana Lima

A Febre Amarela, uma doença causada por um representante do gênero Flavivírus, é caracterizada principalmente por grave injúria hepática que pode levar ao óbito. Há 70 anos, esta doença tem sido controlada por uma vacina constituída do vírus atenuado cepa 17D, que apresenta raríssimos casos de efeitos adversos. O vírus vacinal exibe replicação limitada no hospedeiro, porém com significativa disseminação da massa viral, levando a uma resposta imune forte e de longa duração. Devido a estas qualidades, o uso do vírus FA 17D como um vetor de expressão mostra-se atraente para desenvolvimento de novas vacinas humanas. Apenas recentemente a vacina contra a febre amarela vem sendo estudada para esclarecimento dos mecanismos da imunidade gerada pelo vírus 17D e pouco é sabido sobre o tropismo e sítios de proliferação viral. Este trabalho investigou o potencial proliferativo do vírus FA 17D como modelo para o estudo de outros vírus recombinantes produzidos no laboratório, com o objetivo de caracterizar o grau de dispersão viral em diferentes órgãos. Para tanto, camundongos isogênicos (BALB/c) foram inoculados por via subcutânea na região dorsal com 10^5 ou 2×10^6 PFU do vírus 17DD. Após 1, 2, 4, 7 e 11 dias foram colhidos o soro, a pele do sítio de inoculação, os linfonodos drenantes, o fígado e o baço para detecção do RNA viral por RT-PCR semi-nested e quantificação da carga viral por qRT-PCR. Verificou-se que com a dose maior mais camundongos apresentaram RNA viral nos órgãos e o vírus atingiu fígado e baço mais precocemente, sendo detectado também no soro a partir do 1º dia pós-inoculação. Pele e linfonodo drenante do local da inoculação parecem ser sítios de replicação primária, onde o RNA viral foi detectado nos primeiros dias de infecção, com queda da carga viral após o 7º dia. Foram dosados alguns marcadores de função hepática (AST, ALT e bilirrubina) para verificar se a imunização com o vírus 17DD poderia induzir disfunções ou lesões hepáticas, porém os resultados não mostraram diferença significativa entre o grupo vacinado e o grupo controle, mostrando que a vacina não afeta o funcionamento do fígado. Tentamos ainda avaliar alterações no perfil de citocinas séricas após imunização com o vírus 17DD através do ensaio de detecção múltipla, porém a técnica não foi sensível o suficiente para detectar qualquer alteração. O modelo estabelecido neste trabalho poderá servir como base de comparação para avaliação de novos candidatos vacinais constituídos de vírus FA recombinantes.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Estudo sobre a infecção do vírus da Febre Amarela vacinal em camundongo

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Noemia Santana Lima

The Yellow Fever, a disease caused by a virus of the genus Flavivirus, is mainly characterized by severe liver injury that can lead to death. For 70 years, this disease has been controlled by a vaccine consisting of attenuated virus strain 17D, which features rare cases of adverse effects. The vaccine virus shows limited replication in the host, but with significant spread of the viral mass, leading to a strong and long lasting immune response. Because of these qualities, the use of FA 17D virus as an expression vector has been attractive for developing new human vaccines. Only recently the vaccine against yellow fever has been studied to elucidate mechanisms of immunity activated by FA 17D virus and little is known about viral tropism and its sites of proliferation. This study investigated the proliferative potential of FA 17D virus as a model for studying other recombinant viruses produced in the laboratory with the aim of characterizing the degree of viral spread in different organs. Inbred mice (BALB/c) were inoculated subcutaneously in the dorsal region with 10^5 or 2×10^6 PFU of 17DD virus. After 1, 2, 4, 7 and 11 days, we harvested serum, the skin of the inoculation site, draining lymph node, liver and spleen for detection of viral RNA by semi-nested RT-PCR and viral load quantification by qRT-PCR. It was found that with higher doses it is possible to detect more viral RNA in organs. Hence, since the first day post-vaccination, we could detect the virus in liver, spleen and serum. Furthermore, skin and draining lymph node of the site of inoculation seem to be primary sites of replication, where the viral RNA was detected in the first days of infection, with a drop in viral load after 7 days. We measured some markers of liver function (AST, ALT and bilirubin) to verify if the immunization with 17DD virus could induce dysfunction or liver injury, but the results showed no significant difference between vaccinated and control groups, showing that the vaccine does not affect liver function. We also tried to evaluate changes in serum cytokine profile after immunization with 17DD virus by multiple detection assay, but the technique was not sensitive enough to detect any change. The model established in this work can serve as a basis of comparison for evaluation of new recombinant YF 17D virus vaccine candidates.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico – A Febre Amarela e o desenvolvimento da vacina

A febre amarela foi uma das doenças mais temidas pela população ocidental no século XIX, quando acometeu grande parte da população durante epidemias, que ocorriam principalmente em regiões portuárias. Era conhecida popularmente como o “mal amarelo” ou “yellow Jack” devido à icterícia pronunciada apresentada pelos doentes, que desenvolviam quadros de febre hemorrágica, com altas taxas de mortalidade. A descrição mais antiga da febre amarela data de 1648, encontrada em um manuscrito Maia (1, 2). Foi reconhecida como doença nas Américas e chamada de “doença do Novo Mundo”, recebendo o nome "Febre Amarela" por Griffin Hughes que utilizou este termo para designá-la em "História Natural dos Barbados" em 1750 (2). Por mais de dois séculos a febre amarela foi uma das maiores pragas da humanidade. Pouco se sabia sobre a doença, apenas observava-se que era endêmica nas regiões tropicais das Américas e África, enquanto sérias epidemias ocorriam longe dessas regiões, como na costa dos EUA e países da Europa como Espanha, França, Inglaterra, e Itália (Figura 1.1). Observava-se também que sua transmissão não ocorria diretamente de pessoa a pessoa e que indivíduos que se recuperavam da doença ficavam protegidos de maneira permanente contra esta doença, mas não se conhecia seu agente etiológico.

No início do século XX, uma comissão investigadora norte-americana presidida pelo cientista Walter Reed foi enviada a Cuba para estudar a febre amarela. Na época, alguns cientistas haviam isolado o *Bacillus icteroides* de pacientes com febre amarela, e acreditava-se ser este o agente causador da doença. Porém Reed demonstrou que este era apenas um agente secundário e descobriu que a doença era causada por um agente filtrável, excluindo-se assim agentes bacterianos, além de confirmar a teoria de Carlos Finlay de que a transmissão da febre amarela ocorria através da picada de mosquitos (3-5). Iniciou-se, portanto, uma campanha de exterminação de mosquitos, que obteve grande sucesso na erradicação da febre amarela em Havana, Cuba. A Fundação Rockefeller então criou uma comissão para pesquisar e erradicar a doença em focos-chaves, enviando expedições para regiões endêmicas da América do Sul e África. Hideyo Noguchi, membro desta comissão, cometeu novamente o erro de confundir o

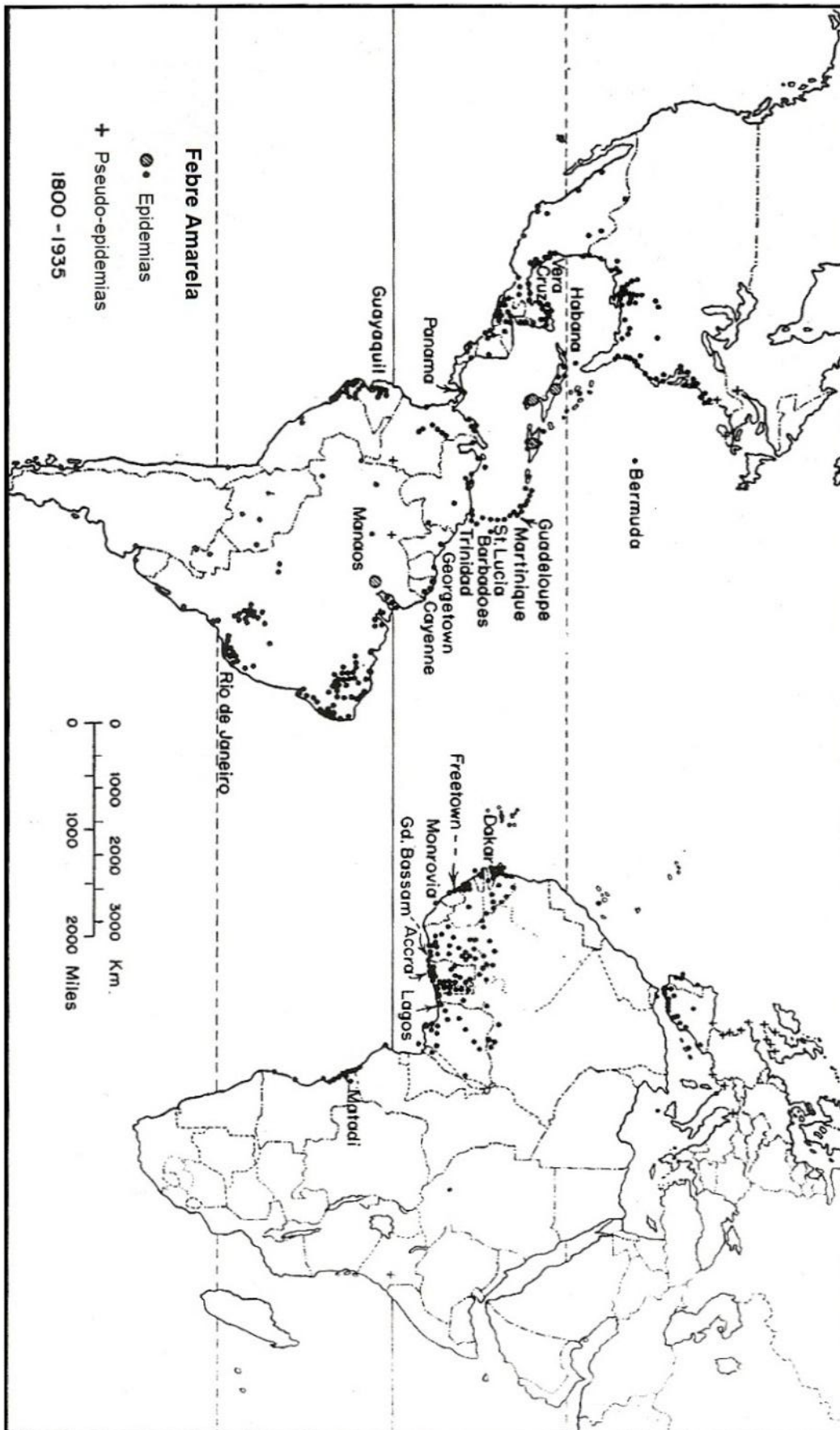


Figura 1.1: Focos de epidemias de Febre Amarela entre 1800 e 1935 (6).

agente etiológico, descrevendo-o como *Leptospira icteroides*, e por ser ele um grande bacteriologista, foi acreditado por muitos pesquisadores da época (5).

O progresso nas pesquisas era prejudicado pela ausência de um modelo animal que desenvolvesse a doença. Após várias tentativas, sem êxito, de encontrar um modelo animal adequado, em 1927, o sangue de um indivíduo africano, chamado Asibi, que sofria de uma forma branda da febre amarela, foi inoculado em macacos rhesus (*Macaca mulatta*, uma espécie de macaco importado da Índia), que se mostrou suscetível à infecção (7). Após este evento, conseguiu-se confirmar o erro de Noguchi e foi descoberto o vírus causador da Febre Amarela (6). A cepa viral selvagem isolada desta forma foi denominada Asibi. Max Theiler conseguiu ainda propagar esta cepa viral por inoculação intracerebral em camundongos (6, 8), demonstrando que após várias passagens do vírus neste sistema, ele se tornava mais neurotrópico e menos viscerotrópico quando inoculado novamente em macacos rhesus (6, 9).

A descoberta do ciclo silvestre do vírus da Febre Amarela envolvendo macacos como hospedeiros e mosquitos vetores *Aedes aegypti* e outras espécies silvestres (6, 10) legitimou a importância da existência de uma vacina para controlar a doença na população, pois o seu controle através da erradicação dos vetores seria bastante complicado. Theiler juntou-se, então, à comissão da Fundação Rockefeller para o desenvolvimento da vacina contra a febre amarela. Em paralelo, o Instituto Pasteur isolou o vírus de outro indivíduo infectado, criando a cepa Francesa, que também foi propagada em cérebro de camundongos na tentativa de atenuar o vírus para desenvolver uma vacina. A primeira vacina de vírus atenuado utilizada para a prevenção da febre amarela, principalmente entre os pesquisadores que trabalhavam com o vírus, era derivada da cepa Francesa, após 100 passagens do vírus em cérebro de camundongos. Embora atenuado, o vírus apresentava elevado neurotropismo, causando encefalite, e por isso passou a ser inoculado juntamente com soro humano imune para febre amarela (5). Esta vacina passou a ser o padrão adotado pela Fundação Rockefeller durante algum tempo, porém devido à utilização de soro humano, sua produção era limitada e pouco segura. Na tentativa de desenvolver uma vacina mais segura, Theiler experimentou a técnica de atenuação viral utilizada por Louis Pasteur para o desenvolvimento da vacina anti-rábica, em que o vírus é sucessivamente cultivado em células de camundongos e em embriões de galinha desnervados e percebeu que o vírus da cepa Asibi, após 100 subcultivos

em embriões desprovidos de tecido nervoso, apresentava neurotropismo reduzido e se tornara incapaz de produzir lesões viscerais em macacos *rhesus* (5, 11-13). Testes em animais mostraram que este vírus atenuado por mutações casuais sucessivas era seguro e imunogênico e que poderia ser utilizado para imunização em humanos, originando a vacina composta pelo vírus atenuado chamado 17D (5, 12, 13). Em 1937, iniciaram-se no Brasil os testes de campo da vacina, que era produzida em ovos embrionados (5). Os testes foram bem sucedidos e se estenderam para outros países da América do Sul. Após alguns casos de encefalite em indivíduos vacinados com um mesmo lote da vacina, foi implantado o sistema de “lote semente”, em que todos os lotes de vacinas seriam derivados de um grande lote original, evitando-se múltiplos subcultivos do vírus, que poderiam acarretar em mutações que gerassem variantes potencialmente mais virulentas (5, 14, 15). Até o final da Segunda Guerra Mundial a vacina 17D e a vacina neurotrópica Francesa eram utilizadas em larga escala, porém a ocorrência de diversos casos de encefalite em crianças após a administração da vacina neurotrópica Francesa levou à paralisação da sua produção. As vacinas hoje concedidas pela Organização Mundial de Saúde para imunização da população são todas derivadas de duas sub-cepas da vacina 17D, a 17DD e a 17D-204, obtidas no Instituto Rockefeller, EUA (5).

A história da pesquisa sobre o vírus da febre amarela é marcada por várias tragédias de infecções experimentais e acidentais em laboratórios. Em uma época em que as precauções de biossegurança não existiam e os riscos eram pouco conhecidos, inoculações de vírus em humanos eram praticadas deliberadamente. Além das infecções experimentais, trabalhos com o vírus em laboratórios acarretaram em 38 pesquisadores infectados, dos quais 8 morreram de febre amarela (15, 16).

1.2. O Vírus Febre Amarela (FA)

1.2.1. Características gerais

O vírus Febre Amarela é um membro da família *Flaviviridae*, incluído no gênero *Flavivirus*, que compreende cerca de 70 vírus, dentre eles Dengue, Vírus do Oeste do Nilo e Vírus da Encefalite Japonesa. É um vírus pequeno (aproximadamente 50 nm de diâmetro), envelopado, de simetria icosaédrica. A

maioria dos flavivírus é transmitida por artrópodes, onde é capaz de se replicar, o que representa uma importante fase do ciclo do vírus. Os flavivírus humanos são causadores de patologias complexas e diversificadas, apresentando diferentes tropismos tissulares. Muitos são neurotrópicos, causando encefalite, outros como o da Dengue, se replicam preferencialmente em macrófagos, enquanto o da Febre Amarela é, predominantemente, viscerotrópico (17).

1.2.2. Genoma e replicação viral

O sequenciamento completo do genoma do vírus Febre Amarela, publicado em 1985 (18), dá indícios de que este vírus evoluiu de outros vírus transmitidos por mosquitos há cerca de 3000 anos, surgindo provavelmente na África de onde foi importado para a América do Sul durante o tráfico de escravos (19, 20). Seu genoma é composto por RNA fita simples, de polaridade positiva. Contém um total de 10862 nucleotídeos, dos quais 10233 compõem uma única fase de leitura aberta flanqueadas por duas regiões não codificantes: 5'NCR e 3'NCR (Figura 1.2a). Estas regiões não codificantes contêm os promotores para a síntese das fitas positiva (RNA genômico) e negativa (intermediária de replicação) de RNA e possuem sequências complementares importantes para a ciclização do genoma viral durante a montagem e a replicação. Portanto, mutações ou deleções nestas regiões afetam a replicação viral e sua virulência (2).

A fase de leitura aberta codifica uma única poliproteína de 3411 aminoácidos, que é sintetizada associada à membrana do retículo endoplasmático da célula hospedeira, atravessando-a em vários pontos, e é clivada na porção citoplasmática por uma protease viral e no lúmen por enzimas celulares (Figura 1.2b). Este processamento resulta em 3 proteínas estruturais (C – capsídeo, prM – pré-membrana e E – envelope), que são incluídas na montagem do vírion, e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), responsáveis pela replicação viral e pelo processamento da poliproteína (Figura 1.2a e 1.2b) (2, 19).

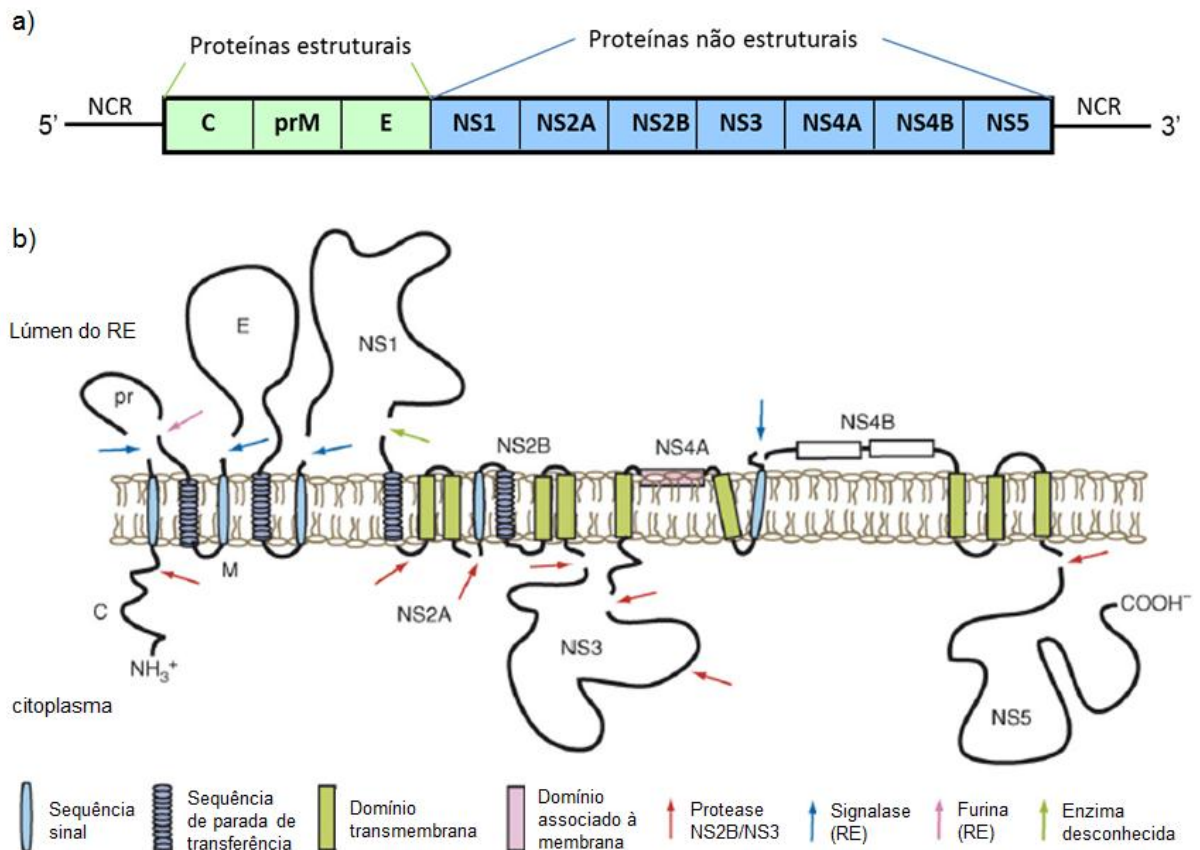


Figura 1.2: Esquema sobre a organização dos genes e das proteínas dos flavivírus. a) Genoma viral contendo genes codificantes para proteínas estruturais (C, PrM e E) em verde e não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) em azul; NCR = região não codificante. b) Topologia da poliproteína precursora viral em relação à membrana do retículo endoplasmático e seu processamento por enzimas virais (protease NS2B/NS3 – setas vermelhas) na face citoplasmática e enzimas celulares (signalase – setas azuis; furina – seta rosa; e enzima desconhecida – seta verde) no lúmen do retículo. Figura modificada de Perera R. e Kuhn R. 2008 (21).

Os flavivírus penetram na célula hospedeira através da adsorção a receptores celulares e são endocitados em vesículas cobertas de clatrina. A acidificação do meio no interior do endossomo promove uma mudança de conformação na proteína de envelope (E) viral, que resulta na fusão da bicamada lipídica do envelope com a membrana do endossoma e consequente liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular. O nucleocapsídeo então se desorganiza e a proteína de capsídeo (C) se dissocia da molécula de RNA, que é liberada no citoplasma e, por ter polaridade positiva, é reconhecida como RNA mensageiro e traduzida para sintetizar a poliproteína precursora viral (Figura 1.2b) (22). Após o processamento da poliproteína precursora, a maioria das proteínas não estruturais se associa para formar um “complexo replicativo”, que consiste na união de todos os elementos necessários para a replicação do RNA viral (Figura 1.3) (23).

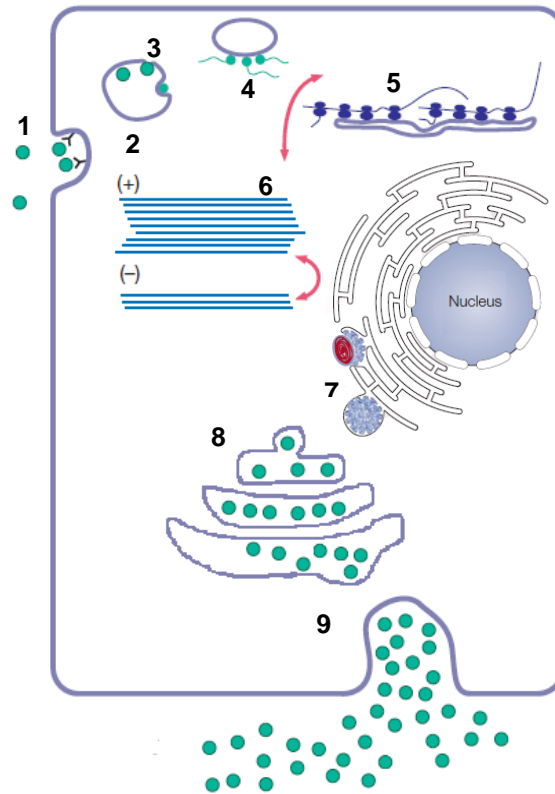


Figura 1.3: Etapas do ciclo de replicação dos flavivírus; 1) Adsorção; 2) Endocitose mediada por receptor; 3) Fusão à membrana dependente de baixo pH; 4) Desnudamento; 5) Tradução e processamento da poliproteína; 6) Replicação do RNA no interior de vesículas do complexo replicativo; 7) Montagem do vírion no retículo endoplasmático; 8) Transporte para o Golgi e maturação do vírion; 9) Fusão da vesícula à membrana plasmática e liberação de novos vírions. Figura modificada de Monath T.P. *et al* 2008 (2).

Tem sido demonstrado que a replicação dos flavivírus induz um rearranjo de membranas intracelulares, derivadas do retículo endoplasmático, que resultam na formação de estruturas vesiculares que envolvem o complexo replicativo, criando um ambiente protegido contra mecanismos de defesa da célula capazes de reconhecer o RNA viral através de receptores tipo Toll (TLRs) e proteínas como RIG-1 e MDA5. Além disto, estas vesículas fornecem um espaço confinado que reúne a polimerase viral e demais proteínas do complexo replicativo para que elas possam atuar em conjunto. No interior destas vesículas, o RNA genômico viral é transcrito em uma fita de RNA complementar, de polaridade negativa, que serve de molde para a síntese de várias cópias de RNA genômico, que se acumulam nas vesículas até a montagem do vírion (24, 25).

A glicoproteína NS1 interage com NS4A e parece participar do complexo replicativo, desempenhando um papel essencial na replicação viral e promovendo o

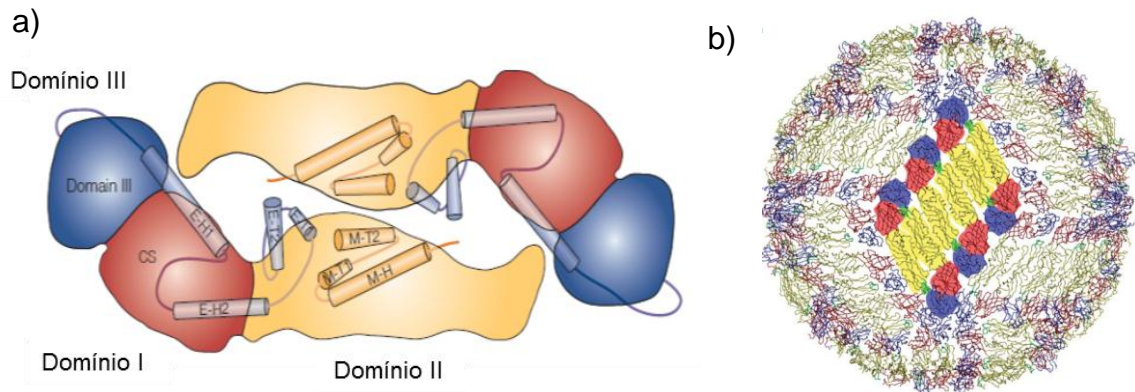
acúmulo de RNA viral nas vesículas (26, 27). Além de se localizar nas vesículas do complexo replicativo, a NS1 é secretada no meio extracelular e é expressa na superfície de células infectadas, podendo ser reconhecida por anticorpos fixadores de complemento (28). A NS2A é uma pequena proteína hidrofóbica que participa do “complexo replicativo”, interagindo com NS3, NS5 e a região não codificante 3’, e parece desempenhar função crítica na montagem ou liberação de vírions, pois mutações no seu gene mostrou prejudicar a produção de novas partículas virais (29, 30). Além disto a NS2A parece inibir a produção de IFN- β , atuando como um mecanismo de evasão da resposta imune inata do hospedeiro (31). A proteína NS3 e seu cofator NS2B formam a protease viral, que cliva a poliproteína precursora em vários locais na face citoplasmática da membrana do retículo endoplasmático (Figura 2b). Além disto, a NS3 atua como helicase e trifosfatase de nucleosídeo (NTPase), atividades essenciais para a replicação do genoma viral. Por desempenhar funções tão importantes para a replicação viral, o gene da proteína NS3 é bem conservado entre os flavivírus (2). As proteínas NS4A e NS4B são hidrofóbicas e se associam às membranas do retículo endoplasmático (ou das vesículas do complexo replicativo). Foi demonstrado, em outros flavivírus, que a NS4A desempenha importante papel no rearranjo de membranas para a formação das vesículas do complexo replicativo, além de interagir com NS1, NS3 e NS5, sendo essencial para a replicação viral (32-34). NS4B é encontrada no núcleo e parece inibir as vias de sinalização para a produção de interferons tipo I (32, 35). A proteína NS5 é a maior proteína viral (103 kDa) e seu gene é o mais bem conservado entre os flavivírus. Constitui a RNA polimerase RNA-dependente e possui função de metiltransferase, metilando uma estrutura “cap” na extremidade 5’ do RNA viral (2).

Foi recentemente demonstrado que as vesículas do complexo replicativo possuem poros abertos que dão continuidade com o citoplasma (25). Assim, após a replicação, o RNA genômico viral acumulado nestas vesículas é liberado no citoplasma através destes poros e se associa a ribossomos na superfície do retículo endoplasmático rugoso, onde é traduzido para gerar a poliproteína precursora, associado a estruturas membranares chamadas “membranas convolutas” (derivadas do retículo endoplasmático), que são induzidas pela replicação viral (24, 36). Durante a síntese da poliproteína precursora, a proteína C se localiza na face citoplasmática das membranas convolutas do retículo, ancorada à membrana

através de uma porção hidrofóbica, que serve de sequência sinal para translocação da proteína prM para o lúmen do retículo, que por sua vez também possui domínios transmembrana que servem como sequência de parada de transferência e de sequência sinal para translocação da proteína E para o lúmen do retículo (Figura 1.2b) (22). Após o processamento proteolítico da poliproteína, a proteína C, formada no citoplasma, empacota o RNA genômico viral, formando o nucleocapsídeo. Enquanto isto, no lúmen do retículo, as glicoproteínas prM e E se organizam em heterodímeros estáveis, associados à membrana, que envolvem a estrutura do nucleocapsídeo, fazendo-o brotar para dentro do retículo. Durante este brotamento, o vírion adquire seu envelope, que consiste numa bicamada lipídica proveniente da membrana do retículo com as glicoproteínas prM e E nela inseridas (22, 36). A partícula viral envelopada é então transportada para o Golgi, na sua forma imatura, não infecciosa (Figura 1.3). No interior das cisternas do Golgi ocorre a maturação da partícula viral, que consiste na clivagem da proteína prM por uma protease celular do tipo furina, que resulta na liberação de sua porção mais longa (o peptídeo “pr”) para o exterior da célula, enquanto uma pequena proteína (M) permanece ancorada no envelope viral. O vírion é transportado, através de vesículas do trans-golgi, para a membrana celular e exocitado na sua forma madura (Figura 1.3) (2). A função da proteína prM é estabilizar a proteína E até o momento da exocitose do vírion, protegendo seu peptídeo de fusão para impedir sua exposição em função do pH ácido das vesículas do trans-golgi. Após a maturação, o vírion é capaz de promover a fusão do seu envelope com membranas lipídicas, tornando-se, portanto, infeccioso (21).

A proteína E, principal glicoproteína do envelope, contém um domínio transmembrana e um ectodomínio, que cobre a maior parte da superfície do vírion, em forma de homodímeros (Figura 1.4). Imagens de cristalografia de raio-X sugerem que o ectodomínio da proteína E está organizada em 3 domínios: dI) domínio central contendo 8 fitas β -pregueadas; dII) região contendo dois loops alongados que se estendem lateralmente, responsáveis pela dimerização, e um peptídeo de fusão responsável pela internalização do vírus; dIII) domínio do tipo imunoglobulina que contém o sítio de ligação a receptores celulares e epítomos para anticorpos neutralizantes específicos, que diferenciam os flavivírus imunologicamente (22). Por exercer importantes funções biológicas como ligação aos receptores celulares, internalização por fusão de membrana, além de ter propriedade hemaglutinante e

ser o principal alvo de anticorpos neutralizantes, a proteína E desempenha importante papel no tropismo tissular, virulência e imunidade (2, 37, 38).



1.2.3. Patogenicidade

O vírus Febre Amarela pode causar desde infecções subclínicas até casos graves de sepse viral sistêmica. Após um período de incubação de 3-6 dias os sintomas da febre amarela se manifestam abruptamente com febre alta e dores de cabeça. O paciente apresenta alta viremia e a doença pode progredir com sintomas como mialgia, fotofobia, artralgias, dor epigástrica, anorexia, vômito e icterícia. Casos mais graves podem levar a grave injúria hepática, renal e miocárdica, com manifestações hemorrágicas que podem levar ao choque e à morte, chegando a 50% de mortalidade (39).

O fígado é o principal órgão atingido e o dano causado pela infecção causa elevação das transaminases séricas (aspartato aminotransferase – AST, elevada também pelo dano no miocárdio; e alanina aminotransferase – ALT) e a liberação de pigmentos amarelados de bile no sangue, resultando na icterícia característica da febre amarela. Estudos sobre a patogenia da doença em macacos mostram que, durante as primeiras 24 h pós-inoculação, células de Kupffer (macrófagos do fígado) são infectadas, seguidas pela infecção de linfonodos, baço, rim e medula óssea. A infecção de hepatócitos ocorre mais tardiamente, causando dano por morte celular (principalmente por apoptose), esteatose e infiltrado inflamatório discreto (40, 41). A

lesão se concentra na região mediozonal do fígado, incluindo células em volta da veia central e porta (19). A morte celular é atribuída a efeitos diretos da replicação viral, como evidenciado pela detecção de antígenos virais por imunohistoquímica e de RNA viral por RT-PCR, e também a efeitos citolíticos da resposta imune celular (40, 41).

1.2.4. Ciclos de transmissão

Existem três diferentes ciclos de transmissão da febre amarela (Figura 1.5). O ciclo urbano envolve a transmissão do vírus entre pessoas através da picada do mosquito *Aedes aegypti*, enquanto no ciclo silvestre o vírus é transmitido por várias espécies de mosquito (*Aedes hemagogus* na África e *Haemagogus spp.* e *Sabethes spp.* nas Américas) com o hospedeiro principal sendo primatas não humanos. Nesse caso, humanos são infectados acidentalmente ao entrar na floresta. Na África existe ainda um ciclo intermediário (nas savanas) que envolve a transmissão do vírus, através de mosquitos do gênero *Aedes*, para humanos que habitam ou trabalham em regiões próximas a florestas. Em todos os ciclos, o vírus é mantido na natureza durante as estações secas do ano através da transmissão vertical entre mosquitos. Os ovos eclodem na época de chuvas liberando a progênie de mosquitos infectados (19, 39).

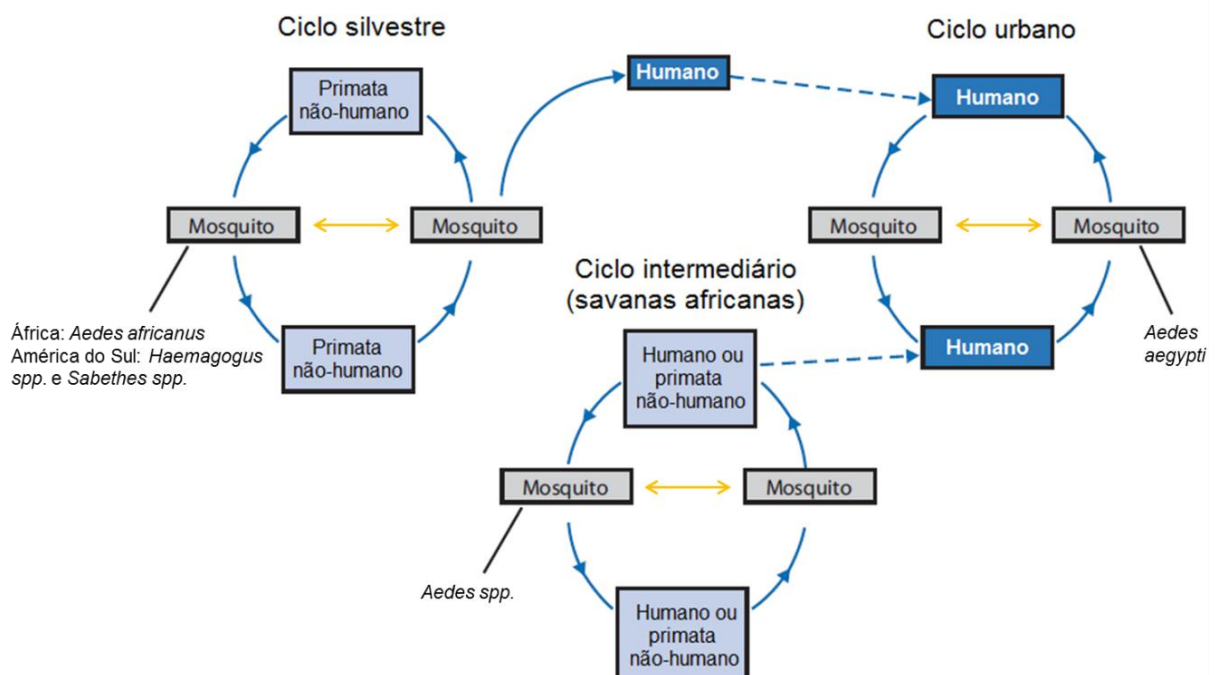


Figura 1.5: Ciclos de transmissão do vírus Febre Amarela entre os seus hospedeiros e vetores (setas

azuis). As setas amarelas indicam a transmissão transovariana entre mosquitos. Figura modificada de Staples 2010 (39).

1.2.5. Epidemiologia

Apesar de surtos epidêmicos de Febre Amarela terem ocorrido na América do Norte e Europa até início do século XX, não se tem relatos de casos nesses locais há várias décadas. Áreas endêmicas estão restritas às regiões tropicais da América do Sul e África subsaariana (Figura 1.6). A maioria dos casos ocorre por transmissão silvestre ou pelo ciclo intermediário, embora o ciclo urbano também ocorra periodicamente na África e esporadicamente na América do Sul (39).

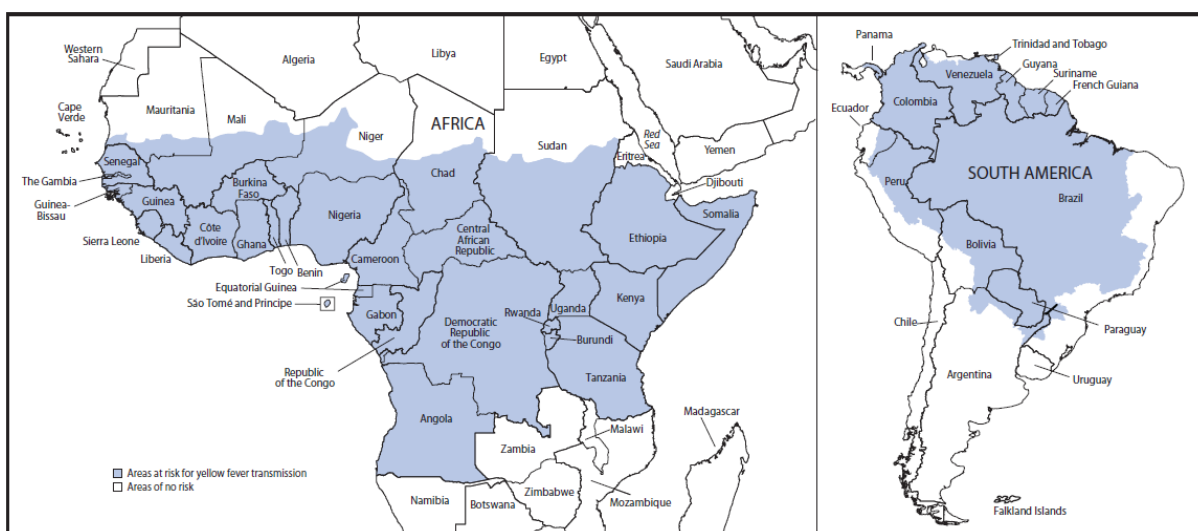


Figura 1.6: Áreas endêmicas da Febre Amarela na África e América do Sul (39).

A Organização Mundial de Saúde estima que ocorra 200.000 casos de febre amarela com 30.000 mortes a cada ano, embora a maioria dos casos de doença e morte não seja relatada devido à sua natureza rural predominante (39).

Na África, o número de casos relatados varia substancialmente a cada ano, de 1 a 5.000 casos. Nas últimas décadas, aproximadamente 500 casos têm sido relatados anualmente na América do Sul, principalmente entre homens que trabalham em áreas de florestas. A maioria dos casos é relatada em regiões de bacias hidrográficas do Rio Amazonas, Araguaia e Orinoco. Peru e Bolívia apresentam a maior incidência cumulativa de febre amarela nos últimos 20 anos. No Brasil, apesar das áreas endêmicas estarem na região noroeste, alguns casos foram identificados em algumas cidades de São Paulo, Rio Grande do Sul e Goiás a partir

de 2007. Na mesma época, áreas contíguas com o sul do Brasil no norte da Argentina e Paraguai também tiveram casos confirmados de febre amarela, representando a primeira reemergência do vírus nessas regiões desde 1970. Além da expansão da zona endêmica de febre amarela nos últimos anos, também ocorreu a reinfestação pelo mosquito *Aedes aegypti* em vários centros urbanos na América do Sul, aumentando o risco de surtos urbanos de febre amarela (39).

1.3. A vacina FA 17D

A introdução de programas de vacinação contra febre amarela a partir de 1937 reduziu drasticamente a incidência desta doença, transformando a maior praga da humanidade em uma doença rara por volta do final da II Guerra Mundial, o que atribuiu o prêmio Nobel a Max Theiler em 1951. Apesar deste sucesso, durante os últimos 20 anos, a ausência de programas de vacinação eficientes resultou no reaparecimento da doença. Em 1988 a OMS-UNICEF recomendou a inclusão da vacina de febre amarela nos programas de imunização infantis de rotina nos países com risco da doença e iniciou campanhas de vacinação em massa (42). No Brasil, o Ministério da Saúde, através do Programa Nacional de Imunizações, recomenda que a vacina seja aplicada a partir dos nove meses de vida, com reforço de 10 em 10 anos, especialmente para a população que vive ou vai viajar para as regiões endêmicas (43, 44).

Atualmente existem 3 produtores da vacina contra Febre Amarela qualificados pela Organização Mundial de Saúde: Sanofi Pasteur (França), Bio-Manguinhos (Brasil) e Institut Pasteur Dakar (Senegal). Todos utilizam lotes sementes derivados das subcepas do vírus FA 17D, e produzem a vacina em ovos embrionados de galinha. A Organização Mundial de Saúde estabelece padrões de segurança e potência que regulamentam a produção destas vacinas. O produtor brasileiro, Bio-Manguinhos, utiliza a subcepa 17DD e está entre um dos grandes produtores da vacina, produzindo grandes quantidades para uso nacional e para o Programa Expandido de Imunização (*Expanded Programme on Immunization – EPI*) (2, 45).

1.3.1. Histórico do desenvolvimento da vacina FA 17D

A cepa vacinal FA 17D foi obtida empiricamente através de passagens seriadas do vírus parental Asibi, primeiramente isolado de um caso clínico (Figura

1.7). Após 54 passagens em macacos rhesus, por transferência direta de sangue ou por picadas do mosquito *Aedes aegypti*, o vírus foi cultivado *in vitro* em tecidos de embriões de camundongos. Após 18 passagens neste sistema, o vírus foi passado 58 vezes em tecidos macerados de embriões de galinha inteiros, quando então se iniciou a série de subcultivos chamada 17D. As subcepas 17DD e 17D-204 foram obtidas por 195 e 204 passagens, respectivamente, em tecidos macerados de embriões de galinha dos quais o cérebro e a medula espinhal haviam sido retirados. Antes da inoculação em humanos, foram feitas passagens adicionais em ovos embrionados, onde a vacina é produzida atualmente, em esquema de “lotes sementes” (2).

O vírus 17DD foi mandado pela Fundação Rockefeller para o Brasil na passagem 229, e foi cultivado em tecidos macerados de embriões de galinha até a 243ª passagem, quando foi transferido para ovos embrionados. Lotes sementes primários e secundários foram preparados no Brasil nas passagens 284 e 285, e atualmente a vacina produzida por Bio-Manguinhos está na passagem 287-289. Todos os outros produtores da vacina utilizam a subcepa 17D-204, que está no estágio entre 235-240 passagens (45).

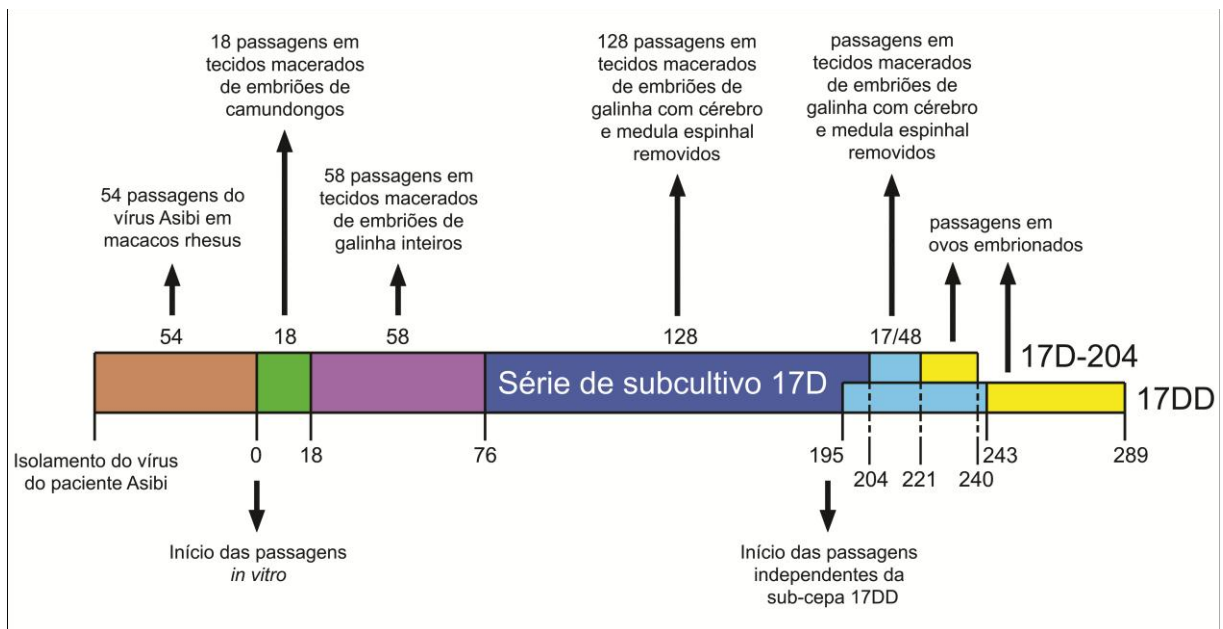


Figura 1.7: Histórico de passagens da cepa viral Asibi para obtenção das subcepas vacinais 17D-204 e 17DD. Figura modificada de Monath 2008 (2).

As passagens seriadas do vírus FA, em diferentes sistemas de cultivo, acarretaram na perda do viscerotropismo, redução do neurotropismo e perda da

capacidade do vírus se replicar em mosquitos, resultando no fenótipo viral atenuado devido ao acúmulo de mutações ocorridas ao acaso (2).

1.3.2. Diferenças entre as vacinas

As vacinas atualmente produzidas diferem da cepa original 17D quanto ao nível de passagem e quanto à formulação do componentes adicionais como estabilizantes, sais e o diluente usado para reconstituir o vírus liofilizado, embora apresentem performance biológica semelhante, ou idêntica, com relação ao nível de soroconversão, qualidade da resposta imune, duração da imunidade, segurança e tolerabilidade. Além disto, as vacinas não são compostas por um único clone viral, mas são uma mistura heterogênea de múltiplas subpopulações virais. Contudo, não há evidências de que estas variações afetem a segurança e a eficácia da vacina, pelo contrário, tem sido proposto que o sucesso na eficácia desta vacina seja, em parte, devido a esta heterogeneidade de subpopulações virais (46).

As subcepas 17DD e 17D-204 podem ser diferenciadas por anticorpos monoclonais, indicando a presença de variações antigênicas na proteína E. Diferenças antigênicas também têm sido identificadas entre vacinas produzidas a partir do vírus 17D-204 por diferentes produtores (2). Comparações em nível de sequência nucleotídica e de aminoácidos entre o vírus vacinal 17DD, produzido no Brasil, e o 17D-204, produzido em outros países, revelam que o vírus 17DD possui menos mudanças na sequência nucleotídica e aminoácidos acumuladas durante o processo de desenvolvimento e atenuação viral, mostrando que o vírus 17DD é mais estável geneticamente. Estas diferenças encontradas entre os vírus vacinais não parecem estar relacionadas à atenuação, uma vez que ambos são atenuados e que uma ou outra subcepa apresenta resíduos idênticos aos da cepa parental Asibi (2, 47).

Comparações das sequências genômicas do vírus atenuado 17D com o vírus parental Asibi identificaram 68 mudanças nucleotídicas, resultando em alterações de 32 aminoácidos (48). Porém quando comparadas as sequências das subcepas 17DD e 17D-204 com a cepa Asibi, o número de mutações que potencialmente contribuem para o fenótipo atenuado reduz para 48 nucleotídeos, codificando 20 substituições de aminoácidos (Tabela 1.1) (47). Estas alterações não estão

dispersas aleatoriamente no genoma viral, mas concentram-se nas regiões das proteínas E, NS2A e na região não codificante 3' (2, 49).

Nucleotídeo	Gene	Amino ácido	Asibi	17D-204 e 17DD
854	M	36	Leu	Phe
1,127	E	52	Gly	Arg
1,482		170	Ala	Val
1,491		173	Thr	Ile
1,572		200	Lys	Thr
1,870		299	Met	Ile
1,887		305	Ser	Phe
2,112		380	Thr	Arg
2,193		407	Ala	Val
3,371	NS1	307	Ile	Val
3,860	NS2a	118	Met	Val
4,007		167	Thr	Ala
4,022		172	Thr	Ala
4,056		183	Ser	Phe
4,505	NS2b	109	Ile	Leu
6,023	NS3	485	Asp	Asn
6,876	NS4a	146	Val	Ala
7,171	NS4b	95	Ile	Met
10,142	NS5	836	Glu	Lys
10,338		900	Pro	Leu
10,367	(3' NCR)		U	C
10,418			U	C
10,800			G	A
10,847			A	C

Tabela 1.1: Mutações comuns às subcepas atenuadas 17D-204 e 17DD comparadas à cepa Asibi (2).

Embora essas mutações sejam importantes para a alteração das funções destas proteínas, não é possível determinar com precisão quais mutações são responsáveis pela redução da virulência das cepas vacinais. Mutações na proteína E têm revelado alterações na neurovirulência em camundongos e macacos (50-52). Redução do viscerotropismo e aumento do neurotropismo têm sido atribuídos a mutações no domínio III da proteína E (37, 38), bastante coerente com sua função de ligação a receptores celulares. No entanto, a atenuação viral é provavelmente resultado da combinação de várias mutações, acumuladas por mais de 230 passagens do vírus Asibi em diversos sistemas de propagação, que podem estar relacionadas a propriedades virais como tropismo celular, eficiência de replicação e

suscetibilidade a defesa imune, e não pode ser atribuída a diferenças pontuais no genoma (2).

1.3.3. Eventos adversos

A vacina FA 17D foi administrada desde a sua criação até hoje a mais de 540 milhões de pessoas, sendo considerada uma das vacinas mais seguras existentes (49). Porém, após 1945, foram registrados casos de encefalite após a vacinação em crianças. Para evitar este problema, a vacina foi contraindicada para crianças menores de 6 meses de idade (39). Nos últimos anos foram relatados raros (aproximadamente 1 em 250000) casos de sérios eventos adversos neuro- e viscerotrópicos pós-vacinação, alguns casos fatais. A doença neurotrópica associada à vacinação inclui encefalite, síndrome de Guillain-Barré e doença autoimune com envolvimento do sistema nervoso central e periférico. A doença viscerotrópica é caracterizada por dano em múltiplos órgãos, semelhante à infecção natural pelo vírus selvagem da febre amarela (45, 53).

O motivo pelo qual o vírus vacinal é capaz de causar doença não está claro, uma vez que o sequenciamento do genoma dos vírus isolados destes pacientes não identificou mutações importantes que pudessem sugerir aumento da virulência ou alterações no tropismo viral, por uma possível regressão ao fenótipo do vírus parental ou por uma seleção *in vivo* de variantes mais virulentas (50). Acredita-se, portanto, que a ocorrência destes eventos adversos pós-vacinação sejam decorrentes de aspectos genéticos individuais dos pacientes, que determinam maior suscetibilidade celular ao vírus, e não devido à falha na atenuação do vírus vacinal (50). Foi proposto também uma falha na resposta imune inata em paciente com doença viscerotrópica associada à vacina da febre amarela (54). Fatores de risco para o desenvolvimento de sérios eventos adversos relacionados à vacina têm sido descritos como: idade avançada, histórico de falha no timo ou timectomia e imunodeficiências (45).

1.3.4. Imunidade

A vacina FA 17D é capaz de, com uma só dose, promover imunidade forte e duradoura, sustentada por décadas ou até por toda a vida (2, 55). A imunidade ocorre aproximadamente após 10 dias em 95% dos indivíduos vacinados e induz

proteção contra todas as cepas selvagens do vírus Febre Amarela. Os mecanismos de proteção não foram totalmente esclarecidos, mas sabe-se que tanto a resposta imune humoral quanto celular são cruciais (56).

A vacinação com o vírus FA 17D resulta em uma infecção controlada, com viremia baixa (<200 PFU/mL) e transitória aproximadamente entre o 4º e o 7º dia. A replicação viral induz a rápida produção de anticorpos neutralizantes, primeiramente do tipo IgM, que podem ser detectados após 6 dias de vacinação, alcançando um pico em 2 semanas. A produção de IgG inicia-se mais tardiamente, após 10-14 dias, mas pode persistir por mais de 40 anos, representando o primeiro mecanismo de proteção contra a reinfecção (Figura 1.8) (49, 57, 58). Anticorpos específicos para epítomos da proteína E impedem a ligação do vírus a receptores celulares e sua internalização, enquanto anticorpos contra a proteína NS1 ligam complemento e contribuem para a imunidade protetora causando a lise da célula infectada (19).

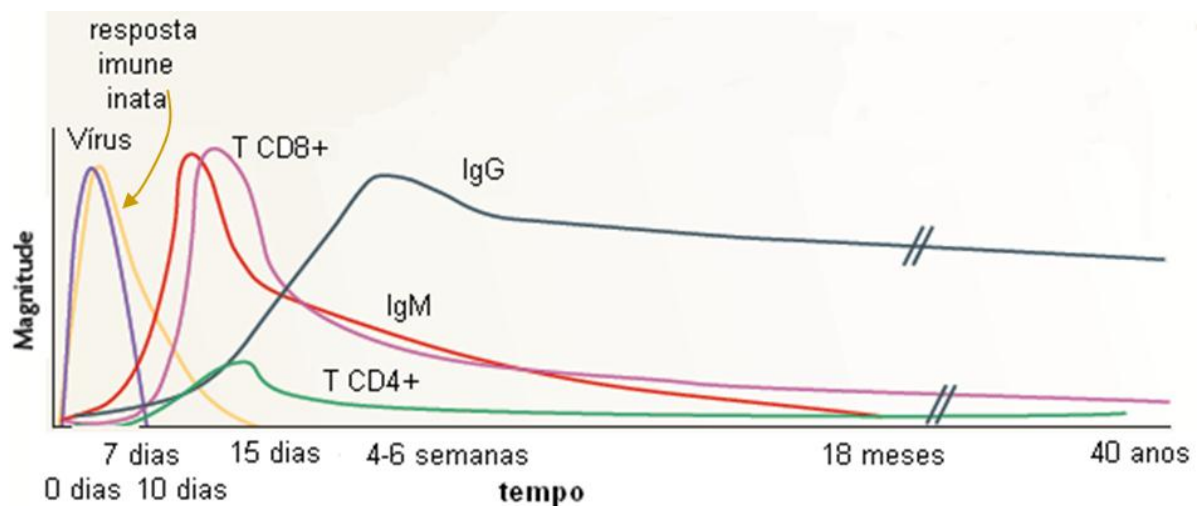


Figura 1.8: Cronologia da resposta imune promovida pela vacina FA 17D (49).

Após a inoculação subcutânea, o vírus infecta e se replica nas células dendríticas locais (59), que são ativadas via TLR 2, 7, 8 e 9 (60). Células dendríticas maduras, produtoras de citocinas pró-inflamatórias (como IL-1 β , TNF- α , IL-12p40, IL-6), migram para os linfonodos regionais, promovendo um amplo espectro de resposta imune inata e adaptativa. A ativação de células dendríticas plasmocitóides leva a uma cascata de sinalização que medeia a fosforilação do fator de regulação de interferon 7 (IRF7), induzindo a produção de interferons tipo I (IFN- α/β) (49), que em humanos atinge um pico de produção após 48 h de infecção. Estes interferons agem diretamente na replicação viral, e indiretamente auxiliando a ativação de células T CD8⁺ pelas células dendríticas maduras. Além disto, a ativação de

múltiplos TLRs em células dendríticas mielóides resulta na ativação de células CD4⁺ com um padrão balanceado entre Th1 e Th2, como evidenciado pelo significativo aumento na produção de IFN- γ e IL-4 no 15^o dia pós-vacinação (60, 61).

Células T CD4⁺ e CD8⁺ respondem a antígenos de proteínas não estruturais (NS1, NS2B e NS3) e da proteína E de superfície ligados ao MHC (62). Células T CD8⁺ ativadas proliferam-se massivamente, atingindo um pico em duas semanas após a vacinação, e são detectáveis por até 19 meses, permanecendo como células de memória. Estas células contribuem para a resposta imune protetora participando do “clearance” viral (63). Foi demonstrado que células T CD8⁺ com TCR $\gamma\delta$ e células T CD4⁺ produzem IFN- γ nos primeiros 7 dias pós-vacinação e podem contribuir para estimulação da resposta Th1, levando a uma melhor resposta de células T citotóxicas clássicas (T CD8⁺ com TCR $\alpha\beta$) e, provavelmente, contribuindo para a melhor formação de memória imunológica (64).

Também tem sido demonstrada a participação de células NK na resposta à infecção, baseado no aumento da expressão de TLR 3 e 9 e de marcadores de ativação celular, acarretando aumento na citotoxicidade destas células, poucos dias após a vacinação em humanos. Estes dados sugerem importante papel das células NK citotóxicas na fase inicial da infecção para limitar a replicação viral e sua dispersão (65).

Ultimamente, a biologia de sistemas tem sido aplicada ao estudo da imunidade gerada pela vacina FA 17D e tem confirmado a indução de respostas imunes polifuncionais, incluindo ativação de mecanismos efetores da resposta inata (sistema complemento, inflamosoma, múltiplos TLRs, citocinas e interferons) bem como da resposta adaptativa através da ativação de células T seguida por uma forte ativação de células B (66). Análises computacionais identificaram assinaturas genéticas que permitem prever com 90% de acurácia a resposta de células T CD8⁺ e com 100% de acurácia a resposta de anticorpos neutralizantes induzidas pela vacina (67). Esta nova técnica tem grande potencial para esclarecer os mecanismos de proteção da vacina ainda não elucidados, bem como para prever a eficácia de novas vacinas e identificar indivíduos que não responderiam bem à vacina (49).

1.3.5. Biodistribuição do vírus FA 17D

Estudos realizados em macacos cynomolgus detectaram o vírus FA 17D no soro de 47% dos macacos inoculados, no período entre 2 a 5 dias pós-inoculação. O título viral encontrado no pico da viremia foi de 67,3 (\pm 94,8) PFU/mL. Anticorpos neutralizantes apareceram no 7º dia pós-inoculação em 80% dos macacos e após 14 dias em 100% dos animais. O RNA viral foi detectado em 3 dias pós-inoculação na pele do local da inoculação, em linfonodos regionais e na medula óssea e em 7 dias, na pele, linfonodos, baço, timo, glândula adrenal, fígado e medula óssea. Duas semanas após a inoculação, o RNA viral foi apenas localizado no tecido linfático e após o 46º dia a presença do vírus não foi mais detectada. A carga viral encontrada nestes tecidos foi, em geral, baixa, numa faixa de 50 a 500 equivalentes PFU/g (2, 68).

Estudos em humanos sobre a viremia após vacinação com o vírus FA 17D confirmam a baixa viremia, detectada em geral após 4 dias de vacinação, com duração média de 2,5 dias. O pico de viremia foi detectado no 5º dia, com título viral de 97 PFU/mL, porém a maioria dos valores encontrados foram menores que 20 PFU/mL. O término do período de viremia coincide com o surgimento de anticorpos neutralizantes (2, 57).

1.4. Vacinas recombinantes

O surgimento da tecnologia do “clone infeccioso”, que permite a manipulação do RNA genômico viral, abriu portas para um novo campo de desenvolvimento de vacinas: as vacinas de vírus atenuados recombinantes. Vacinas atenuadas possuem várias vantagens sobre outros tipos de vacinas, pois, por conter vírus vivo capaz de se replicar no organismo, mimetiza a infecção natural, oferecendo resposta imune mais eficaz e duradoura, além de apresentar menores custos de produção. Devido às qualidades de segurança e eficácia exibidas pela vacina FA 17D, o genoma do vírus FA 17D tem sido utilizado como vetor para construção de vírus recombinantes expressando antígenos de outros patógenos, visando o desenvolvimento de vacinas contra outras doenças (69).

A primeira estratégia utilizada foi a construção de vírus quiméricos, utilizando o genoma do vírus FA 17D substituindo os genes das proteínas de superfície prM e

E pelos genes correspondentes de outros flavivírus. Utilizando esta estratégia, a Sanofi Pasteur (Lyon, França) desenvolveu a vacina ChimeriVax para o vírus da Encefalite Japonesa (ChimeriVax-JE), Dengue tipos 1-4 (ChimeriVax-DEN tetravalente) e Vírus do Oeste do Nilo (ChimeriVax-WN). Estes vírus quiméricos apresentam boa capacidade de replicação em cultura de células, promovem imunidade protetora em camundongos e primatas e foram aprovadas nos testes de neurovirulência em macacos (teste padrão adotado para o vírus FA 17D), estando atualmente em fase II-III dos testes clínicos, e a vacina ChimeriVax-JE em processo de licenciamento. A caracterização destes vírus quiméricos tem mostrado que os genes não estruturais do vírus 17D são responsáveis pelo seu fenótipo altamente atenuado, incluindo a incapacidade de se replicar no mosquito vetor, enquanto as proteínas heterólogas no envelope viral oferecem imunização humoral e celular eficiente contra o patógeno alvo, como tem sido demonstrado em camundongos, macacos e humanos (69).

Outras estratégias de inserção de genes heterólogos no genoma do vírus FA 17D também foram desenvolvidas para expressão de antígenos não relacionados, como antígenos do vírus Lassa (70), HIV (71, 72), *Plasmodium sp* (73, 74) e *Trypanosoma cruzi* (75). O tamanho reduzido do genoma do vírus FA 17D limita a capacidade de inserção de genes heterólogos, portanto a posição de inserção e o tamanho do gene inserido interferem drasticamente na viabilidade do vírus recombinante (76).

Alguns pesquisadores adotaram a estratégia de expressão do antígeno inserindo o gene heterólogo na alça *fg* da proteína E, apresentando, assim, o antígeno na superfície viral (77). Outros estudos inseriram genes para outros epítomos entre os genes das proteínas não estruturais NS2B e NS3, flanqueados por sítios de clivagem proteolítica específicos para a protease viral NS2B/NS3 (78, 79). Apesar de estas construções resultarem em vírus recombinantes imunogênicos, atenuados, e crescerem em altos títulos em cultura de células, inserções de epítomos contendo mais de 40 aminoácidos nestas posições não são geneticamente estáveis.

Bonaldo *et al* desenvolveram um vírus recombinante mais estável, inserindo o gene de uma proteína repórter (EGFP) entre os genes E e NS1 do vírus FA 17D (80). Para isto, acrescentaram sequências referentes a motivos funcionais da

poliproteína precursora, mantendo assim a correta orientação destas proteínas na membrana do retículo endoplasmático e o correto processamento por clivagem da poliproteína precursora no sítio amino-terminal da NS1, sem interferir com a estrutura das proteínas virais e com o ciclo replicativo viral. A inserção deste gene repórter, expresso nas células infectadas, possibilita estudos *in vivo* sobre a biodistribuição viral em modelos animais, assim como esclarecimentos sobre o tropismo tissular e celular do vírus e estudos *in vitro* sobre processos celulares associados à infecção.

Este sítio de inserção, na região intergênica E-NS1, foi utilizado por Bredenbeek *et al* para expressão de genes de glicoproteínas do vírus Lassa (70, 81). Embora com uma construção um pouco diferente e menos estável que a desenvolvida por Bonaldo, estes vírus recombinantes foram capazes de promover imunidade humoral e celular (células T CD8⁺) e protegeu porquinhos-da-índia contra infecção fatal por vírus Lassa. Um antígeno de SIV também foi clonado nesta região, seguindo a estratégia de construção de Bonaldo, mostrando-se estável *in vivo* e capaz de induzir resposta imune celular CD8⁺ em macacos rhesus (72).

1.5. Detecção e quantificação viral

No início das pesquisas em febre amarela, a presença do vírus em determinado tecido ou no sangue de animais e pessoas infectadas era detectada através de inoculação desses materiais em um modelo animal suscetível, como o macaco rhesus ou por injeção intracerebral em camundongos, e a quantificação viral era feita por LD₅₀ (6). Estas técnicas estão extremamente ultrapassadas e hoje em dia dispõe-se de uma gama de métodos muito mais práticos para detecção do vírus Febre Amarela.

O diagnóstico da febre amarela avançou com técnicas de análises histopatológicas e marcações por imunohistoquímica, imunofluorescência, hibridização *in situ*, além de técnicas sorológicas como ELISA e PRNT (41, 57, 82). O vírus pode ainda ser isolado de materiais biológicos em cultura de células suscetíveis (Vero, BHK-21, C6/36, PS) e quantificado por plaqueamento (83), porém para isto é necessário que o vírus esteja viável no material biológico. Técnicas moleculares de RT-PCR e RT-PCR em tempo real têm se mostrado bastante sensíveis na detecção e quantificação viral. Protocolos de RT-PCR semi-nested são

ainda mais sensíveis que a RT-PCR convencional, capazes de detectar o genoma viral em soro e tecidos de pacientes de febre amarela (82, 84).

Bae *et al* estudaram dois casos fatais de febre amarela e detectaram vírus no fígado por imunohistoquímica e por microscopia eletrônica, quantificando-o por RT-PCR em tempo real em 3×10^7 GE/mL. A RT-PCR em tempo real foi ainda capaz de quantificar o vírus no baço em $2,4 \times 10^6$ GE/mL, ainda que outra técnica não tenha sido capaz de detectá-lo neste órgão (85).

A quantificação da carga viral é um útil indicador da extensão da infecção viral e do potencial replicativo do vírus. Assim, a PCR e RT-PCR quantitativa (qPCR e qRT-PCR), em tempo real, têm sido amplamente aplicadas em virologia para monitorar a cinética de proliferação viral, para avaliar a eficiência de tratamentos antivirais ou para revelar o prognóstico de pacientes (86-88).

A qRT-PCR oferece a vantagem de ser muito mais rápida que a quantificação por plaqueamento, além de ser bastante sensível e reprodutível. Bae *et al* compararam as técnicas de quantificação da carga do vírus FA por qRT-PCR com o método de plaqueamento, estabelecendo dois protocolos de quantificação absoluta, através da comparação da carga viral das amostras com duas curvas padrões estabelecidas por diluições seriadas de dois fragmentos do RNA genômico viral clonados em plasmídeo. Os dois protocolos de qRT-PCR apresentaram ótimos níveis de precisão, principalmente para amostras com altas concentrações virais. Além disso, encontraram significativa correlação entre a concentração de genomas, detectados por qRT-PCR, e a quantidade de partículas infecciosas, detectadas por plaqueamento, resultando em um número de genomas virais de 1000 a 5000 vezes maior que o número de partículas infecciosas (89).

Vários protocolos de qRT-PCR já foram estabelecidos para quantificação de flavivírus, incluindo o vírus Febre Amarela (89-99), e esta técnica tem sido utilizada na caracterização de novos vírus quiméricos (68, 100). Estes ensaios amplificam diversas regiões do genoma como a 3' e 5' NCR, os genes das proteínas não estruturais NS3 e NS5 e das proteínas estruturais C, prM e E. A região do gene NS5 referente ao domínio da RNA polimerase viral RNA-dependente tem sido mais utilizada para desenho dos “primers” (oligonucleotídeos sintéticos) e sondas devido ao seu alto grau de conservação entre os flavivírus, possibilitando a utilização de “primers” universais para amplificação de vários flavivírus, além de conter

sequências específicas para cada espécie viral, possibilitando a identificação de cada espécie e até mesmo a distinção entre os 4 sorotipos do vírus Dengue (96, 98, 101, 102).

1.6. Modelos animais em febre amarela

A necessidade de modelos animais apropriados para o estudo do vírus da febre amarela esteve presente desde o começo das pesquisas sobre a doença no início do século XX. A suscetibilidade de macacos rhesus foi confirmada por vários pesquisadores que conseguiram transmitir a doença de pacientes para macacos e de macacos para outros macacos através da inoculação do sangue infectado e através da picada de mosquitos *Aedes aegypti* (6, 7). Além do macaco rhesus, o macaco-de-barrete (*Macaca radiata*, no inglês “crown monkey”) e saguis brasileiros também se mostraram suscetíveis (6). Foi também demonstrado que espécies de macacos africanos testadas não desenvolviam a doença, mas eram capazes de replicar o vírus, que persistia por vários dias em seu organismo e podia ser transferido para o rhesus, causando a doença (6, 103). O descobrimento deste modelo animal abriu o campo de estudo para várias pesquisas que levaram, em um primeiro momento, à descoberta do vírus como agente etiológico da febre amarela e, em seguida, à demonstração de que os vírus da febre amarela circulantes na África e na América do Sul eram imunologicamente idênticos em função da reatividade cruzada de diversas amostras séricas de humanos e de macacos, sugerindo assim, que uma única vacina protegeria populações de diversas áreas contra a febre amarela (5). Na tentativa de desenvolver um modelo mais simples para o estudo da febre amarela, Theiler observou que camundongos inoculados por via intracerebral desenvolviam uma encefalite fatal. Embora não apresentassem a patologia clássica da febre amarela, mostravam-se suscetíveis à replicação viral (6, 8). A partir deste feito, Sawyer e Lloyd desenvolveram o teste de imunidade, que consistia na inoculação intraperitonal de camundongos com o vírus (já adaptado a camundongos e sabidamente neurotrópico) misturado com um soro a ser testado quanto à imunidade à febre amarela. Se o soro contivesse anticorpos, neutralizaria o vírus e protegeria o camundongo, caso contrário o camundongo morreria de encefalite (6). Este teste foi de grande importância para estudos de epidemiologia e distribuição da febre amarela. Desde então, camundongos têm sido bastante utilizados nos estudos sobre febre amarela.

Em camundongos, diferentemente dos macacos rhesus, o vírus se mostra mais neurotrópico que viscerotrópico, embora cause infecção aparente somente quando inoculado por via intracerebral. Estudos demonstraram a presença do vírus em órgãos do sistema nervoso como cérebro, medula espinhal e nervo ciático, enquanto nenhum vírus foi encontrado no sangue, fígado, baço ou rim, quando inoculado por via intracerebral (6, 9). Sawyer demonstrou ainda que quando inoculado por outra via, o vírus raramente causa infecção, porém se o cérebro do camundongo for danificado por injeção de alguma substância inerte a encefalite viral ocorre (6, 104). Já camundongos recém-nascidos apresentaram maior suscetibilidade, até mesmo por inoculação intraperitoneal ou subcutânea, desenvolvendo os mesmos sinais e sintomas que camundongos adultos quando inoculados intracerebralmente. Entretanto, o vírus atenuado 17D não se mostrou patogênico em camundongos recém-nascidos inoculados por via subcutânea, embora seja capaz de causar encefalite fatal em camundongos adultos quando inoculados por via intracerebral. Quando inoculado por vias extra-neurais, apesar de não patogênico, o vírus 17D é capaz de produzir infecção subclínica em camundongos adultos (6).

Outros animais também foram objeto de estudo como modelos experimentais para febre amarela. Infecções inaparentes foram relatadas em algumas linhagens de porquinhos-da-índia, quando inoculados com a cepa Asibi por via intraperitoneal ou por picada de mosquito infectado, com consequente produção de anticorpos (6, 105). A cepa 17D também se mostrou infectante em porquinhos-da-índia inoculados intraperitonealmente, enquanto a cepa Francesa neurotrópica só apresentou infecciosidade por via intracerebral. Findlay e Clarke (6, 106, 107) encontraram alta suscetibilidade em porcos-espinhos (*Erinaceus europaeus*) a várias cepas patogênicas de febre amarela, causando infecção fatal tanto por lesões no fígado quanto por encefalite. O curso da infecção demonstrada em porcos-espinhos se mostrou bastante semelhante ao que ocorre em macacos rhesus. Curiosamente, cepas atenuadas do vírus como a 17D causaram a morte de porcos-espinhos inoculados, apesar de não ter sido encontrado vírus no fígado ou no cérebro destes animais. Coelhos se mostraram não suscetíveis à replicação viral quando inoculados tanto por via intraperitoneal ou intradérmica quanto por via intracerebral. Embora estes animais não apresentassem sinais de infecção e não fosse encontrado vírus

no sangue ou nos órgãos, os coelhos apresentavam altos títulos de anticorpos, proporcionais ao título viral presente no inóculo (6, 108).

Devido à falta de um modelo animal simples que desenvolva a doença viscerotrópica como apresentada em humanos, muitos estudos sobre a patologia da febre amarela foram conduzidos em humanos naturalmente infectados e em macacos rhesus (41, 109-116). Diante de novas normas regulatórias estabelecidas quanto ao uso de primatas não humanos em experimentação, tornou-se extremamente difícil a utilização destes animais para estes estudos, além de ser um modelo muito custoso. Surgiu então a necessidade da criação de novos modelos animais. Neste contexto, foi demonstrado que o hamster sírio (*Mesocricetus auratus*; em inglês “Golden Syrian Hamster”) desenvolve a doença viscerotrópica, com acometimento do fígado, semelhante a macacos rhesus e à febre amarela humana, porém somente quando inoculados com vírus selvagem adaptado após passagens seriadas em hamsters (117-120). Este modelo é importante para estudos de patogenicidade e tratamento da febre amarela e outras doenças causadas por outros flavivírus.

Em hamsters imunocompetentes tanto o vírus vacinal 17D quanto o selvagem Asibi causam apenas infecção subclínica, porém quando imunossuprimidos, hamsters inoculados intraperitonealmente com a cepa Asibi desenvolvem doença viscerotrópica fatal, e quando inoculados com a cepa 17D, desenvolvem doença neurotrópica, com encefalite lentamente progressiva, sem acometimento do fígado ou baço (121).

Camundongos portadores de Imunodeficiência Severa Combinada (SCID) mostram-se sensíveis quando inoculados por vias extra-cerebrais e têm sido utilizados para estudos de neurovirulência e determinantes moleculares do neurotropismo da cepa 17D (37, 122, 123).

Lee e Lobigs utilizaram camundongos deficientes nos receptores de interferon tipo I e II ($\text{IFN-}\alpha/\gamma\text{-R}^{-/-}$) para determinar quais mutações pontuais, que diferenciam o vírus 17D da cepa Asibi, estariam relacionadas à perda do viscerotropismo e à atenuação viral. Estes camundongos foram suscetíveis ao vírus 17D e a vírus mutantes semelhantes ao Asibi, embora o vírus 17D apresentasse menor dispersão visceral e eliminação mais rápida do vírus no sangue (38). Foi demonstrado que mutações no domínio III da proteína E, principalmente no resíduo 380 (que

corresponde a uma arginina na cepa 17D e uma treonina na cepa Asibi) (Tabela 1.1), altera a afinidade de ligação do vírus a glicosaminoglicanas presentes no glicocálix das células, sugerindo que a maior afinidade da cepa 17D às glicosaminoglicanas estaria relacionada à dificuldade de dispersão para os órgãos e à sua rápida eliminação do sangue, acarretando no fenótipo atenuado da cepa vacinal.

Meier *et al* desenvolveram modelos para estudar a influência dos interferons tipo I e II sobre a proteção contra a infecção viscerotrópica de vírus selvagens (Asibi e Angola73) e atenuado (17D-204) em camundongos da linhagem 129 apresentando nocaute para receptores de IFN- α/β e/ou IFN- γ e para a proteína sinalizadora STAT 1 (124). Camundongos 129 normais e com nocaute apenas em receptores de IFN- γ não se mostraram suscetíveis aos vírus, enquanto os outros nocautes (para receptores de IFN- α/β e para proteína STAT 1) sucumbiram à infecção pelo vírus selvagem inoculados por via subcutânea, desenvolvendo doença viscerotrópica semelhante à doença humana e a primatas não-humanos. O vírus 17D continuou atenuado nos camundongos nocautes para receptores de IFN- α/β e para a proteína sinalizadora STAT1, sendo detectado no soro e linfonodos regionais nos primeiros dias de infecção, mas sendo rapidamente eliminado e não causando mortalidade nesses animais. Em camundongos duplo nocautes para os receptores de ambos os tipos de interferons (IFN- α/β e IFN- γ) os vírus se mostraram virulentos, causando mortalidade em 100% dos animais inoculados, embora mais lentamente com o vírus 17D, semelhante aos resultados de Lee e Lobigs. Estes estudos mostram que a atenuação do vírus 17D não se deve somente à perda da capacidade de evasão viral aos interferons, já que ele se mostra atenuado mesmo na ausência de IFN tipo I, mas a uma mudança no tropismo do vírus, tornando-o deficiente na replicação em órgãos como fígado e baço e, conseqüentemente, incapaz de produzir a doença viscerotrópica característica da febre amarela.

A dificuldade em estabelecer modelos animais simples e adequados para estudos de atenuação e do tropismo viral é um entrave para o maior entendimento sobre os mecanismos de proteção da vacina 17D, que contribuiria para o desenvolvimento de novas vacinas recombinantes utilizando o vírus da febre amarela como vetor.

1.7. Justificativa

Neste trabalho, utilizamos as técnicas de RT-PCR semi-nested e qRT-PCR para detecção e quantificação de RNA viral, indicativo de proliferação *in vivo*, assim como tentamos verificar o possível comprometimento hepático após infecção e detectar em amostras séricas de camundongos vacinados com o vírus FA 17D perfis de citocinas que pudessem estar associadas à imunização.

Os motivos pelos quais a vacina contra a febre amarela promove imunidade protetora tão eficiente são ainda pouco conhecidos. A qualidade da resposta imune gerada a partir da imunização com o vírus 17D está relacionada à replicação limitada que este vírus exibe no hospedeiro, porém com significativa disseminação da massa viral. Nosso objetivo é estabelecer no modelo murino um padrão de dispersão/proliferação do vírus FA 17D, e a partir deste modelo utilizá-lo em estudos sobre a biodistribuição e imunogenicidade deste vírus, para servir de base comparativa para caracterização de novos vírus recombinantes nos quais sejam expressos antígenos de patógenos causadores de outras doenças e, desta maneira, avaliar novos candidatos vacinais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estabelecer modelo para estudos de determinação do potencial vacinal de vírus FA recombinantes por caracterização do grau de dispersão do vírus vacinal da Febre Amarela 17DD em diferentes órgãos de camundongos BALB/c após imunização, avaliação do grau de comprometimento hepático através da detecção de marcadores séricos de função hepática, assim como pela determinação do perfil de citocinas estimuladas pela vacinação.

2.2. Objetivos específicos

- Padronizar técnicas de RT-PCR semi-nested e qRT-PCR para detecção e quantificação de RNA do vírus FA 17DD em soro e tecidos de camundongos.
- Detectar o RNA viral por RT-PCR semi-nested em soro e órgãos como pele do local da inoculação, linfonodo drenante, fígado e baço após 1, 2, 4, 7 e 11 dias pós-inoculação de camundongos com o vírus FA 17DD.
- Quantificar a carga viral por qRT-PCR em camundongos nestes órgãos e no soro após 1, 2, 4, 7 e 11 dias pós-inoculação com o vírus FA 17DD.
- Determinar o grau de comprometimento hepático causado pela proliferação do vírus FA 17DD através da detecção de marcadores séricos de função hepática (AST, ALT e bilirrubina).
- Detectar alterações no perfil de citocinas séricas após imunização com o vírus FA 17DD através de ensaio de detecção múltipla de citocinas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus (LABMOF) do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

As etapas de imunização e manipulação de camundongos foram realizadas no biotério do Pavilhão Leonidas Deane (FIOCRUZ).

Os ensaios de quantificação da carga viral por qRT-PCR foram realizados no LABMOF e no Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Endêmicas (FIOCRUZ), utilizando o equipamento do LABMOF e os equipamentos das plataformas de PCR em Tempo Real do PDTIS.

3.1. Células e vírus

Para a propagação e titulação viral foram utilizadas células Vero, que são derivadas de células epiteliais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Estas células foram obtidas da Coleção Americana de Culturas e Depósitos (ATCC, 1994). A manutenção do estoque e propagação celular era de responsabilidade dos técnicos do LABMOF de acordo com os Protocolos Operacionais Padrões (POP) estabelecidos por este laboratório. As passagens foram realizadas semanalmente, assim como a manutenção das células em garrafas descartáveis de 175 cm² em meio de cultura de Earle's 199 completo contendo 2,5% de NaHCO₃ (sistema fechado) mantidas em estufa de 37° C com atmosfera de 5% de CO₂.

O vírus vacinal 17DD utilizado neste trabalho foi obtido de Bio-Manguinhos (FIOCRUZ), onde a vacina é produzida na forma liofilizada. Após a reconstituição em 2 mL de água bidestilada estéril e homogeneização, o vírus foi propagado em monocamada de células Vero com 80.000 células/cm² até a segunda passagem (2P), quando é visualizado efeito citopático (CPE) intenso. O sobrenadante de cultura foi recolhido e estocado em alíquotas a -80°C, sendo posteriormente titulado em células Vero por contagem de placas de lise.

3.1.1. Titulação viral por contagem de placas de lise

Os estoques virais foram produzidos a partir da segunda passagem. As titulações foram realizadas em monocamadas de células Vero, em placas de 24 poços (2,0 cm² / poço) (Nunc), numa densidade de 50.000 células/ cm², semeadas

com 24 h de antecedência. O experimento inclui o controle negativo, em que apenas o meio de cultura é adicionado sobre a monocamada celular. Os vírus são diluídos seriadamente da diluição 10^{-1} até 10^{-6} em meio Earle's 199. Após a retirada do meio de cultura da placa contendo a monocamada de células Vero, com o auxílio de uma bomba de vácuo, 100 μ L de cada diluição dos vírus são inoculados sobre a monocamada, em duplicata. As placas são incubadas por 1h a 37°C em estufa com atmosfera de 5,0% de CO₂ e com agitação suave a cada 15 minutos. Após a adsorção, o sobrenadante é retirado e os poços são cobertos com uma camada de 1mL de CMC (Sigma) 3,5% em meio Earle's 199 contendo 5% NaHCO₃ e 5% soro fetal bovino. Após incubação por 7 dias a 37°C em estufa com atmosfera de 5,0% de CO₂, as placas são fixadas com formaldeído a 10% e coradas com solução de cristal violeta a 0,4% para observação e contagem das placas de lise (83). O número de placas de lise de cada diluição é contado e o título do vírus é determinado de acordo com a seguinte fórmula:

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

T = título expresso em log₁₀ PFU/mL

log₁₀M = média do n° de placas de lise contadas em uma determinada diluição

log₁₀ID = inverso do fator de diluição onde as placas de lise foram contadas

log₁₀FC = fator de correção do inóculo para mL. Como o inóculo corresponde a 100 μ L, que é a décima parte de 1 mL, FC = 1 (log 10 = 1).

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

3.1.2. Controle de inóculo

As preparações dos inóculos virais administrados aos camundongos foram controladas por contagem de placas de lise. O vírus, previamente titulado, foi diluído até chegar às concentrações de 1000, 500 e 250 PFU/mL. Após a retirada do meio de cultura de uma placa de 6 poços contendo a monocamada de células Vero, com o auxílio de uma bomba de vácuo, foram inoculados sobre a monocamada 200 μ L de cada concentração do vírus, em duplicata. As placas foram incubadas por 1h a 37°C em estufa com atmosfera de 5,0% de CO₂ e com agitação suave a cada 15 minutos. Após a adsorção, o sobrenadante foi retirado e os poços foram cobertos

com uma camada de 3 mL de CMC (Sigma) 3,5% em meio Earle's 199, contendo 5% de NaHCO₃ e 5% de soro fetal bovino. Após incubação por 7 dias a 37°C em estufa com atmosfera de 5,0% de CO₂, as placas foram fixadas com formaldeído a 10% e coradas com solução de cristal violeta a 0,4% para observação e contagem das placas de lise. As contagens devem estar próximas de 200, 100 e 50 plaques (PFU/poço), respectivamente para cada concentração de vírus, de acordo com o título viral considerado para a preparação do inóculo.

3.2. Animais

Os animais utilizados neste trabalho foram camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas de 4 a 6 semanas de vida, fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp (CEMIB), São Paulo. Todos os experimentos foram regulamentados e autorizados pelo Comitê de Ética e Uso de Animais (CEUA) no documento de nº L-0032/08 e CQB 105/99 da CNTBio.

3.3. Ensaio de detecção e quantificação da carga viral

3.3.1. Desenho experimental

Os camundongos foram inoculados por via subcutânea na região dorsal com vírus FA 17DD em 2 condições diferentes, que empregaram doses de 10⁵ PFU e 2 x 10⁶ PFU (Figura 3.1). Na condição 1, 10 camundongos foram inoculados com 10⁵ PFU do vírus 17DD, grupos de 2 camundongos eram eutanasiados por injeção intraperitoneal de 100 µL do anestésico Tiopental sódico 5% (20 g/mL) em diferentes tempos após inoculação: 1, 2, 4, 7 e 11 dias e um grupo controle eutanasiado sem receber inóculo (dia 0). As amostras coletadas destes camundongos foram utilizadas para o ensaio de detecção de RNA viral por RT-PCR semi-nested. Na condição 2, 20 camundongos foram inoculados com 10⁶ PFU do vírus FA 17DD em ambos lados do dorso (inóculo total = 2 x 10⁶ PFU) e grupos de 4 animais foram eutanasiados em tempos iguais à primeira condição. As amostras coletadas destes animais foram utilizadas tanto para detecção de RNA viral por RT-PCR semi-nested quanto para quantificação da carga viral por qRT-PCR.

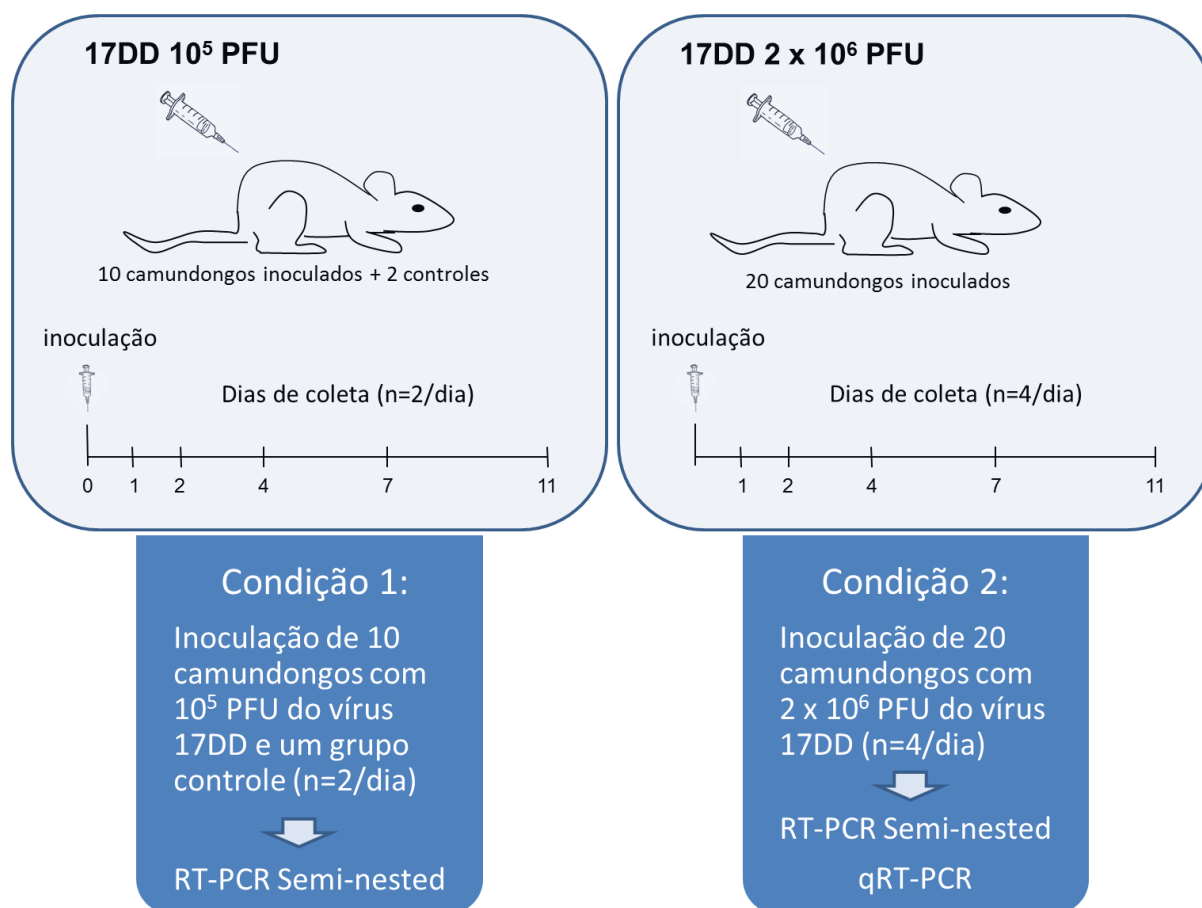


Figura 3.1: Desenho experimental para o ensaio de detecção e quantificação do RNA viral

3.3.2. Coleta das amostras de camundongos

Após anestesia com Tiopental sódico 5% (20 g/mL), o sangue dos animais foi colhido por punção cardíaca, mantido em gelo por aproximadamente 1 h, e centrifugado duas vezes a 200 x g (ou 1500 rpm) por 10 min para separação do soro, que foi armazenado a -80° C. Foram coletados também os seguintes órgãos dos animais: pele e linfonodo drenante do local da inoculação, fígado e baço. Estes órgãos foram armazenados em um líquido conservante de RNA, “RNA Later” (Ambion, AM7024), e mantidos a -20° C, conforme indicação do fabricante.

3.3.3. Extração de RNA

Os órgãos coletados foram submetidos à extração de RNA total pelo kit “RNAqueous-4PCR” (Ambion, AM1914), conforme indicação do fabricante. No caso de linfonodo, foi utilizado o órgão inteiro. No caso do fígado, foi utilizada a região mediozonal em torno da veia porta (100 a 200 mg). Para análises em pele e baço foram retirados de 30 a 60 mg de tecido. O RNA do soro foi extraído pelo “QIAamp

Viral RNA Mini Kit” (QIAGEN, 52904), conforme indicação do fabricante, utilizando 140 µL de soro. Para os testes de sensibilidade, foi extraído RNA de diluições do vírus 17DD coletado de sobrenadante de cultura de células Vero, através do “QIAamp Viral RNA Mini Kit” (QIAGEN, 52904), conforme indicação do fabricante.

Todo RNA extraído foi eluído em 60 µL de tampão de eluição do respectivo kit utilizado e tratado com 2 U da enzima DNase I (Ambion – “RNAqueous-4PCR kit”) a 37° C por 30 min, seguido de inativação da enzima pelo reagente inativador da DNase (provido pelo kit), conforme indicado pelo fabricante. Então, o RNA foi separado em alíquotas para evitar repetidos ciclos de congelamento e descongelamento e estocado a -80° C até o momento do uso.

3.3.4. RT-PCR semi-nested

O RT-PCR semi-nested foi realizado utilizando um procedimento modificado do previamente descrito por Deubel *et al* (82). Os “primers” foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies. As sequências e posições de pareamento dos “primers” estão descritas na Tabela 3.1 e esquematizadas na Figura 3.2. Para a realização da transcrição reversa foi adicionado a 4 µL de RNA extraído de cada amostra, 1 µL do “primer” reverso VD8 (20 pM), 1 µL de uma mistura dos 4 dNTPs (2,5 mM cada) e 7 µL de água livre de nucleases. Essa mistura foi aquecida a 65° C por 5 min, para desfazer as estruturas secundárias do RNA e possibilitar a hibridização do “primer”, e mantida em gelo até a adição da segunda mistura constituída de 200 U da enzima SuperScript III (Invitrogen, 18080-044), 4 µL de tampão 5x (250 mM Tris-HCl, pH 8.3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂), 1 µL de 0,1 M DTT – providos pelo fabricante da enzima – e 40 U da enzima RNaseOUT (Invitrogen, 10777-019).

Tabela 3.1: Sequências e posições de anelamento dos “primers” utilizados na RT-PCR semi-nested

“Primers”	Sequência	Posição
VD8	5’ – GGGTCTCCTCTAACCTCTAG – 3’	10709 – 10728
EMF1	5’ – TGGATGACGACGGAAGACATG – 3’	10055 – 10075
NS5	5’ – ATGCAGGACAAGACAATGGT – 3’	10118 – 10137

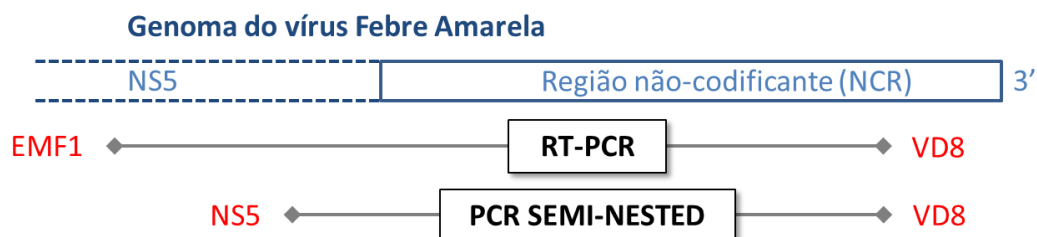


Figura 3.2: Esquema demonstrando a região do genoma do vírus amplificada pela RT-PCR semi-nested, com os “primers” destacados em vermelho. Figura modificada de Deubel *et al* 1997 (82).

O cDNA foi sintetizado pela incubação desta mistura, contendo um volume total de 20 μL , a 55° C por 1 h, seguido de aquecimento a 70° C por 15 min para inativação da enzima. Este cDNA foi amplificado por duas séries de PCR (semi-nested), utilizando “GoTaq Green Master Mix” (Promega, M7122). Na primeira série de PCR foi utilizado 2 μL do cDNA previamente sintetizado e adicionado 1 μL do “primer” senso EMF1 (20 pM), 1 μL do “primer” reverso VD8 (20 pM), 25 μL do “GoTaq Green Master Mix” e água livre de nuclease para volume final de 50 μL . Para a segunda série de PCR, o produto da primeira foi diluído 1:100, misturando 5 μL do DNA a 495 μL de água livre de nuclease, e 5 μL desta diluição foi adicionada a 1 μL do “primer” senso NS5 (20 pM), 1 μL do “primer” reverso VD8 (20 pM), 25 μL do “GoTaq Green Master Mix” e água livre de nuclease para volume final de 50 μL . Ambas séries de PCR foram realizadas através de aquecimento a 95° C por 2 min, seguido de 30 ciclos de: 95° C por 30 seg, 50° C (na primeira PCR) ou 55° C (na segunda PCR) por 45 seg e 72° C por 45 seg, e uma extensão final a 72° C por 5 min. Um controle negativo sem amostra foi incluído em cada reação. Para controle positivo foi utilizado o RNA padrão sintetizado *in vitro* para o qRT-PCR (ver sessão 3.3.4.1), também incluído em cada reação.

Para verificação da presença de RNA viral em cada amostra, os produtos da PCR semi-nested foram aplicados a géis de agarose (1%), submetidos a eletroforese a 85 V por aproximadamente 1:30 h, em tampão TAE e posteriormente corados com brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Bio-Rad, 161-0433). As bandas nos géis foram visualizadas pelo sistema de fotodocumentação “Gel-Doc XR” (Bio-Rad) utilizando o software “Quantity-One”.

3.3.5. qRT-PCR

Para a quantificação da carga viral nas amostras foi realizado RT-PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan, em que uma sonda, que possui um fluoróforo repórter ligado à extremidade 5' e um fluoróforo “quencher” ligado à extremidade 3', é hibridizada ao DNA (ou cDNA) molde entre os “primers” senso e reverso. Quando a sonda está íntegra, o fluoróforo “quencher” capta toda a fluorescência do repórter por um fenômeno chamado transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET). Porém, durante a reação de polimerização em cadeia, a sonda é degradada pela atividade 5'→3' exonuclease da DNA polimerase, liberando o fluoróforo repórter do “quencher”, o que resulta na produção de sinal fluorescente com intensidade equivalente ao número de amplicons gerados (Figura 3.3).

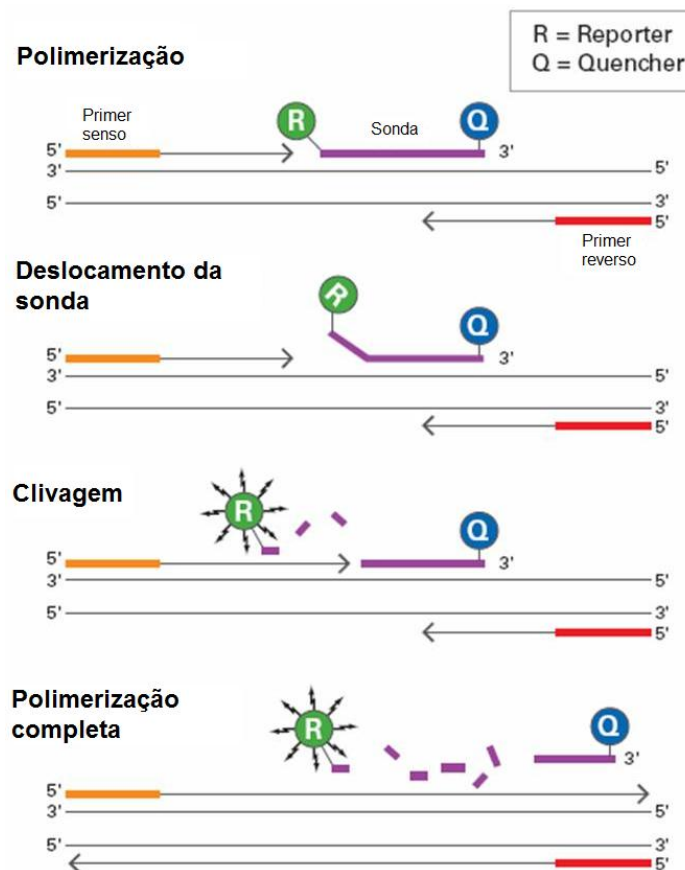


Figura 3.3: Esquema sobre o mecanismo de emissão do sinal fluorescente pelo sistema TaqMan.

Assim, a intensidade de fluorescência é captada após cada ciclo de amplificação da PCR, ao longo de toda a reação, e quanto mais alto for o número de cópias inicial do ácido nucléico alvo, mais rápido será observado o aumento significativo da fluorescência. Então, é estabelecido um limiar (do inglês “threshold”)

comum a todas as amostras na fase exponencial de amplificação, fase onde a eficiência de amplificação é constante, e, a partir deste, estima-se o ciclo de limiar (do inglês “cycle threshold”), ou Ct, para cada amostra, que representa o número de ciclos de amplificação necessários para que cada amostra atinja o limiar de fluorescência pré-estabelecido. Quanto maior o Ct de uma amostra, menor o número relativo inicial de cópias do ácido nucléico alvo dessa amostra.

Para a quantificação absoluta do número de cópias do ácido nucléico alvo faz-se necessária a construção de curvas-padrão através da execução de qRT-PCR com diluições seriadas (ex.: logarítmicas de base 10) de uma quantidade conhecida do alvo em estudo. Quando as reações são concluídas, os valores do Ct são determinados para cada diluição. Posteriormente, esses valores de Ct são utilizados na construção de retas regressoras entre as quantidades conhecidas do alvo e os Cts estimados para cada titulação e suas replicatas técnicas. Assim, uma curva-padrão para quantificações absolutas pode ser descrita pela equação geral para retas: $y = ax + b$, onde o coeficiente de inclinação negativo demonstra quantos ciclos de amplificação são necessários para que se obtenha um aumento de uma ordem de grandeza do sinal fluorescente (ou seja, a quantidade de DNA em uma escala logarítmica de base 10). A partir dessa curva-padrão, usando-se necessariamente o mesmo limiar estabelecido na construção da curva-padrão, pode-se, para cada amostra biológica e suas replicatas técnicas, calcular a quantidade inicial absoluta do ácido nucléico alvo presente nessas amostras.

As etapas de padronização da qRT-PCR foram realizadas nos equipamentos das plataformas tecnológicas de PCR em tempo real do PDTIS, AB 7000 e 7500 Fast-Real Time PCR System. As quantificações de carga viral e do RNA ribossomal 18S nas amostras foram realizadas no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR System, pertencente ao LABMOF.

3.3.5.1. Preparação do RNA padrão

Para estabelecimento da curva padrão para quantificação do vírus FA 17DD por qRT-PCR foram utilizadas diluições seriadas logarítmicas de base 10 de amostras contendo concentrações conhecidas de um fragmento de RNA transcrito *in vitro* contendo a região do genoma viral a ser amplificada no ensaio de qRT-PCR.

Como molde para a transcrição *in vitro*, a sequência entre os nucleotídeos 10055 (NS5) e 10728 (3'NCR) do genoma do vírus FA 17DD foi amplificada por RT-PCR convencional, utilizando os “primers” EMF1 e VD8 (Tabela 3.1). O produto da PCR foi submetido a eletroforese em gel preparativo de agarose 0,8% em TAE e a banda correspondente ao amplicon foi purificada pelo “QIAquick Gel Extraction Kit” (QIAGEN, 28704). O fragmento purificado foi clonado no plasmídeo “pGEM-T Easy Vector” (Promega, A1360), que contém o promotor T7. Bactérias *E. coli* SURE (Agilent/stratagene) foram transformadas com o plasmídeo contendo o fragmento do genoma viral e cultivadas em placa de petri contendo 20 mL de meio LB sólido e 1 µg de ampicilina. Após o cultivo, foram selecionadas aleatoriamente algumas colônias e propagadas em tubos Falcon contendo 5 mL de meio LB líquido e 0,25 µg de ampicilina. As culturas bacterianas foram utilizadas para purificação plasmidial, utilizando-se “QIAprep Spin Miniprep Kit” (QIAGEN, 27106). A região do inserto dos plasmídeos purificados a partir de cada colônia bacteriana foi sequenciada, por meio da utilização de “primers” comerciais M13 (senso e reverso; Promega) que flanqueiam o inserto, para verificação de sua integridade e a correta orientação da sequência de acordo com a posição do promotor T7 no plasmídeo. O sequenciamento foi realizado na plataforma de sequenciamento nucleotídico do PDTIS. Foi então selecionada uma colônia de bactérias, que continha o plasmídeo com o inserto na posição esperada, e propagada em um balão de Erlenmeyer contendo 100 mL de meio LB líquido e 5 µg de ampicilina, para obtenção de maior massa bacteriana para purificação plasmidial utilizando “QIAGEN Plasmid Maxi Kit” (QIAGEN, 12163). O plasmídeo foi linearizado por digestão com a enzima de restrição Sal I (Promega, R6051) e concentrado por precipitação com 3 volumes de etanol 96% em 10% de acetato de sódio (3 M, pH 5,5). Este molde de DNA foi utilizado para transcrição *in vitro*, sob ação da enzima T7 a 37° C por 4 h, conforme indicado no manual do kit utilizado: “MEGAscript High Yield Transcription Kit” (Ambion, AM1333). O RNA transcrito foi tratado com a enzima DNase I (Ambion – “RNAqueous-4PCR kit”) a 37° C por 30 min, seguido de inativação da enzima pelo reagente inativador da DNase (fornecido pelo kit “RNAqueous-4PCR”), para eliminar resíduos de DNA da fita molde, e purificado por método de coluna, utilizando “MEGAclean kit” (Ambion, AM1909).

A concentração do RNA transcrito (X) foi determinada por espectrofotometria, utilizando o equipamento NanoDrop (Thermo Scientific), e convertida para número de moléculas de RNA (Y) através da fórmula (97):

$$Y \text{ moléculas}/\mu\text{L} = \frac{X \text{ g} / \mu\text{L RNA}}{\text{Tamanho do transcrito (nt)} \times 340} \times 6,02 \times 10^{23}$$

O RNA sintético foi então diluído seriadamente em tampão Tris-EDTA contendo 100 ng/ μL de tRNA de levedura (Ambion, AM7119) como RNA carreador, para obtenção de concentrações de 10^6 a 10^0 cópias/ μL , que foram aliquotadas e estocadas a -80°C até o momento do uso. As concentrações superiores produzidas durante a diluição, bem como o RNA não diluído foram também estocados a -80°C para eventuais diluições posteriores.

3.3.5.2. Quantificação da carga viral em tecidos

Para quantificação da carga viral em amostras de tecido foi utilizado um protocolo de qRT-PCR em duas etapas. A síntese do cDNA foi realizada a partir de “primers” aleatórios, utilizando o “High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Ambion, 4368814), que sintetiza fitas de cDNA de todo RNA presente na amostra, inclusive o RNA viral (quando presente), nosso alvo para a quantificação, e o RNA ribossomal 18S, utilizado como controle endógeno para normalização dos resultados. A reação foi realizada conforme indicação do fabricante, utilizando 10 μL de RNA total da amostra ou RNA padrão (curva padrão), misturando-o a 10 μL do mix da transcrição reversa constituído por tampão 10X, 100 mM dNTPs, “primers” aleatórios, transcriptase reversa MultiScribe, inibidor de RNase e água livre de nucleasse (todos estes componentes são fornecidos no kit). A reação foi realizada por incubação a 25°C por 10 min, seguida de aquecimento a 37°C por 2 h e 85°C por 5 seg.

A etapa de amplificação por PCR em tempo real foi realizada no “StepOnePlus Real-Time PCR System” (Applied Biosystems, USA), utilizando o “TaqMan Universal PCR Master Mix II” (Applied Biosystems, 4440038) que, além da DNA polimerase, contém uma enzima UNG (Uracil-N-glicosilase) para degradar qualquer DNA contaminante. As sequências dos “primers” e da sonda foram descritas por Bonaldo *et al* (72) e estão demonstradas na Tabela 3.2. Cada amostra foi quantificada em triplicatas idênticas a partir de um mesmo cDNA, previamente

sintetizado como descrito acima. A reação foi realizada conforme indicação do fabricante, com concentrações ideais de “primers” e sonda determinadas por ensaios de otimização: 300 nM de “primer” senso, 300 nM de “primer” reverso e 250 nM de sonda. Para cada reação, foi misturado 2 µL da amostra de cDNA ao mix da PCR contendo “primers”, sonda, TaqMan Universal Master Mix (2X) e água livre de nuclease para volume final de 20 µL. As triplicatas de cada amostra foram preparadas em um tubo Eppendorf, onde foram bem homogeneizadas, e distribuídas na placa de 96 poços. As placas foram posicionadas no equipamento de PCR em tempo real e submetidas à temperatura de 50° C por 2 min (para atividade da enzima UNG), seguido de aquecimento a 95° C por 10 min (para ativação da DNA polimerase e inativação da UNG), e de 40-45 ciclos de 95° C por 15 seg e 60° C por 1 min. A amplificação foi monitorada utilizando-se o StepOne Software v2.1.

Tabela 3.2: Sequências e posições de anelamento dos “primers” e sonda utilizados na qRT-PCR

“Primers”/sonda	Sequência	Posição
Fwd YF-17D	5’ – GCGGATCACTGATTGGAATGAC – 3’	10188 – 10209
Rev YF-17D	5’ – CGTTCGGATACGATGGATGACTA – 3’	10242 – 10264
Sonda YF	[Fam]5’ – AATAGGGCCACCTGGGCCTCCC – 3’[Tamra]	10211 – 10232

3.3.5.3. Normalização

A quantificação absoluta da carga viral foi normalizada através da quantificação, em corridas separadas, do RNA ribossomal 18S como controle endógeno para corrigir pequenas variações decorrentes de diferenças de massa de tecido utilizado e de eficiência da extração de RNA e da transcrição reversa. O rRNA 18S está presente em todos os tecidos em quantidades constantes para cada tipo de tecido e é bastante utilizado como controle endógeno. Para a qRT-PCR deste alvo, foram utilizados “primers” e sonda do kit “TaqMan Ribossomal RNA Control Reagents” (Applied Biosystems, 4308329) em um protocolo de qPCR semelhante ao utilizado para quantificação da carga viral, utilizando os mesmos cDNAs sintetizados como descrito acima. Cada tipo de tecido foi analisado separadamente devido à diferença de expressão do RNA ribossomal em diferentes tecidos.

Para estabelecimento de uma curva padrão para quantificação do rRNA 18S, foi realizada uma PCR convencional a partir do cDNA gerado por “primers” aleatórios de uma amostra de RNA total de tecido utilizando-se os mesmos “primers” da qRT-PCR para produção de grande quantidade de um fragmento de DNA correspondente à sequência amplificada na qRT-PCR. A partir do produto desta PCR foram feitas 10

diluições seriadas logarítmicas de base 10 em tampão EB e cada diluição foi alíquotada e estocada a -20° C até o momento do uso.

A partir da curva padrão estabelecida para o controle endógeno rRNA 18S foram feitas quantificações absolutas deste alvo nas amostras de tecido. Com base no valor obtido para cada amostra de um tecido, foi calculado um fator normalizador para cada amostra, tendo como referência a média dos valores obtidos nas amostras de um mesmo tecido. Assim, para efetuar a normalização da carga viral, os valores obtidos da quantificação absoluta do vírus FA 17DD em cada amostra foram multiplicados pelo seu respectivo fator normalizador.

3.3.5.4. Quantificação da carga viral em soro

A quantificação da carga viral em amostras de soro de camundongos foi realizada segundo um protocolo de qRT-PCR em uma etapa, utilizando “TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix” (Applied Biosystems, 4309169). A reação foi realizada conforme indicação do fabricante, utilizando 4 µL de RNA extraído de soro. Os “primers” e sonda utilizados foram os mesmos da quantificação de amostras de tecido (Tabela 3.2), porém com concentrações diferentes, determinadas por ensaio de otimização: 300 nM de “primer” senso, 900 nM de “primer” reverso e 250 nM de sonda. A transcrição reversa foi realizada por incubação a 48° C por 30 min, seguido pela ativação da Taq polimerase a 95° C por 20 min e de 40 ciclos de amplificação a 95° C por 15 seg e 60° C por 1 min. A amplificação foi monitorada utilizando-se o StepOne Software v2.1.

Esta quantificação não foi normalizada por controle endógeno, devido à ausência de rRNAs ou mRNAs em amostras de soro. Assim, consideramos que o volume de soro utilizado na extração de RNA foi igual para todas as amostras (140 µL). As variações de eficiência na extração do RNA e na transcrição reversa não foram controladas, porém consideramos não significativas, pois utilizamos método de coluna para extração de RNA e protocolo de qRT-PCR em uma etapa, em que a transcrição reversa precede a reação de amplificação sem manipulação das reações.

3.4. Ensaio para dosagem de marcadores de função hepática e citocinas séricas

3.4.1. Inoculação de camundongos e coleta das amostras

Camundongos BALB/c fêmeas de 5 semanas de idade foram inoculados por via subcutânea na região dorsal com vírus FA 17DD na dose 10^5 PFU ou com o meio em que o vírus foi cultivado (*mock*), em 3 experimentos idênticos. Cada experimento continha um grupo controle sem inoculação, ou dia 0 (n=5), dois grupos inoculados com vírus FA 17DD (n=5) e dois grupos inoculados com meio de cultura, ou *mock* (n=5), conforme esquematizado na Tabela 3.3. O sangue do grupo controle sem inoculação (dia 0) foi coletado no dia da inoculação dos outros camundongos (dia 0). Após 4 e 7 dias de inoculação foi coletado sangue do grupo *mock* e do grupo inoculado com o vírus FA 17DD. Amostras de todos os camundongos foram utilizadas para dosagem de citocinas, porém, para a dosagem de marcadores de função hepática, somente as amostras coletadas no 7º dia foram utilizadas. O sangue foi coletado por punção cardíaca, após anestesia com Tiopental sódico 5% (20 g/mL), mantido em gelo por aproximadamente 1 h, e centrifugado duas vezes a 200 x g (ou 1500 rpm) por 10 min para separação do soro. O soro foi então armazenado a -80°C até o momento do uso.

Tabela 3.3: Camundongos utilizados para dosagem de marcadores de função hepática e de citocinas

Coleta \ Grupo	Dia 0	<i>mock</i>	FA 17DD
Dia 0	5 ^a	-	-
Dia 4	-	5 ^a	5 ^a
Dia 7	-	5 ^b	5 ^b

a = grupos utilizados somente para dosagem de citocinas

b = grupos utilizados para dosagem de marcadores de função hepática e de citocinas

3.4.2. Dosagem de marcadores de função hepática

Para avaliação do comprometimento hepático após infecção pelo vírus FA 17DD foram dosadas as transaminases séricas AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase), e bilirrubina total em amostras de soro de camundongos 7 dias após inoculação com o vírus FA 17DD ou com *mock* (Tabela 3.3). Para isto foram utilizadas tiras reagentes do sistema Reflotron Plus (Roche),

que realizam uma reação bioquímica com o elemento a ser dosado, resultando na oxidação de um indicador colorimétrico. A formação do corante é medida a 567 nm, como uma medida da atividade enzimática das transaminases ou da concentração de bilirrubina total.

A AST, também chamada de glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), e a ALT, também chamada de glutamato piruvato transaminase (GPT), pertencem ao grupo de transaminases que catalisam a conversão dos aminoácidos nos α -ceto ácidos correspondentes e vice versa, pela transferência dos amino grupos. A AST (ou GOT) está presente em grandes concentrações no miocárdio, mas também apresenta significativa atividade no cérebro, fígado, sistema gastrointestinal, tecidos gordurosos, músculo esquelético e rins. A ALT (ou GPT) está presente em maiores concentrações no fígado, e em concentrações menores nos rins, coração, músculo esquelético, pâncreas, baço e pulmão. Assim, lesões nestes órgãos liberam estas enzimas do citoplasma e de mitocôndrias na circulação sanguínea. Níveis séricos elevados das transaminases podem indicar enfarte do miocárdio, doença hepática, distrofia muscular ou lesões nos órgãos. Contudo, atividades séricas de ALT (ou GPT) aumentadas são bastante específicas para lesão parenquimal do fígado, enquanto que a AST (ou GOT) não é uma enzima específica do fígado.

A bilirrubina é o produto da quebra da hemoglobina no sistema reticuloendotelial. É conjugada no fígado para depois ser eliminada na bile e estocada na vesícula biliar ou transferida diretamente ao intestino delgado. Assim, níveis séricos elevados de bilirrubina podem indicar disfunções ou lesões hepáticas.

3.4.3. Dosagem de citocinas séricas

Para verificar alterações na produção de citocinas sob estímulo do vírus FA 17DD foram dosadas as citocinas: TNF- α , Eotaxin, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES, a partir de 25 μ L de soro de camundongos em 3 experimentos idênticos, conforme descrito acima (Tabela 3.3). Para isto foi utilizado o kit “Milliplex MAP - Mouse Cytokine/Chemokine Panel 15” (Millipore, MPXMCYTO-70K), que utiliza microesferas ligadas a corantes fluorescentes e conjugadas a anticorpos específicos para cada citocina. Estas microesferas capturam as citocinas presentes na amostra e, então, um anticorpo de detecção biotilado é acrescentado. Para completar a

reação na superfície das microesfera, esta mistura é incubada com estreptavidina conjugada à ficoeritrina. A reação é então introduzida em um leitor Luminex, que detecta os sinais fluorescentes emitidos pelas microesferas e quantifica as citocinas presentes em cada amostra.

4. RESULTADOS

4.1. Padronização dos testes de detecção e quantificação de RNA do vírus FA 17DD

4.1.1. Otimização de “primers” e sonda

Para estabelecimento das concentrações ótimas dos oligonucleotídeos sintéticos ou “primers” a serem utilizadas nas reações de qRT-PCR, a fim de garantir a maior sensibilidade possível, foram testadas várias concentrações de ambos “primers” (senso e reverso) utilizando-se a mesma amostra de RNA em todas as reações: o RNA padrão equivalente a 10^3 cópias/ μ L. As Tabelas 4.1 e 4.2 mostram os valores de Ct (Cycle threshold) obtidos nas reações de qRT-PCR em duas etapas e em uma etapa, respectivamente, para cada concentração de “primers” em duplicatas, apresentando as médias das duplicatas ao lado. A condição em que amostra foi detectada com o menor número de ciclos (o menor Ct), utilizando a menor concentração de “primers” possível, é a condição de escolha e está destacada em negrito nas tabelas.

Tabela 4.1: Resultados em Ct da qRT-PCR em duas etapas para otimização da concentração de “primers”.

		[] primer senso							
		100 nM		300 nM		600 nM		900 nM	
[] primer reverso	100 nM	32,44	32,34	32,08	32,10	31,95	32,04	32,13	32,25
		32,24		32,11		32,14		32,37	
	300 nM	31,78	31,91	31,93	31,84	32,04	32,08	31,92	32,14
		32,05		31,74		32,12		32,37	
600 nM	31,60	31,91	31,70	31,55	32,43	32,23	32,31	32,21	
	32,22		31,41		32,02		32,12		
900 nM	31,84	31,88	31,71	31,68	31,84	31,87	32,22	32,04	
	31,91		31,65		31,90		31,85		

Com base nestes valores de Ct foram escolhidas as concentrações de 300 nM dos dois primers para a qRT-PCR de duas etapas e as concentrações de 300 nM do primer senso e 900 nM do primer reverso para o protocolo em uma etapa.

Tabela 4.2: Resultados em Ct da qRT-PCR em uma etapa para otimização da concentração de “primers”.

		[] primer senso							
		100 nM		300 nM		600 nM		900 nM	
[] primer reverso	100 nM	37,07	37,02	36,17	36,31	36,61	36,15	36,18	36,24
		36,96		36,44		35,68		36,29	
	300 nM	35,67	35,57	35,71	35,84	35,55	35,58	35,42	35,86
		35,47		35,96		35,61		36,3	
600 nM	34,27	34,25	34,16	34,13	34,37	34,07	34,49	34,19	
	34,23		34,10		33,77		33,89		
900 nM	33,82	34,03	33,80	33,77	33,92	34,16	34,39	34,00	
	34,24		33,73		34,40		33,61		

Para definirmos a melhor concentração de sonda a ser utilizada, estas concentrações de “primers” foram mantidas e foram então testadas diferentes concentrações da sonda: 60 nM, 125 nM e 250 nM, utilizando o protocolo em duas etapas. Para isto utilizamos como amostra diferentes concentrações do RNA padrão: $10^1 - 10^4$ cópias/reação, em duplicatas. A Tabela 4.3 mostra os valores de Ct obtidos com cada concentração de sonda nas diferentes amostras, em duplicatas, com as médias das duplicatas ao lado.

Tabela 4.3: Resultados em Ct da qRT-PCR para otimização da concentração de sonda.

		[] sonda					
		60 nM		125 nM		250 nM	
[] amostra (cópias/reação)	10	ID	36,99	35,19	35,19	ID	34,49
		36,99		ID		34,49	
	100	36,94	36,28	35,32	35,84	34,57	35,27
		35,62		36,37		35,97	
1000	32,76	32,65	32,22	32,39	32,04	32,20	
	32,54		32,57		32,35		
10000	30,59	30,50	30,25	29,95	29,16	29,46	
	30,41		29,64		29,77		

ID = indeterminado, ou seja, abaixo do limite de detecção da técnica

Para todas as concentrações de RNA padrão utilizadas nas amostras, a condição que utilizou 250 nM de sonda obteve os menores valores de Ct médios, demonstrando maior sensibilidade. Portanto, esta foi a concentração de escolha para todas as reações de qRT-PCR para os dois protocolos utilizados.

4.1.2. Teste de sensibilidade da RT-PCR Semi-nested

Para testar a sensibilidade da técnica de RT-PCR semi-nested para detecção do RNA do vírus FA 17DD, uma suspensão viral foi diluída seriadamente em fator de 10 para obtenção de amostras contendo de 10^5 a 10^1 PFU por volume extraído, de forma que o volume total das amostras de RNA, após a extração (60 μ L), contivesse quantidades equivalentes a 10^5 a 10^1 PFU. Estas amostras foram submetidas à RT-PCR semi-nested. A técnica foi capaz de detectar todas as diluições virais, sendo, portanto, sensível o suficiente para detectar quantidades a partir de 10 PFU (Figura 4.1a).

Para verificar se o RNA total de um tecido poderia interferir na sensibilidade da RT-PCR, as mesmas diluições do vírus 17DD utilizadas anteriormente (10^5 a 10^1 PFU) foram acrescentadas a aproximadamente 30 mg de tecido de fígado de camundongo, o RNA total foi extraído e submetido à RT-PCR semi-nested. Um controle contendo somente RNA total de fígado sem vírus foi acrescentado ao experimento. A técnica foi capaz de detectar o RNA viral de todas as amostras que continham vírus, embora as menores quantidades de vírus apresentassem bandas progressivamente mais claras no perfil obtido por eletroforese em gel de agarose (Figura 4.1b).

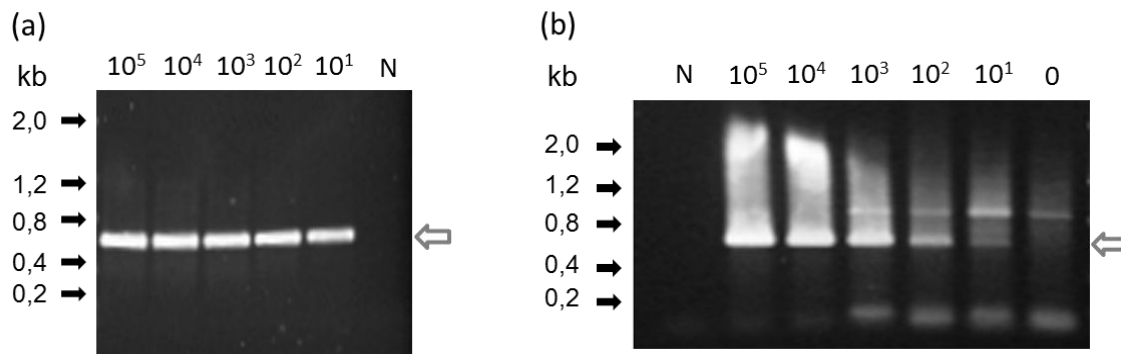


Figura 4.1: Teste de sensibilidade da RT-PCR semi-nested para detecção do RNA viral, analisado por eletroforese em gel de agarose a 1%. As quantidades do vírus FA 17DD em PFU estão indicadas na parte superior de cada poço. O controle negativo (sem RNA) está indicado como N. Em (a) amostras de RNA extraídas de diluições seriadas do vírus FA 17DD; em (b) amostras de RNA total de fígado extraído com diferentes quantidades do vírus FA 17DD ou sem vírus (0). Os marcadores de tamanho em kb estão indicados à esquerda das figuras e a seta branca à direita indica a altura esperada da banda específica para o RNA viral.

4.1.3. Teste de sensibilidade da qRT-PCR

Para a quantificação absoluta da carga viral foi utilizada uma curva padrão construída a partir de um fragmento de RNA viral sintetizado *in vitro*. O RNA transcrito e purificado foi quantificado em 731,7 ng/ μ L que correspondia a $1,7 \times 10^{12}$ cópias/ μ L. Esta massa de RNA foi diluída seriadamente em fator de 10 até a obtenção de amostras na faixa de 10^6 a 1 cópia/ μ L. A curva padrão obtida com estas amostras mostrou-se adequada para a quantificação da carga viral, apresentando parâmetros ótimos: coeficiente angular da reta (*slope*) = -3,235 e R^2 (coeficiente de determinação da reta) = 0,988. A eficiência da reação apresentou-se também ótima (103,7%) (Figura 4.2).

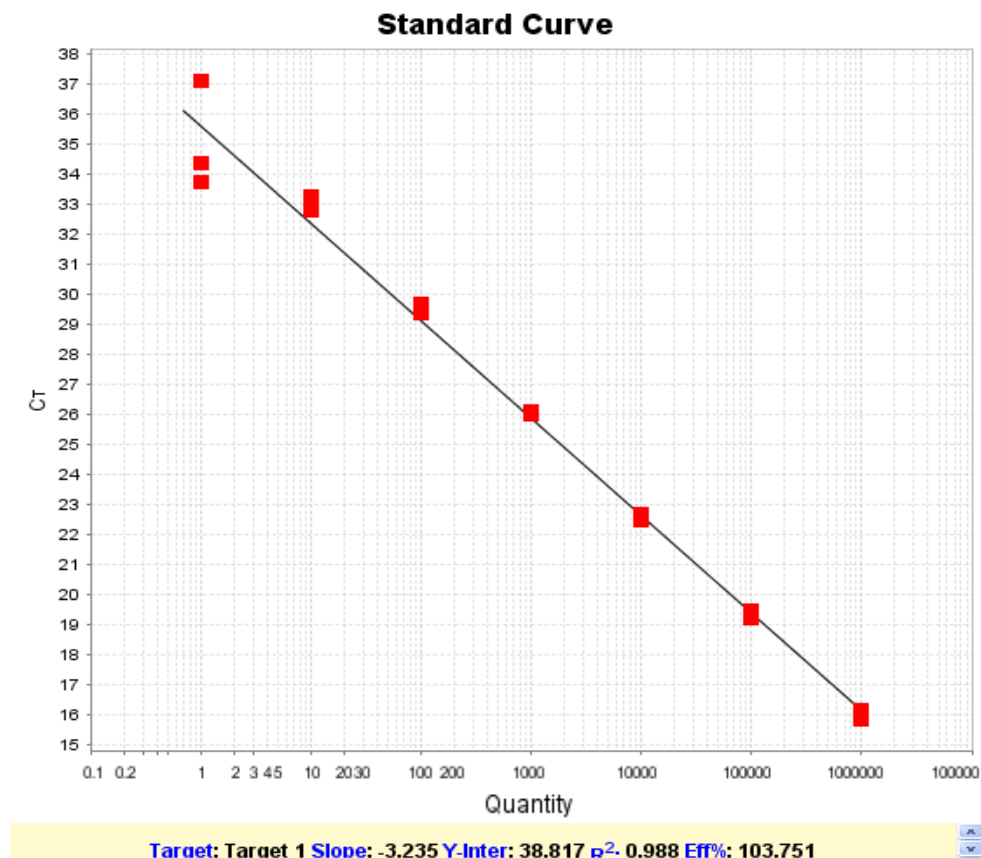


Figura 4.2: Curva padrão da qRT-PCR em duas etapas utilizando diluições seriadas de fator 10 do RNA padrão equivalentes às concentrações de 1 a 10^6 cópias/reação.

As amostras foram analisadas por dois diferentes protocolos de qRT-PCR. No protocolo de qRT-PCR em duas etapas, a técnica mostrou boa sensibilidade de detecção de um mínimo de 1 cópias/reação, que equivale a 1 cópia/ μ L de RNA (Figura 4.2), embora esta concentração tenha apresentado grande variação entre as

replicatas. Portanto, a quantidade mínima quantificável foi de 10 cópias/reação ou 10 cópias/ μL de RNA.

No protocolo de qRT-PCR em uma etapa, a técnica mostrou menor sensibilidade, detectando um mínimo de 20 cópias/reação, que equivale a 10 cópias/ μL de RNA. Esta quantidade mínima também apresentou grande variação entre as replicatas (Figura 4.3) e concentrações menores de RNA ficaram abaixo do nível detectável por esta técnica.

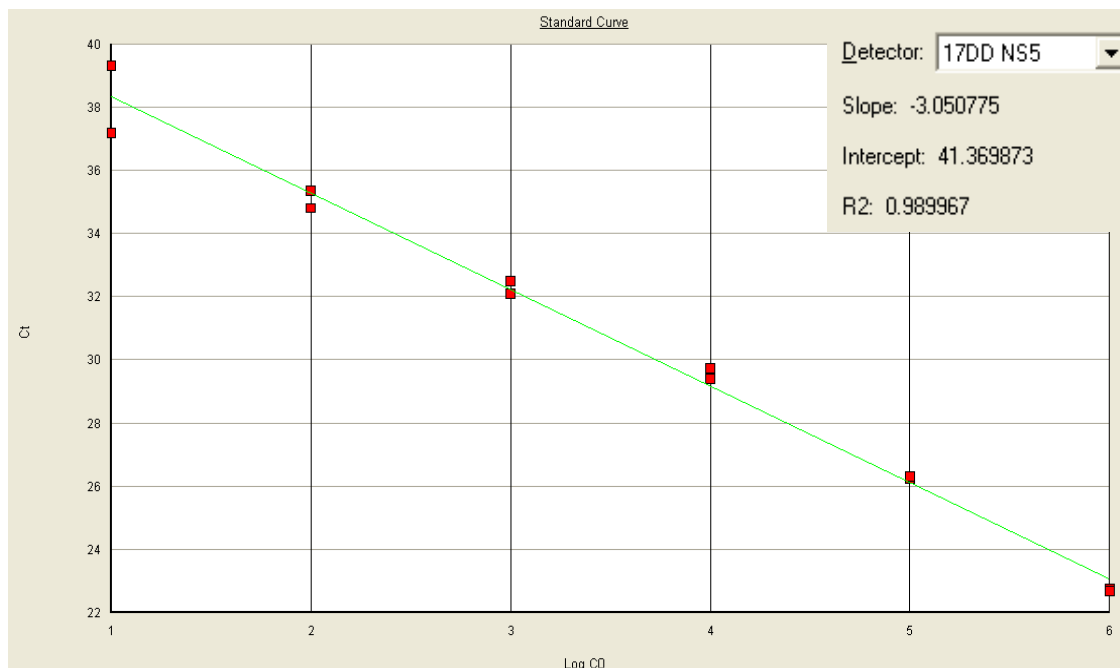


Figura 4.3: Curva padrão da qRT-PCR em uma etapa utilizando diluições seriadas de fator 10 do RNA padrão equivalentes às concentrações de 20 a 2×10^6 cópias/reação.

Para verificar se a presença do RNA total de um tecido poderia interferir com a quantificação da carga viral nas amostras, extraímos RNA total de aproximadamente 30 mg de fígado de camundongo não infectado, obtendo-se 1027,0 ng/ μL de RNA, quantificado por leitura da densidade ótica. Esta amostra de RNA foi diluída para obtenção de concentrações de aproximadamente 500, 250, 100, 50 e 10 ng/ μL . Então, amostras contendo 1 μL de cada concentração de RNA total, acrescentado a 1 μL do RNA padrão correspondente a 10^4 cópias/ μL , foram submetidos ao ensaio de quantificação por qRT-PCR em duas etapas, em duplicatas. A Tabela 4.4 mostra os valores obtidos na quantificação de 10^4 cópias do RNA padrão contendo diferentes concentrações de RNA total extraído de fígado, em duplicatas, apresentando as médias das duplicatas ao lado. A técnica foi capaz de quantificar o RNA padrão corretamente em amostras contendo até 50 ng de RNA

total (em negrito na Tabela 4.4), enquanto as quantificações de amostras contendo concentrações maiores de RNA total sofreram forte interferência pela presença do RNA total, fornecendo valores até 4 vezes menores que a quantidade real do RNA alvo contido na amostra (10^4 cópias).

Tabela 4.4: Efeito da presença de RNA total sobre a quantificação de 10^4 cópias de RNA padrão

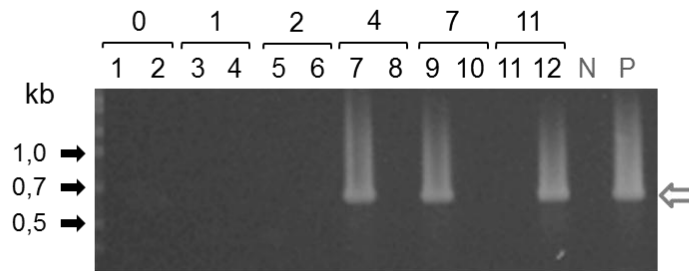
RNA total	Quantificação	Média
1000 ng	2219,26	2256,27
1000 ng	2293,28	
500 ng	2463,78	2479,30
500 ng	2494,81	
250 ng	4743,28	4728,14
250 ng	4713,00	
100 ng	4818,14	5033,08
100 ng	5248,03	
50 ng	13135,33	12748,75
50 ng	12362,17	
10 ng	13097,49	12772,15
10 ng	12446,81	

4.2. Detecção do RNA viral por RT-PCR semi-nested em amostras de soro e órgãos de camundongos vacinados

4.2.1. Soro

Após inoculação do vírus FA 17DD nos camundongos foi possível detectar RNA viral no soro, indicativo de proliferação viral nos tecidos. Quando inoculamos 10^5 PFU, o RNA viral foi detectado em 1 dos 2 animais analisados por dia, após 4, 7 e 11 dias (camundongos nº 7, 9 e 12), mas em nenhum animal analisado nos dois primeiros dias de inoculação (Figura 4.4a). Na dose 2×10^6 PFU, a viremia ocorreu mais precocemente, sendo detectada a partir do 1º dia pós-inoculação até o 7º dia, em pelo menos 1 dos 4 camundongos analisados por dia (camundongos nº 2, 5, 7, 10 e 13) (Figura 4.4b). No 11º dia não foi detectado RNA viral no soro dos camundongos, sugerindo que a replicação viral após o 7º dia é reduzida tendendo à eliminação do vírus do sangue.

(a) 10^5 PFU



(b) 2×10^6 PFU

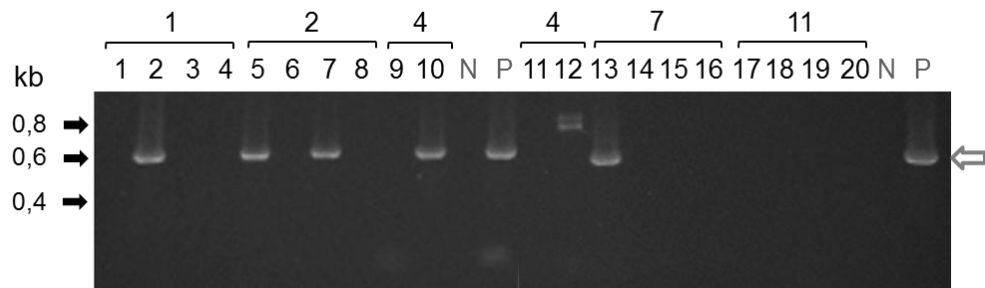


Figura 4.4: Detecção de viremia em camundongos inoculados com o vírus FA 17DD. Perfis dos produtos da RT-PCR semi-nested de amostras de soro de camundongos inoculados com o vírus FA 17DD analisados por eletroforeses em géis de agarose (1%). A dose do inóculo está indicada em cada figura e os números das amostras com os respectivos dias de coleta pós-inoculação estão indicados em cima de cada poço, onde N representa o controle negativo (sem RNA) e P o controle positivo. Os marcadores de tamanho em kb estão indicados à esquerda das figuras e a seta branca à direita indica a altura esperada da banda específica para o RNA viral.

4.2.2. Pele

Quando analisada a porção da pele dos camundongos referente ao local da inoculação com 10^5 PFU do vírus FA 17DD, foi detectado RNA viral em 1 camundongo (nº 4) no 1º dia e em 2 camundongos no 7º dia pós-inoculação (nº 9 – confirmado por repetição da RT-PCR – e nº 10) (Figura 4.5a). Não houve detecção de RNA viral nas amostras do 2º, 4º e 11º dia. Portanto, em 3 de 10 animais vacinados pode-se evidenciar a presença de RNA viral.

Quando utilizada a dose de 2×10^6 PFU do vírus FA 17DD, pode-se amplificar o fragmento de RNA viral em 5 amostras de 20 camundongos. O RNA viral foi detectado na pele de 1 camundongo no 1º dia pós-inoculação (camundongo nº 3), em 2 camundongos no 2º dia (nº 6 e 8) e em 1 no 7º dia (nº 14) (Figura 4.5b). No 4º dia, existe uma amostra fracamente positiva correspondente ao animal número 11.

No 11º dia não foi detectada qualquer banda correspondente ao amplicon de RNA viral. Estes resultados sugerem que a pele é um local de replicação primária do vírus e que, independente da dose inoculada, o vírus tende a ser eliminado, ou não mais detectado, deste tecido após o 7º dia de infecção.

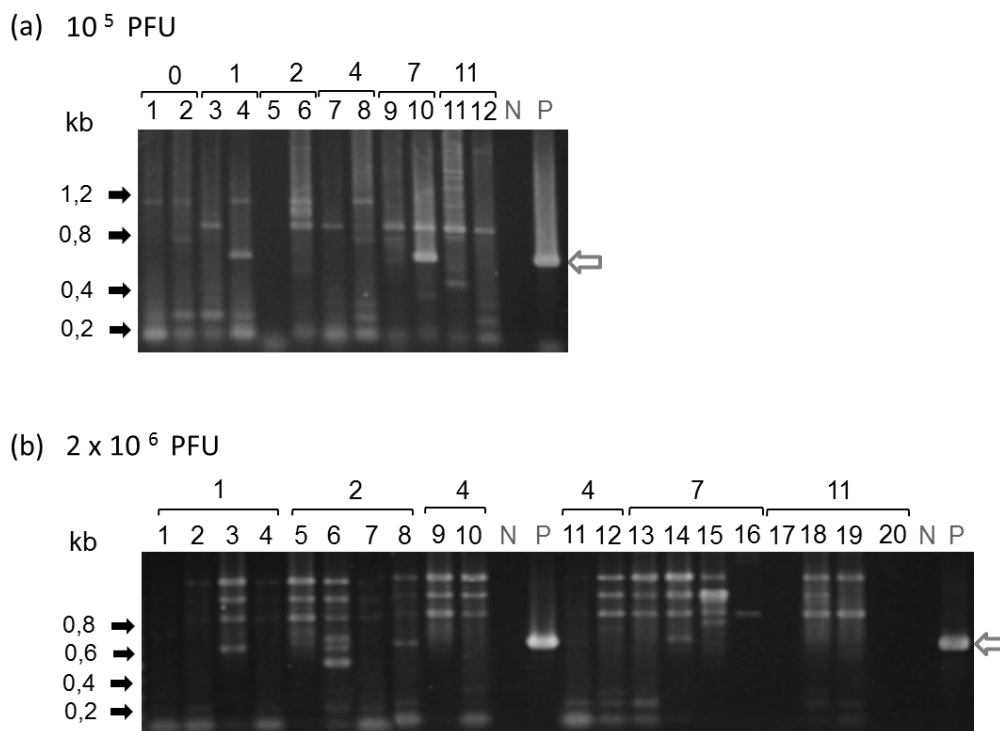


Figura 4.5: Detecção de RNA viral em amostras de pele do local da inoculação com o vírus FA 17DD. Análise por eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos da RT-PCR semi-nested. A dose do inóculo está indicada em cada figura e os números das amostras com os respectivos dias de coleta pós-inoculação estão indicados em cima de cada poço, onde N representa o controle negativo (sem RNA) e P o controle positivo. Os marcadores de tamanho em kb estão indicados à esquerda das figuras e a seta branca à direita indica a altura esperada da banda específica para o RNA viral.

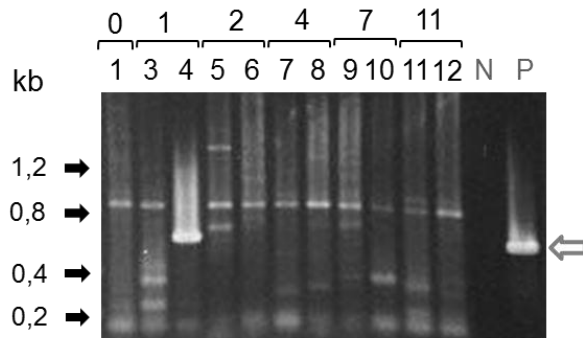
4.2.3. Linfonodo drenante

No linfonodo drenante do local da inoculação, o RNA do vírus inoculado com dose 10^5 PFU foi detectado em apenas 1 camundongo no 1º dia pós-inoculação (camundongo nº 4) (Figura 4.6a), indicando que o vírus inoculado pode atingir o linfonodo drenante no 1º dia de infecção. É interessante notar que este animal em que foi detectado vírus no linfonodo foi o mesmo que apresentou RNA viral na pele no 1º dia de infecção (camundongo nº 4).

Entretanto, na dose mais alta, de 2×10^6 PFU, o RNA viral foi detectado no linfonodo drenante de 13 dos 20 animais vacinados. Dentre os positivos estão: os 4

camundongos analisados no 1º dia pós-inoculação (camundongos nº 1-4); 3 dos 4 camundongos analisados no 2º dia (nº 5, 6 e 8); 2 dos 4 camundongos no 4º dia (nº 9 e 11); 2 dos 4 animais no 7º dia (nº 13 e 15); e 2 dos 4 animais no 11º dia (nº 18 e 20) (Figura 4.6b), demonstrando que, assim como na menor dose, o vírus atinge o linfonodo desde o 1º dia de infecção, porém com a dose maior, o vírus permanece neste órgão, em quantidades detectáveis, por 10 dias ou mais.

(a) 10^5 PFU



(b) 2×10^6 PFU

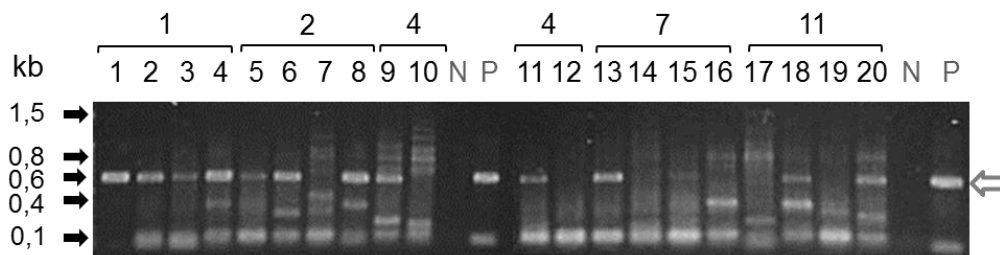


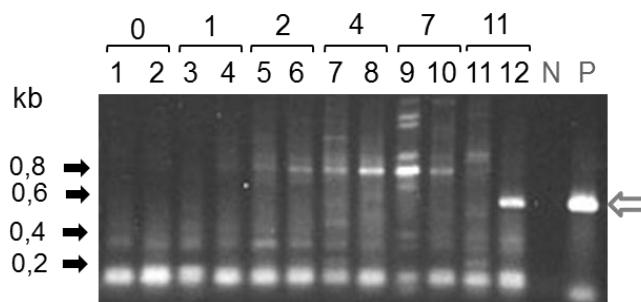
Figura 4.6: Detecção de RNA viral em amostras de linfonodo drenante do local da inoculação com o vírus FA 17DD. Análise por eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos da RT-PCR semi-nested. A dose do inóculo está indicada em cada figura e os números das amostras com os respectivos dias de coleta pós-inoculação estão indicados em cima de cada poço, onde N representa o controle negativo (sem RNA) e P o controle positivo. Os marcadores de tamanho em kb estão indicados à esquerda das figuras e a seta branca à direita indica a altura esperada da banda específica para o RNA viral.

4.2.4. Fígado

Na condição em que os camundongos foram inoculados com 10^5 PFU do vírus FA 17DD, o RNA viral foi detectado no fígado de apenas 1 em 10 camundongos vacinados no 11º dia pós-inoculação (camundongo nº 12) (Figura 4.7a). Porém, na imunização com 2×10^6 PFU, amostras de 10 em 20 camundongos

foram positivas quanto à presença de RNA viral por RT-PCR semi-nested. O RNA viral foi detectado no fígado no 1º dia pós-inoculação em 3 dos 4 camundongos analisados (camundongos nº 1, 2 e 4), no 2º dia em 1 de 4 camundongos (nº 5), no 4º dia em 2 de 4 camundongos (nº 10 e 11), e no 11º dia em 2 dos 4 camundongos (nº 18 e 20). No 7º dia, 2 camundongos apresentaram-se fracamente positivos (nº 13 e 16) (Figura 4.7b). Estes dados indicam que na dose mais alta o vírus é capaz de alcançar o fígado precocemente, desde o 1º dia de infecção, e manter a replicação neste órgão por 10 dias ou mais.

(a) 10^5 PFU



(b) 2×10^6 PFU

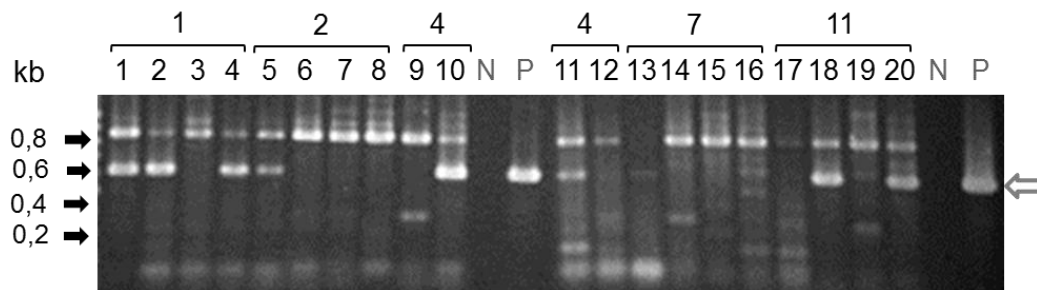


Figura 4.7: Detecção de RNA viral em amostras de fígado de camundongos inoculados com o vírus FA 17DD. Análise por eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos da RT-PCR semi-nested. A dose do inóculo está indicada em cada figura e os números das amostras com os respectivos dias de coleta pós-inoculação estão indicados em cima de cada poço, onde N representa o controle negativo (sem RNA) e P o controle positivo. Os marcadores de tamanho em kb estão indicados à esquerda das figuras e a seta branca à direita indica a altura esperada da banda específica para o RNA viral.

4.2.5. Baço

No baço de camundongos inoculados com 10^5 PFU do vírus FA 17DD, o RNA viral foi detectado nos 2 camundongos analisados no 2º dia pós-inoculação (camundongos nº 5 e 6) e não foi detectado em nenhum dos outros camundongos

(Figura 4.8a). A presença do vírus restringiu-se apenas a este tempo, não sendo detectada nos dias posteriores. Na dose 2×10^6 PFU, amplicons de RNA viral foram obtidos a partir de amostras de baço de 3 dos 4 camundongos analisados no 1º dia pós-inoculação (camundongos nº 1, 2 e 4), em 1 camundongo no 2º dia (nº 5), em 1 camundongo no 4º dia (nº 11) em 3 camundongos no 7º dia (nº 13, 14 e 16) e nos 4 camundongos no 11º dia (nº 17-20) (Figura 4.8b). Duas amostras de camundongos do 4º dia pós-inoculação (nº 9 e 10) apresentaram-se fracamente positivas, perfazendo um total de 14 amostras positivas em 20 analisadas. Estes dados indicam que com a dose mais alta, o vírus atingiu o baço mais precocemente, a partir do 1º dia, e se manteve em quantidades detectáveis por até 10 dias ou mais.

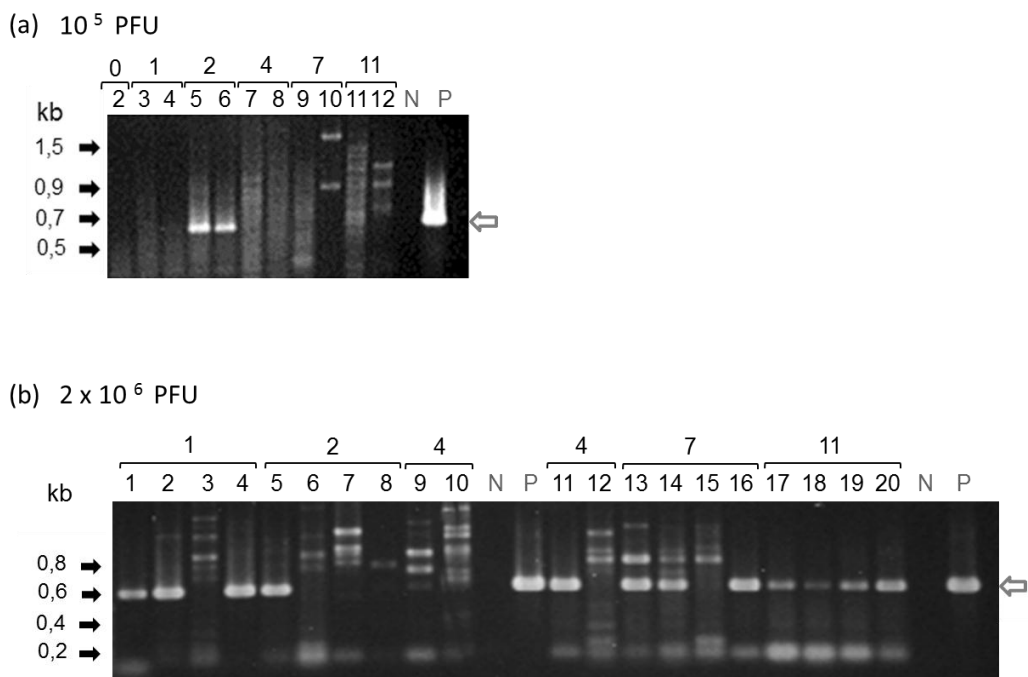


Figura 4.8: Detecção de RNA viral em amostras de baço de camundongos inoculados com o vírus FA 17DD. Análise por eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos da RT-PCR semi-nested. A dose do inóculo está indicada em cada figura e os números das amostras com os respectivos dias de coleta pós-inoculação estão indicados em cima de cada poço, onde N representa o controle negativo (sem RNA) e P o controle positivo. Os marcadores de tamanho em kb estão indicados à esquerda das figuras e a seta branca à direita indica a altura esperada da banda específica para o RNA viral.

4.3. Quantificação da carga viral por qRT-PCR em amostras de soro e órgãos de camundongos inoculados

4.3.1. Soro

Para a quantificação da carga do vírus FA 17DD presente no soro, utilizamos a qRT-PCR em uma etapa. A Figura 4.9 mostra a curva padrão utilizada para a quantificação absoluta das amostras.

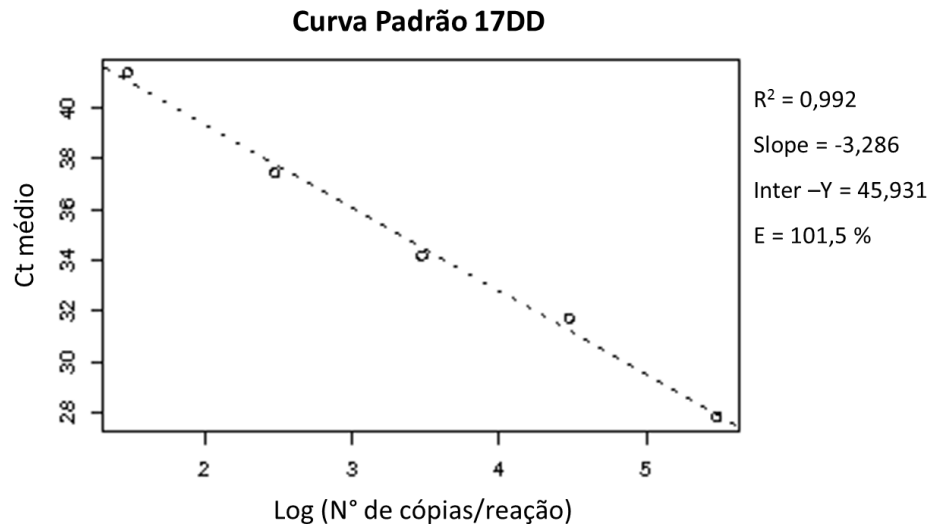


Figura 4.9: Curva padrão para quantificação absoluta da carga viral por qRT-PCR em uma etapa, utilizando concentrações de 30 a 3×10^5 cópias/reação em uma escala logarítmica de base 10. R^2 = coeficiente de determinação da reta; Slope = coeficiente angular da reta; Inter-Y = intercessão com o eixo y, onde $x = 0$; E = eficiência da reação.

A quantificação da carga viral em soro foi realizada somente para os camundongos inoculados com a dose 2×10^6 PFU. Os valores da carga viral detectada em cada amostra estão esquematizados na Tabela 4.5 e os valores médios para cada dia analisado estão expressos na Figura 4.10. Foram consideradas positivas todas as amostras com quantidades superiores ao controle (dia 0).

Foi possível quantificar a viremia no soro dos camundongos no 1º dia pós-inoculação, e após 4, 7 e 11 dias. As cargas virais obtidas foram baixas, ficando em torno de 200 cópias/reação, equivalente a cerca de 3×10^4 cópias/mL. No 2º dia, a quantidade média obtida foi 111,29 ($\pm 4,44$) cópias/reação, equivalente a $1,59 \times 10^4$ cópias/mL, mas estes valores estão no limíte da sensibilidade de detecção, próximos aos valores obtidos para o grupo de camundongos que não receberam inóculo viral.

Tabela 4.5: Quantidades normalizadas obtidas por qRT-PCR para carga viral em cada amostra de soro de camundongos inoculados com 2×10^6 PFU do vírus 17DD.

Dia	0	1	2	4	7	11
Nº de cópias	106	(1) ID	(5) 120	(9) 544	(13) 416	(17) 115
	ID	(2) 294	(6) 106	(10) 89	(14) 141	(18) 59
		(3) 107	(7) ID	(11) 119	(15) 304	(19) 428
		(4) 324	(8) 108	(12) 109	(16) 18	(20) 229
Média	106	242,39	111,29	215,24	219,96	207,61
EP	-	67,80	4,44	109,78	87,81	81,65

() = Número do camundongo referente a cada amostra de soro

EP = Erro padrão

ID = indeterminado, ou seja, abaixo do limite de detecção

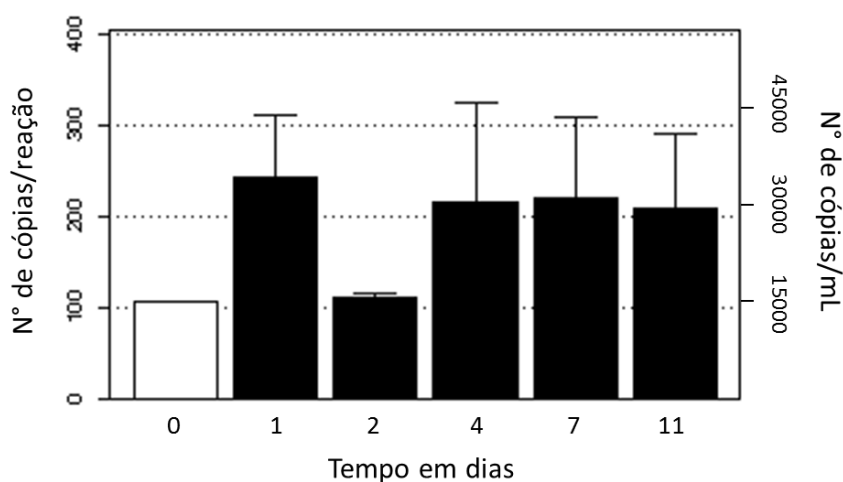


Figura 4.10: Carga viral em soros de camundongos inoculados com 2×10^6 PFU do vírus 17DD. As barras indicam a quantidade média entre os grupos com seu respectivo erro padrão.

4.3.2. Quantificação da carga viral em tecidos

Para a quantificação da carga viral em tecidos por qRT-PCR em duas etapas foram realizadas quatro curvas padrões, que foram adicionadas a cada ensaio de quantificação. A partir das quatro curvas obtidas foi estabelecida uma única curva, a partir da qual todas as amostras de tecidos de camundongos foram quantificadas (Figura 4.11). Somente as amostras de camundongos inoculados com a dose 2×10^6 PFU foram quantificadas. Foram consideradas positivas todas as amostras com quantidades superiores ao controle (dia 0).

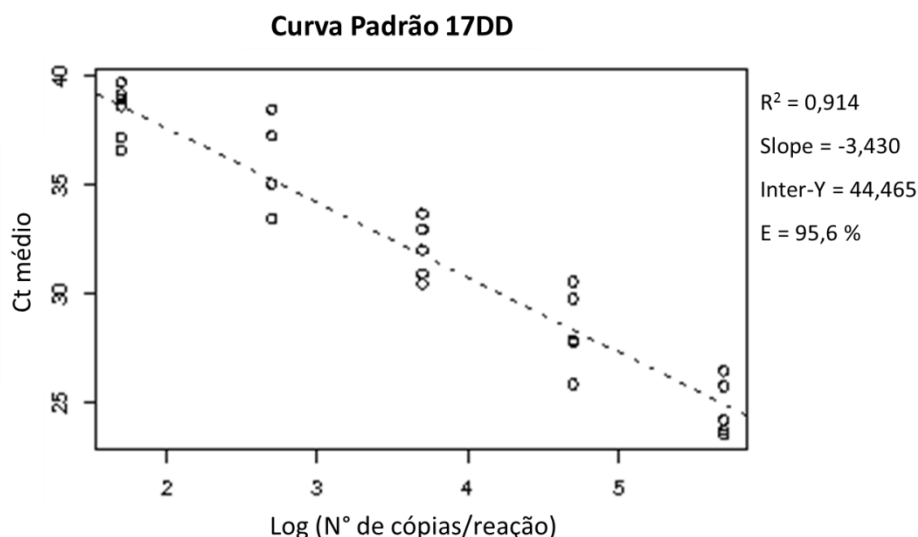


Figura 4.11: Curva padrão para quantificação absoluta da carga viral nas amostras de tecidos de camundongo por qRT-PCR em duas etapas, utilizando concentrações de 50 a 5×10^5 cópias/reação em uma escala logarítmica de base 10. R^2 = coeficiente de determinação da reta; Slope = coeficiente angular da reta; Inter-Y = intercessão com o eixo y, onde $x = 0$; E = eficiência da reação.

As quantificações realizadas nas amostras de tecidos foram normalizadas utilizando-se como controle endógeno o RNA ribossomal 18S. Para isto, foi construída uma curva padrão a partir de duas curvas obtidas em ensaios separados (Figura 4.12). A partir desta única curva foram realizadas quantificações absolutas do rRNA 18S nas amostras, utilizando-se o mesmo cDNA sintetizado para a quantificação da carga viral.

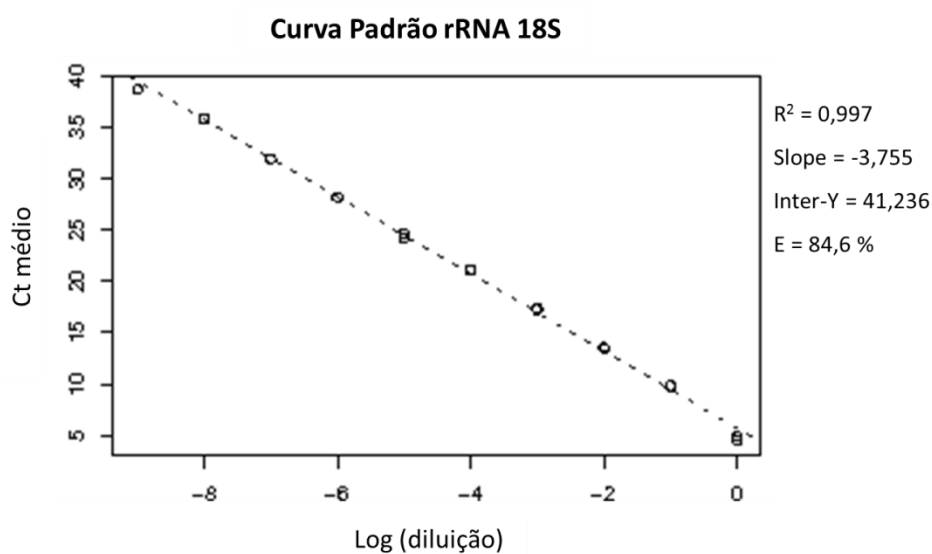


Figura 4.12: Curva padrão para quantificação absoluta do controle endógeno rRNA 18S, utilizando diluições seriadas logarítmicas de base 10. R^2 = coeficiente de determinação da reta; Slope = coeficiente angular da reta; Inter-Y = intercessão com o eixo y, onde $x = 0$; E = eficiência da reação.

Amostras que apresentaram número de cópias do RNA viral ou do rRNA 18S com erro padrão maior que 10^5 ou que obtiveram coeficiente de variação entre as triplicatas maior que 1,25 foram excluídas da análise quantitativa e estão representadas nas tabelas como “NA”.

4.3.2.1. Pele

Nas amostras de RNA extraídas da porção da pele referente ao local de inoculação, e possível local de replicação primária do vírus, a carga viral apresentou-se elevada em duas amostras do 1º dia pós-inoculação, com média entre as 4 amostras de 2476,28 (\pm 2041,36) cópias (Tabela 4.6 e Figura 4.13). No 2º dia, foi detectada carga viral elevada em apenas 1 amostra e a média entre as 4 amostras foi de 656,76 (\pm 641,73) cópias. No 4º dia, foi obtida alta carga viral também em 1 amostra e a média apresentou pequena elevação, para 1710,04 (\pm 1534,87) cópias. No 7º dia, foram obtidas altas cargas virais em 2 amostras, com média de 2415,13 (\pm 1077,05) cópias, semelhante à média encontrada no 1º dia. A mais baixa carga viral foi encontrada no 11º dia, com média de 485,74 (\pm 387,51) cópias. Estes resultados estão de acordo com as detecções por RT-PCR semi-nested, em que o RNA viral foi encontrado entre o 1º e o 7º dia de infecção, porém por qRT-PCR foi possível detectar cargas virais mais baixas no 11º dia de infecção.

Tabela 4.6: Quantidades normalizadas obtidas por qRT-PCR para carga viral em cada amostra de pele de camundongos inoculados com 2×10^6 PFU do vírus 17DD.

Dia	0	1	2	4	7	11	
Nº de cópias	306	(1) 8 (2) 23 (3) 1347 (4) 8528	(5) ID (6) 1298 (7) 15 (8) NA	(9) 6310 (10) 71 (11) 95 (12) 364	(13) 1338 (14) 3492 (15) NA (16) ID	(17) NA (18) 873 (19) 98 (20) ID	
	Média	306,00	2476,28	656,76	1710,04	2415,13	485,74
	EP	-	2041,36	641,73	1534,87	1077,05	387,51

() = Número do camundongo referente a cada amostra de pele

EP = Erro padrão

ID = Indeterminado, ou seja, abaixo do limite de detecção

NA = Não quantificado

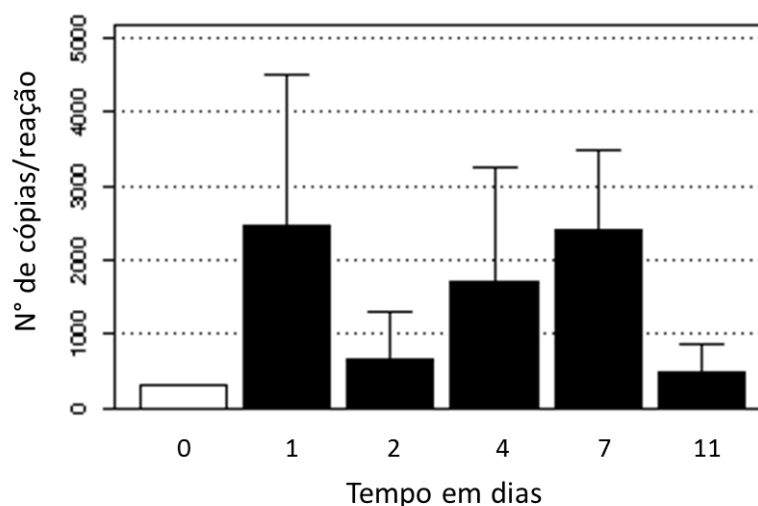


Figura 4.13: Quantificação normalizada de cópias de RNA viral na pele do local de inoculação com 2×10^6 PFU do vírus FA 17DD em camundongos. As barras indicam a quantidade média entre os grupos com seu respectivo erro padrão.

4.3.2.2. Linfonodo drenante

Nos linfonodos drenantes do local da inoculação foi detectada elevada carga viral no 1º dia pós-inoculação, com média de 8365,41 ($\pm 3402,949$) cópias (Tabela 4.7 e Figura 4.14). Nos dias subsequentes, houve uma progressiva redução da carga viral, sendo detectadas médias de 5772,38 ($\pm 4409,54$) cópias no 2º dia, 722,30 ($\pm 243,30$) cópias no 4º dia, 101,13 ($\pm 19,74$) cópias no 7º dia e 649,91 ($\pm 297,92$) cópias no 11º dia.

Os camundongos analisados no 1º e 2º dia pós-inoculação apresentaram cargas virais mais altas no linfonodo drenante que nos dias subsequentes, de acordo com o resultado da RT-PCR semi-nested em que o RNA viral foi detectado no linfonodo em mais amostras que nos outros dias.

Tabela 4.7: Quantidades normalizadas obtidas por qRT-PCR para carga viral em cada amostra de linfonodo de camundongos inoculados com 2×10^6 PFU do vírus 17DD.

Dia	0	1	2	4	7	11
Nº de cópias	91	(1) NA	(5) 1206	(9) 723	(13) 113	(17) 403
	ID	(2) 6337	(6) 2752	(10) 934	(14) 152	(18) 501
	370	(3) 3753	(7) 224	(11) 1183	(15) 66	(19) 175
		(4) 15006	(8) 18909	(12) 49	(16) 74	(20) 1520
Média	230,84	8365,42	5772,39	722,31	101,14	649,91
EP	139,51	3402,95	4409,55	243,30	19,75	297,92

() = Número do camundongo referente a cada amostra de linfonodo

EP = Erro padrão

ID = Indeterminado, ou seja, abaixo do limite de detecção

NA = Não quantificado

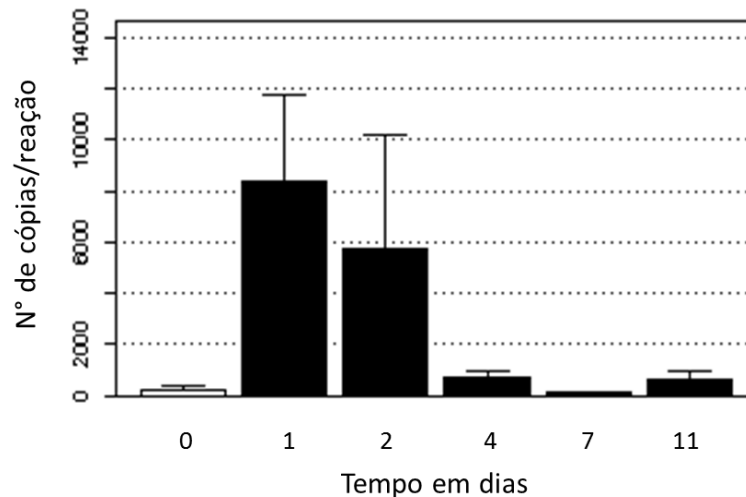


Figura 4.14: Quantificação normalizada de cópias de RNA viral no linfonodo drenante do local da inoculação com 2×10^6 PFU do vírus 17DD em camundongos. As barras indicam a quantidade média entre os grupos com seu respectivo erro padrão.

4.3.2.3. Fígado

Nas amostras de fígado de camundongo foi detectado RNA viral desde o 1º dia pós-inoculação, tanto pela RT-PCR semi-nested quanto pela qRT-PCR (Tabela 4.8 e Figura 4.15). No 1º dia obteve-se média de 629,54 ($\pm 232,45$) cópias virais, apresentando pequena redução no 2º dia, com média de 497,91 ($\pm 156,85$) cópias virais, e no 4º dia com média de 333,37 ($\pm 123,88$) cópias virais. No 7º dia, a maioria das amostras apresentou baixa quantidade de RNA viral, próximas ao controle, somente 1 amostra apresentou alta carga viral quantificada em 6294 cópias, que representou a maior carga viral de todas as amostras, o que elevou a média deste grupo para 1646,34 ($\pm 1549,33$) cópias. No 11º dia foram encontradas cargas virais baixas, porém uma amostra com 1168 cópias, obtendo-se média de 433,29 ($\pm 245,60$) cópias, semelhante às médias dos dias 2 e 4. Estes resultados sugerem que o vírus alcança o fígado desde o 1º dia de infecção e, em geral, mantém uma replicação controlada neste órgão, em que as cargas virais parecem permanecer constantes, porém com grande variação entre os camundongos.

Tabela 4.8: Quantidades normalizadas obtidas por qRT-PCR para carga viral em cada amostra de fígado de camundongos inoculados com 2×10^6 PFU do vírus 17DD.

Dia	0	1	2	4	7	11
Nº de cópias	80	(1) 997	(5) 142	(9) 175	(13) 6294	(17) 199
	152	(2) 436	(6) 362	(10) 689	(14) 71	(18) 134
	148	(3) 63	(7) 863	(11) 316	(15) 166	(19) 233
		(4) 1023	(8) 625	(12) 154	(16) 55	(20) 1168
Média	126,67	629,54	497,92	333,37	1646,34	433,29
EP	23,34	232,45	156,85	123,88	1549,33	245,60

() = Número do camundongo referente a cada amostra de fígado

EP = Erro padrão

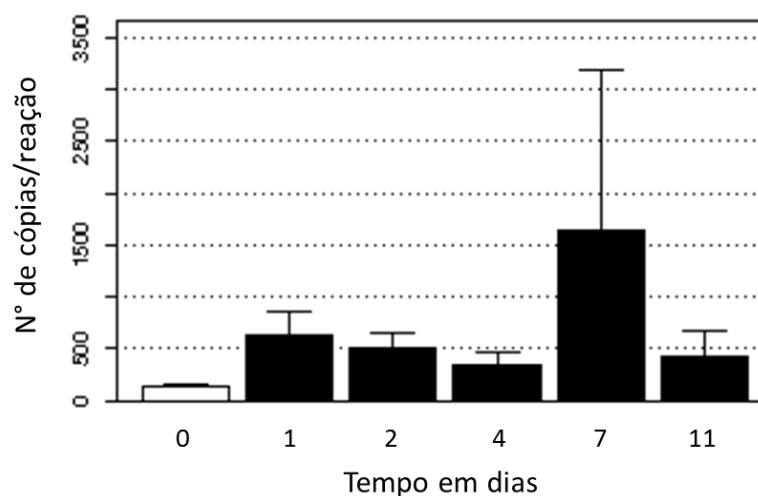


Figura 4.15: Quantificação normalizada de cópias de RNA viral no fígado de camundongos inoculados com 2×10^6 PFU do vírus 17DD. As barras indicam a quantidade média entre os grupos com seu respectivo erro padrão.

4.3.2.4. Baço

As quantificações da carga viral no baço foram prejudicadas pelos valores elevados obtidos no controle (dia 0) (Tabela 4.9 e Figura 4.16). As quantidades médias obtidas para a carga viral nos dias 1 e 2 ficaram semelhantes ao controle, no 4º dia a média da carga viral apresentou-se bastante reduzida, muito abaixo do controle. Somente nos dias 7 e 11 a quantificação da carga viral apresentou elevação.

Tabela 4.9: Quantidades normalizadas obtidas por qRT-PCR para carga viral em cada amostra de baço de camundongos inoculados com 2×10^6 PFU do vírus 17DD.

Dia	0	1	2	4	7	11	
Nº de cópias	1607	(1) 2122 (2) 1140 (3) 237 (4) 1930	(5) 1201 (6) 1768 (7) ID (8) ID	(9) ID (10) ID (11) 107 (12) 150	(13) 695 (14) 167 (15) 89 (16) 6164	(17) 587 (18) 2007 (19) 1978 (20) 3513	
	Média	1607	1357,05	1484,32	128,32	1778,85	2021,14
	EP	-	429,78	283,27	21,68	1468,01	597,51

() = Número do camundongo referente a cada amostra de baço

EP = Erro padrão

ID = indeterminado, ou seja, abaixo do limite de detecção

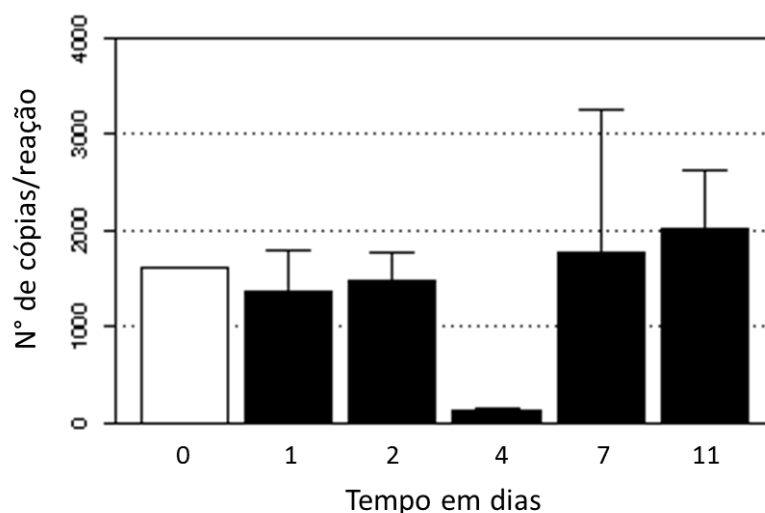


Figura 4.16: Quantificação normalizada de cópias de RNA viral no baço de camundongos inoculados com 2×10^6 PFU do vírus 17DD. As barras indicam a quantidade média entre os grupos com seu respectivo erro padrão.

A quantificação absoluta da carga viral nas amostras de baço sem a normalização pelo rRNA 18S não apresentou problema no grupo controle (Tabela 4.10 e Figura 4.17). Entretanto, nos dias 2 e 4 não foi detectada carga viral significativa nas amostras. No 1º dia pós-inoculação foi detectada pequena carga viral com média de 412 cópias. Nos dias 7 e 11 houve progressivo aumento da carga viral com médias de 1692 e 4457 cópias, respectivamente. Estes resultados estão mais de acordo com o resultado da RT-PCR semi-nested em que foi detectado RNA viral em mais camundongos no 1º, 7º e 11º dia do que no 2º e 4º dia. No 11º dia, a RT-PCR semi-nested detectou RNA viral em todas as amostras de baço analisadas, e a qRT-PCR indicou alta carga viral em todas essas amostras.

Tabela 4.10: Quantidades não normalizadas obtidas por qRT-PCR para carga viral em cada amostra de baço de camundongos inoculados com 2×10^6 PFU do vírus 17DD.

Dia	0	1	2	4	7	11
Nº de cópias	192	(1) 262	(5) 176	(9) ID	(13) 492	(17) 1320
		(2) 736	(6) 122	(10) ID	(14) 269	(18) 5090
		(3) 246	(7) ID	(11) 243	(15) 108	(19) 3380
		(4) 402	(8) ID	(12) 135	(16) 5900	(20) 8034
Média	192	411,96	149,52	189,61	1692,49	4456,52
EP	-	113,75	26,80	53,75	1404,85	1420,01

() = Número dos camundongos referentes a cada amostra de baço

EP = Erro padrão

ID = indeterminado, ou seja, abaixo do limite de detecção

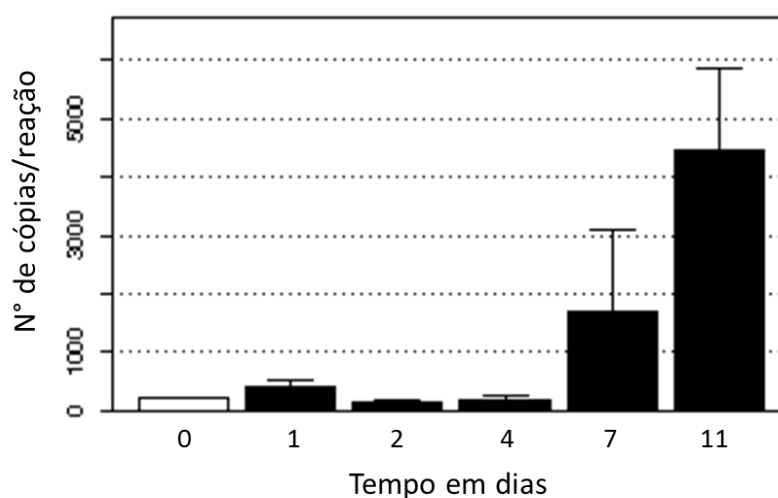


Figura 4.17: Quantificação não normalizada da carga viral no baço de camundongos inoculados com 2×10^6 PFU do vírus 17DD. As barras indicam a quantidade média entre os grupos com seu respectivo erro padrão.

4.4. Comparação entre os tecidos

Em todos os tecidos analisados foi possível detectar e quantificar o RNA viral, alguns mais precocemente e outros mais tardiamente no curso da infecção (Tabela 4.13 e Figura 4.18). O linfonodo drenante foi o órgão que apresentou carga viral mais elevada, com pico no 1º dia pós-inoculação. Na pele também foi detectada carga viral elevada no 1º e 7º dia de infecção. O fígado apresentou carga viral mais baixa que os outros órgãos, porém com significativa elevação em relação ao controle e com a maior carga viral sendo detectada em uma amostra do 7º dia. O baço manteve quantidades próximas ao controle nos dias 1, 2 e 4, mas apresentou

elevação no 7^o e 11^o dia. No soro foi detectada baixa viremia, sem grandes alterações desde o 1^o dia de infecção.

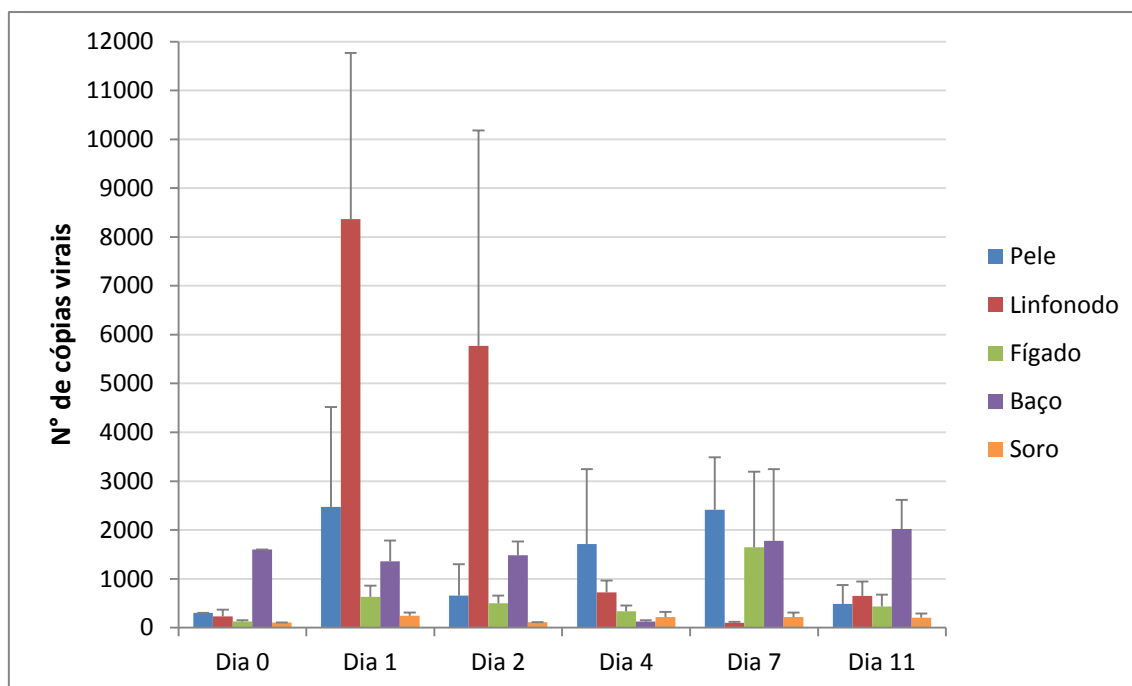


Figura 4.18: Carga viral normalizada quantificada por qRT-PCR em todos os tecidos analisados.

4.5. Comparação entre as técnicas

A qRT-PCR mostrou-se mais sensível que a RT-PCR semi-nested para detecção do RNA viral, sendo capaz de quantificar mesmo pequenas quantidades de RNA viral, não detectáveis pela RT-PCR semi-nested. Em apenas algumas amostras a RT-PCR semi-nested foi capaz de detectar RNA viral, mesmo com quantidades muito baixas ou indetectáveis por qRT-PCR. Apenas nas amostras de baço a RT-PCR semi-nested se mostrou mais sensível devido aos altos valores de “background” obtidos nas amostras controle por qRT-PCR. A Tabela 4.13 mostra todos os resultados obtidos através da RT-PCR semi-nested e da qRT-PCR.

No soro a qRT-PCR foi capaz de detectar RNA viral em 14 amostras, enquanto a RT-PCR semi-nested detectou apenas 5 das 20 amostras testadas (Tabela 4.11). Entretanto 2 amostras de soro consideradas positivas pela RT-PCR semi-nested ficaram abaixo no nível quantificável por qRT-PCR. Nas amostras de pele, a RT-PCR semi-nested detectou RNA viral em 5 das 20 amostras testadas, enquanto a qRT-PCR quantificou carga viral em 4 amostras positivas por RT-PCR semi-nested e em mais 5 amostras, totalizando 9 amostras positivas. No linfonodo,

13 amostras foram consideradas positivas por RT-PCR semi-nested. Destas, 11 amostras apresentaram-se também positivas por qRT-PCR, sendo que 2 amostras negativas por RT-PCR semi-nested foram quantificadas como positivas por qRT-PCR. No fígado, 10 amostras apresentaram amplificação por RT-PCR semi-nested, enquanto 17 foram consideradas positivas por qRT-PCR, embora com quantidades baixas de RNA viral. Apenas 1 amostra de fígado positiva por RT-PCR semi-nested foi considerada negativa por qRT-PCR. No baço, a RT-PCR semi-nested detectou RNA viral em 14 das 20 amostras testadas, porém a qRT-PCR foi capaz de quantificar carga viral em apenas 7 amostras, incluindo uma amostra negativa por RT-PCR semi-nested.

Tabela 4.11: Comparação entre o número de amostras positivas detectadas por RT-PCR semi-nested e por qRT-PCR e o total obtido por ambas as técnicas.

Dia	Soro		Pele		Linfonodo		Fígado		Baço		Ambos
	RT-PCRsn	qRT-PCR	RT-PCRsn	qRT-PCR	RT-PCRsn	qRT-PCR	RT-PCRsn	qRT-PCR	RT-PCRsn	qRT-PCR	
1	1/4	3/4	1/4	2/4	4/4	4/4	3/4	3/4	3/4	2/4	15/20
2	2/4	2/4	2/4	2/4	3/4	3/4	1/4	4/4	1/4	1/4	14/20
4	1/4	3/4	1/4	2/4	2/4	3/4	2/4	4/4	3/4	0/4	17/20
7	1/4	3/4	1/4	2/4	2/4	0/4	2/4	2/4	3/4	1/4	13/20
11	0/4	3/4	0/4	1/4	2/4	3/4	2/4	4/4	4/4	3/4	15/20
Total	5/20	14/20	5/20	9/20	13/20	13/20	10/20	17/20	14/20	7/20	74/100
Ambos	16/20		10/20		15/20		18/20		15/20		

No total das 100 amostras testadas, 74 apresentaram resultado positivo por alguma das técnicas utilizadas, indicando presença de RNA viral no tecido ou soro dos camundongos inoculados (Tabela 4.12). Em 14 amostras, a RT-PCR semi-nested foi capaz de detectar RNA viral presente em níveis não quantificáveis pela qRT-PCR. Porém a qRT-PCR foi capaz de quantificar carga viral em 27 amostras não detectadas por RT-PCR semi-nested. 26 amostras analisadas se revelaram negativas para presença de RNA viral, ou as técnicas não foram capazes de detectá-lo.

Tabela 4.12: Número de amostras positivas e negativas por RT-PCR semi-nested e qRT-PCR.

	RT-PCRsn	qRT-PCR	Ambos
Positivos	47	60	74
Negativos	53	40	26
Total	100		

Tabela 4.13: Resultados obtidos de todos os tecidos pelas técnicas de RT-PCR semi-nested (SN) e qRT-PCR (quantidades normalizadas)

Camundongo	Dia	Soro		Pele		Linfonodo		Fígado		Baço	
		SN	qRT-PCR	SN	qRT-PCR	SN	qRT-PCR	SN	qRT-PCR	SN	qRT-PCR
Controle	0		105,93		305,74		230,84		126,89		1606,91
1	1	-	ID	-	8	+	NA	+	997	+	2122
2		+	295	-	23	+	6337	+	436	+	1140
3		-	108	+	1347	+	3753	-	63	-	237
4		-	324	-	8528	+	15006	+	1023	+	1930
Média			242,39		2476,28		8365,42		629,54		1357,05
Erro Padrão			± 67,80		± 2041,36		± 3402,95		± 232,45		± 429,78
5	2	+	120	-	ID	+	1206	+	142	+	1201
6		-	106	+	1298	+	2752	-	362	-	1768
7		+	ID	-	15	-	224	-	863	-	ID
8		-	108	+	NA	+	18909	-	625	-	ID
Média			111,29		656,76		5772,39		497,92		1484,32
Erro Padrão			± 4,44		± 641,73		± 4409,55		± 156,85		± 283,27
9	4	-	544	-	6310	+	723	-	175	+	ID
10		+	89	-	71	-	934	+	689	+	ID
11		-	119	+	95	+	1183	+	316	+	107
12		-	109	-	364	-	49	-	154	-	150
Média			215,24		1710,04		722,31		333,37		128,32
Erro Padrão			± 109,78		± 1534,87		± 243,30		± 123,88		± 21,68
13	7	+	416	-	1338	+	113	+	6294	+	695
14		-	141	+	3492	-	152	-	71	+	167
15		-	304	-	NA	+	66	-	166	-	89
16		-	18	-	ID	-	74	+	55	+	6164
Média			219,96		2415,13		101,14		1646,34		1778,85
Erro Padrão			± 87,81		± 1077,05		± 19,75		± 1549,33		± 1468,01
17	11	-	115	-	NA	-	403	-	199	+	587
18		-	59	-	873	+	501	+	134	+	2007
19		-	428	-	98	-	175	-	233	+	1978
20		-	229	-	ID	+	1520	+	1168	+	3513
Média			207,61		485,74		649,91		433,29		2021,14
Erro Padrão			± 81,65		± 387,51		± 297,92		± 245,60		± 597,51

Em azul = positivo, em vermelho = negativo por qRT-PCR;

SN = RT-PCR Semi-Nested, positivo (+) ou negativo (-);

ID = indeterminado, ou seja, abaixo do limite de detecção;

NA = não quantificado

4.6. Dosagem de marcadores de função hepática

Para determinar o grau de comprometimento hepático após proliferação do vírus FA 17DD neste órgão, dosamos o nível das transaminases (AST e ALT) e de bilirrubina total no soro de camundongos, 7 dias após a inoculação com o vírus FA 17DD (grupo 17DD) ou somente com o meio de cultura (grupo *mock*). Inicialmente cada grupo continha 15 camundongos, porém foram descartadas 2 amostras do grupo *mock* e 4 do grupo 17DD devido a hemólise dos soros, que poderia gerar artefatos.

Os níveis das transaminases apresentaram grande variação entre as amostras de cada camundongo. Entretanto, ao comparar a mediana dos resultados obtidos no grupo *mock* com a mediana do grupo 17DD para ambas as enzimas, não foram obtidas diferenças significativas quando analisadas pelo teste *t* (AST: $P = 0,59$; ALT: $P = 0,66$) (Figura 4.19).

Os níveis de bilirrubina total estiveram abaixo do limite de detecção ($< 0,500$ mg/dL) em todas as amostras incluídas na análise.

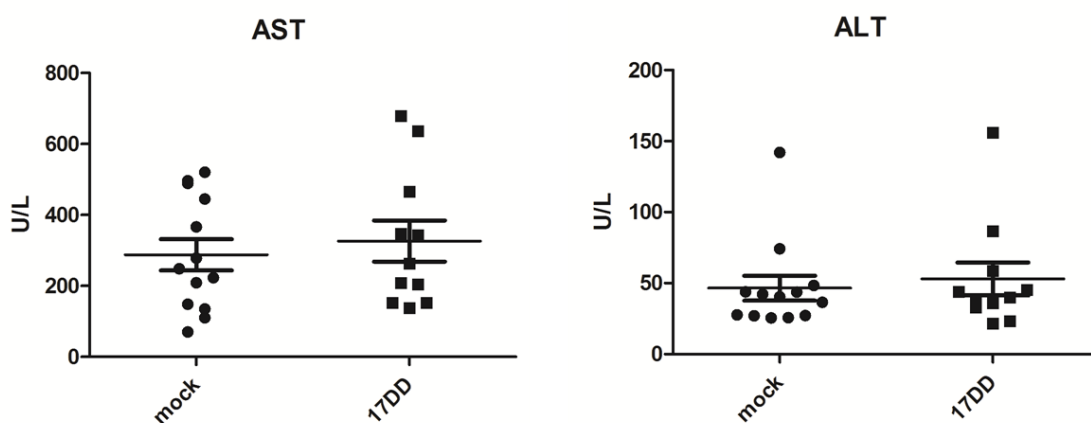


Figura 4.19: Dosagem das transaminases (AST e ALT) no soro de camundongos inoculados com o vírus FA 17DD. Cada ponto do gráfico representa a dosagem em um camundongo e a mediana dos resultados obtidos em cada grupo está indicada por uma linha horizontal, com seu desvio padrão.

4.7. Dosagem de citocinas séricas

Para definir o padrão de ativação do sistema imune induzido pela vacina, imunizamos camundongos com o vírus vacinal FA 17DD e dosamos várias citocinas séricas que poderiam estar alteradas.

Não foram encontradas diferenças significativas entre as amostras séricas dos camundongos inoculados com o vírus FA 17DD e os grupos controles *mock* (camundongos inoculados com meio de cultura) e dia 0 (camundongos que não receberam inóculo) em nenhuma das citocinas (Figuras 4.20 e 4.21) ou quimiocinas (Figura 4.22) analisadas.

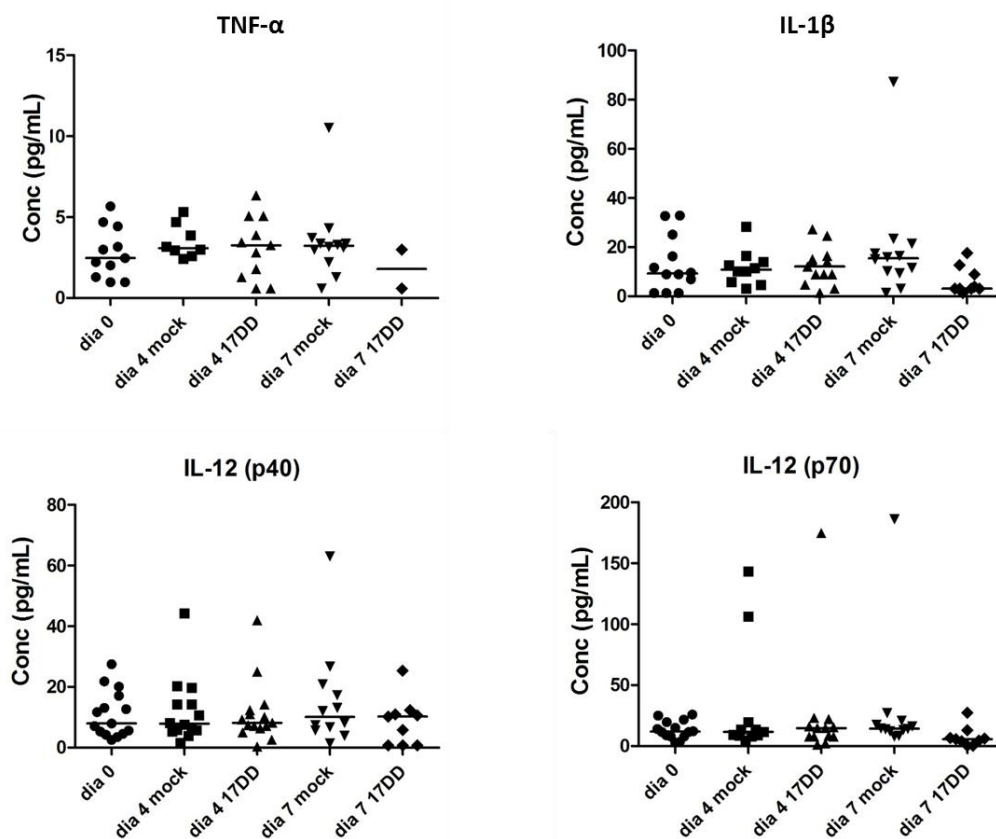


Figura 4.20: Detecção de citocinas pró-inflamatórias envolvidas com a resposta imune inata em amostras séricas de camundongos inoculados com o vírus FA 17DD. Cada ponto do gráfico representa a dosagem em um camundongo e a mediana dos resultados obtidos em cada grupo está indicada por uma linha horizontal. Valores obtidos nos controles positivos do ensaio: TNF- α 132 a 1259 pg/mL; IL-1 β 111 a 1056 pg/mL; IL-12(p40) 139 a 772 pg/mL; IL-12(p70) 109 a 640 pg/mL.

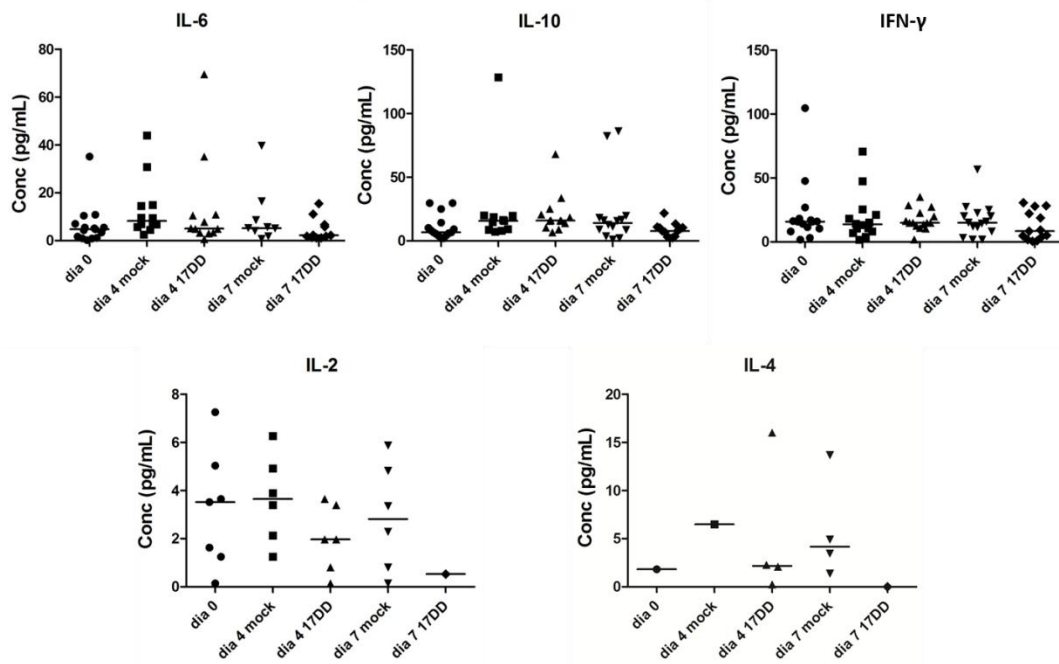


Figura 4.21: Detecção de citocinas mediadoras e reguladoras da resposta imune inata e adaptativa em camundongos inoculados com o vírus FA 17DD. Cada ponto do gráfico representa a dosagem de um camundongo e a mediana dos resultados obtidos em cada grupo está indicada por uma linha horizontal. Valores obtidos nos controles positivos do ensaio: IL-6 128 a 720 pg/mL; IL-10 140 a 700 pg/mL; IFN- γ 109 a 712 pg/mL; IL-2 144 a 788 pg/mL; IL-4 127 a 658 pg/mL.

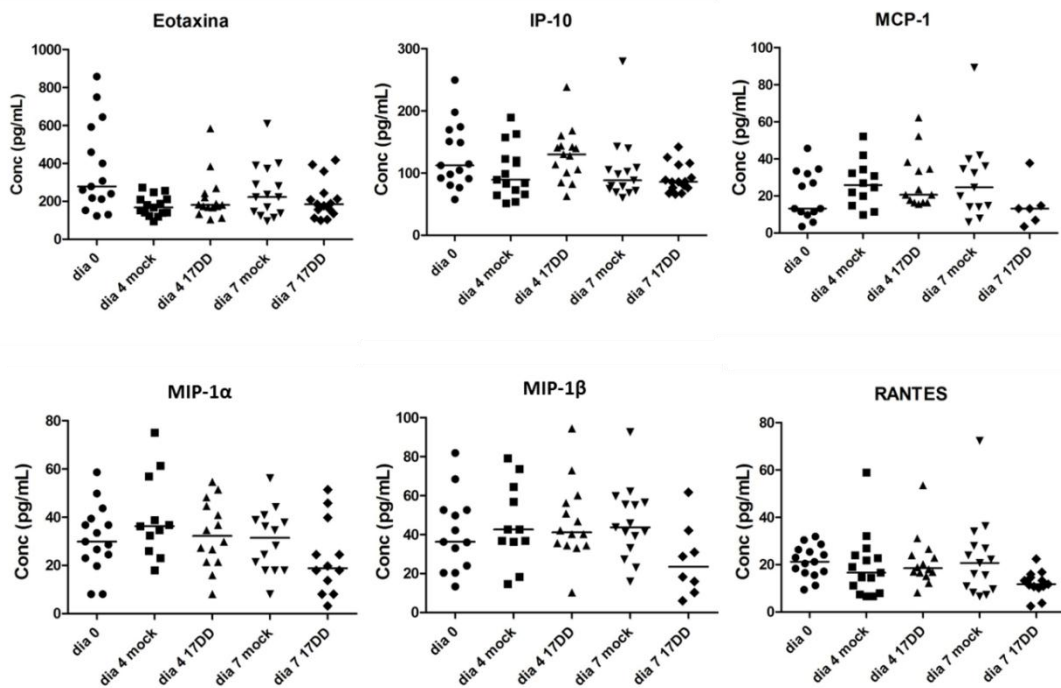


Figura 4.22: Detecção de quimiocinas em amostras séricas de camundongos inoculados com o vírus FA 17DD. Cada ponto do gráfico representa a dosagem em um camundongo e a mediana dos resultados obtidos em cada grupo está indicada por uma linha horizontal. Valores obtidos nos controles positivos do ensaio: Eotaxina 118 a 915 pg/mL; IP-10 120 a 717 pg/mL; MCP-1 115 a 1041 pg/mL; MIP-1 α 145 a 881 pg/mL; MIP-1 β 129 a 841 pg/mL; RANTES 116 a 1169 pg/mL.

5. DISCUSSÃO

5.1. Aspectos técnicos

O vírus da febre amarela vacinal 17D constitui uma das melhores vacinas humanas disponíveis até o momento (49). Este trabalho visa o estabelecimento de um modelo para estudo da infecção pelo vírus FA vacinal 17D, que poderia ser utilizado como base para caracterização de vírus recombinantes construídos a partir do vírus 17D como vetor, para avaliação de novos candidatos vacinais.

Nosso objetivo inicial era determinar a dispersão viral após a imunização com o vírus FA 17DD. Desse modo, foram utilizadas duas técnicas moleculares para a detecção de RNA viral em amostras de soro e tecidos para evidenciar a presença e replicação do vírus em vários órgãos de camundongos vacinados com o vírus FA 17DD. Em uma etapa inicial, de padronização das técnicas, investigamos a faixa de sensibilidade da RT-PCR semi-nested e da qRT-PCR. Verificamos que a RT-PCR semi-nested é capaz de detectar RNA viral de suspensões contendo de 10 a 10^5 PFU do vírus FA 17DD, que equivale a $6,67 \times 10^{-1}$ a $6,67 \times 10^3$ PFU/reação. Embora na presença de RNA total de um tecido com grande capacidade de produção de proteínas, portanto bastante abundante em RNAs endógenos, como o fígado, a técnica foi capaz de detectar RNA viral com as mesmas quantidades de vírus testadas anteriormente, porém revelando bandas mais fracas quando analisadas por eletroforese. Isto sugere que a quantidade de RNA endógeno do tecido interfere na sensibilidade da técnica, porém esta ainda é sensível o suficiente para detectar RNA viral de quantidades a partir de 10 PFU.

Ao contrário do teste de sensibilidade realizado para a RT-PCR semi-nested, que utilizou RNA viral extraído de diluições seriadas do vírus em suspensão, quantificado em PFU, a sensibilidade da qRT-PCR foi testada em função de um RNA padrão sintético, que foi empregado para estabelecimento da curva padrão do ensaio de quantificação absoluta, quantificado em número de cópias. De acordo com a correlação encontrada por Bae *et al* (89) em que o número de cópias virais quantificadas por qRT-PCR corresponde a 1000 a 5000 vezes o número de partículas infecciosas determinado por plaqueamento, em PFU, a menor concentração de RNA viral testada por RT-PCR semi-nested corresponderia a concentrações entre 667 e 3335 cópias/reação. Como estas concentrações estão muito acima do limite de detecção da qRT-PCR e não foram testadas concentrações

menores por RT-PCR semi-nested, não podemos comparar a sensibilidade das duas técnicas baseando-se nestes testes.

Ao compararmos a sensibilidade dos dois diferentes protocolos de qRT-PCR utilizados, a qRT-PCR em duas etapas mostrou-se mais sensível que a qRT-PCR em uma etapa, sendo capaz de detectar RNA viral de uma concentração 10 vezes menor do RNA padrão sintético. Acreditamos que o maior volume de RNA utilizado para a etapa da transcrição reversa e a utilização de “primers” aleatórios nesta etapa contribuem para a melhora da sensibilidade da reação. A sensibilidade de 20 cópias/reação observada no protocolo de qRT-PCR em uma etapa resulta em um limite de detecção de 2143 cópias/mL de soro, quando considerado que em cada reação são utilizados 4 µL de um total de 60 µL de RNA extraído de 140 µL de soro. Este limite é bastante alto ao se pensar que estamos quantificando um vírus atenuado em um modelo animal que não reproduz a infecção como no homem e macaco rhesus (124), portanto, se deveria esperar baixas viremias nos camundongos inoculados. Em contrapartida, a qRT-PCR em uma etapa possui a vantagem da menor manipulação das amostras, reduzindo o risco de contaminação e erros de pipetagem.

Verificamos que, assim como na RT-PCR semi-nested, a presença de RNA endógeno dos tecidos, com concentrações superiores a 50 ng/reação, também pode interferir com a quantificação do RNA viral por qRT-PCR. Assim, as quantificações da carga viral em amostras de tecidos que contêm grandes quantidades de RNA endógeno, como o fígado, podem estar subestimadas.

O fragmento de RNA transcrito *in vitro* e purificado demonstrou boa qualidade e foi considerado apropriado para estabelecimento da curva padrão para a quantificação absoluta da carga viral. Porém, assim como nos ensaios de qRT-PCR padronizados por Bae *et al* (89) e por Trindade *et al* (91), baixas concentrações deste RNA apresentaram pouca reprodutibilidade, resultando em altos coeficientes de variação. Este problema pode refletir na dificuldade em quantificar amostras com baixas cargas virais, próximas ao limite de detecção da técnica, em que a precisão da quantificação do RNA viral pode ser baixa. Para tentar minimizar este problema, todas as amostras foram analisadas em triplicatas.

Outro ponto importante nesta abordagem foi a normalização da quantificação da carga viral nos tecidos através da utilização do controle endógeno, essencial para

remover erros ocasionados por diferenças na qualidade e na quantidade de RNA total presente nas amostras (devido à diferença na massa de tecido extraída ou na eficiência de extração do RNA) e por erros introduzidos na etapa de transcrição reversa. A escolha do gene de referência a ser usado como controle endógeno é bastante delicada, pois como a quantificação é feita a partir do RNA transcrito, o nível de expressão deste gene deve ser constante no tecido avaliado, não deve ser alterado pela replicação viral e não pode haver variação interindividual. A qRT-PCR é mais comumente usada em estudos de expressão gênica, os quais utilizam rotineiramente genes de referência como controles endógenos para normalização de quantificações relativas de mRNAs. Genes como: β -actina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), fator de alongamento 1 (EF-1), RNA ribossomal 18S e 28S (rRNA 18S e 28S) são frequentemente utilizados (125). Radonic *et al* (126) avaliaram vários genes de referência para estudos de expressão gênica em cultura células infectadas com diversos vírus, incluindo o vírus FA 17D. Em geral, os melhores genes avaliados foram o gene da proteína ligadora do TATA-Box e o gene da peptidil prolil isomerase A, com bons resultados também para o gene da β 2-microglobulina e GAPDH, porém neste estudo não foi avaliado o rRNA 18S. Jarosova e Kundu (127) investigaram sete genes de referência como controles endógenos, incluindo o rRNA 18S, para estudos de infecção viral em plantas. Neste estudo, o rRNA 18S, o GAPDH e o gene da β -tubulina se revelaram os mais estáveis em células infectadas com o BYDV (do inglês “*Barley Yellow Dwarf Virus*”). Jorgensen *et al* (128) também avaliaram estabilidade de sete genes de referência em células infectadas com o Vírus da Anemia Infecciosa de Salmão (ISAV, do inglês “*Infectious Salmon Anemia Virus*”), tendo o rRNA 18S como o mais estável, enquanto outros genes apresentaram níveis reduzidos de expressão, afetados pela infecção viral. O RNA ribossomal parece ser o menos afetado pela replicação viral devido à dependência dos ribossomos ou simplesmente por sua robustez, compondo a maior parte do RNA total de uma célula.

Assim, julgamos que o rRNA 18S seria um bom controle endógeno para normalização da carga viral em nosso estudo. Porém, os níveis de expressão deste gene podem ser bastante diferentes ao compararmos diferentes tipos de tecidos. Portanto, a quantificação da carga viral deve ser normalizada em cada tecido separadamente. Outra desvantagem deste controle é que, por estar presente em uma quantidade muito superior ao RNA viral, seria muito difícil realizar um ensaio

multiplex, em que os dois alvos (RNA viral e rRNA 18S) seriam amplificados na mesma reação, devido à competição que o rRNA 18S iria impor contra o RNA viral. Este tipo de ensaio seria ideal para excluir erros de pipetagem e variações nas reações em diferentes poços. Não existe um gene controle ideal para todos os experimentos e, portanto, cada estudo deve avaliar qual o melhor gene a ser utilizado no seu caso. O que vários autores recomendam é que sejam usados dois ou três genes diferentes como controles endógenos em um experimento de qRT-PCR (126, 127, 129).

Jabs *et al* (130) relataram um protocolo de qPCR normalizado para quantificação da carga do Vírus Epstein-Barr (EBV) em células mononucleares sanguíneas, afirmando que a normalização aumentou a sensibilidade do ensaio e a precisão da quantificação. Em nosso estudo, a normalização alterou bastante o resultado final da carga viral nas amostras de tecido, aumentando os valores de carga viral obtidos de amostras contendo menos RNA total que outras, tornando o ensaio mais sensível e a quantificação mais precisa. Além disto, algumas amostras que apresentaram resultado negativo, ou fracamente positivo, por RT-PCR semi-nested revelaram altas cargas virais após a normalização dos resultados obtidos por qRT-PCR, como por exemplo: amostras de pele dos camundongos 4, 9 e 18; amostra de linfonodo do camundongo 10; amostra de fígado do camundongo 13; e amostra de baço do camundongo 6. Isto demonstra o aumento da sensibilidade do ensaio de qRT-PCR normalizado comparado ao RT-PCR semi-nested, que não foi normalizado.

Entretanto, no caso das amostras de baço a normalização apresentou problemas, pois os valores obtidos na condição controle, ou baço de animal não infectado, tornaram-se altos. Isto acarretou em um “cut-off” muito alto baseado na amplificação inespecífica, diminuindo a sensibilidade da determinação da carga viral neste órgão. Assim, muitas amostras positivas apresentaram-se abaixo do valor do controle e, portanto, foram consideradas negativas. Este foi o único tecido em que a normalização não melhorou os resultados obtidos pela qRT-PCR. Neste caso, a quantificação não normalizada está mais de acordo com os resultados obtidos por RT-PCR semi-nested, em que parece haver mais amostras positivas no 1^o, 7^o e 11^o dia de infecção.

A quantificação da carga viral nas amostras de soro não pode ser normalizada através da amplificação de controles endógenos devido à ausência de RNAs endógenos e, portanto, não é possível controlar a etapa de transcrição reversa, deixando estes resultados suscetíveis a erros. Entretanto, neste tipo de amostra, erros relacionados com a etapa de extração de RNA são mínimos, uma vez que foi padronizado um mesmo volume de soro para todas as amostras e a eficiência da extração de RNA neste tipo de amostra envolve menor variação que em amostras de tecido. Apesar disto, a quantificação da carga viral em amostras de soro apresentou grande variação entre as triplicatas. Acreditamos que esta imprecisão seja devido a baixos valores de carga viral, que ficaram próximos do limite de detecção da técnica, em que é comum haver altos coeficientes de variação. A melhora na sensibilidade desta técnica contribuiria para a maior precisão das quantificações. Tang *et al* (95) descreveram um protocolo de qRT-PCR em uma etapa altamente sensível para quantificação do Vírus do Oeste do Nilo em amostras de plasma humano, capaz de detectar 10 cópias/mL. O aumento da sensibilidade foi alcançado através da utilização de um volume maior de plasma (500 µL, enquanto o nosso protocolo utilizou 140 µL) submetido à extração de RNA, aliado à utilização de uma proporção maior de amostra de RNA na reação de qRT-PCR (23 µL para um volume final de 50 µL, enquanto o nosso protocolo utilizou 4 µL para um volume final de 20 µL) e uma reação bastante sensível (capaz de detectar 2,3 cópias/reação). Outro aspecto interessante do trabalho destes autores foi a utilização de um fragmento de RNA sintético que serviu como controle interno capaz de controlar todas as etapas da técnica. Este fragmento de RNA foi adicionado a cada amostra no momento da extração do RNA e amplificado simultaneamente ao RNA viral (na mesma reação) pelo mesmo par de primers, porém com sondas diferentes. Assim, foi possível verificar erros na quantificação do RNA viral, baseado na quantificação do controle interno.

5.2. O modelo murino para estudo do vírus FA vacinal

O modelo murino para estudo do vírus FA difere de modelos primatas não humanos por não desenvolver a doença viscerotrópica nem os sinais clínicos típicos da doença, como hepatite aguda e febre hemorrágica. Pelo contrário, o vírus FA se mostra mais neurotrópico nesses animais, causando quadros de encefalite (8). Apesar disto, alguns pesquisadores têm investido no desenvolvimento de um

modelo animal simples, como o murino, para o estudo do vírus FA selvagem e vacinal. Baseando-se na idéia de que a resistência de camundongos ao vírus FA é mediada pela resposta de IFNs, Meier *et al* (124) desenvolveram um modelo murino para doença viscerotrópica causada pelo vírus FA, utilizando camundongos nocautes para receptores de IFN tipo I e II (IFN- α/β e IFN- γ) e para a proteína sinalizadora STAT1. Neste estudo, camundongos sem nocaute mostraram-se resistentes à infecção pelo vírus FA selvagem (cepa Asibi) e FA vacinal (cepa 17D-204), quando inoculados por via subcutânea com 10^4 PFU, não sendo detectado vírus infectante em nenhum tecido do animal, em nenhum momento da infecção, através da técnica de plaqueamento viral. Os animais nocautes foram mais suscetíveis à infecção por ambas as cepas virais. Quando camundongos nocautes para IFN- α/β foram infectados por via subcutânea com 10^4 PFU do vírus FA selvagem, foram detectados altos títulos virais (10^5 a 10^8 PFU) no linfonodo drenante do local da inoculação, no soro, baço, fígado, medula óssea e cérebro, enquanto o vírus FA vacinal apresentou títulos mais baixos (10^3 a 10^4 PFU) no linfonodo e no soro, sendo detectado apenas esporadicamente nos outros órgãos.

Em nosso modelo animal sem nocautes, os camundongos não apresentaram nenhum sintoma clínico da infecção pelo vírus FA, porém nosso sistema foi capaz de revelar replicação do vírus FA vacinal em diversos órgãos, provavelmente por utilizar uma dose mais alta de inóculo viral e técnicas moleculares, que são mais sensíveis que o plaqueamento viral. Isto demonstra que o vírus atenuado é capaz de se replicar em camundongos, porém com maior dificuldade de dispersão no organismo por sua replicação ser mais lenta e não devido a uma menor capacidade de evadir a resposta imune do hospedeiro.

Lee e Lobigs (38) também utilizaram o modelo murino nocaute para receptores de IFN tipo I e II para o estudo da atenuação no vírus FA 17D e postularam que a maior afinidade do vírus atenuado a glicosaminoglicanas contribui para sua dificuldade de dispersão e que este seria um dos motivos da atenuação da virulência. Este estudo conseguiu detectar o vírus FA 17D no soro, baço e linfonodo drenante de camundongos nocautes inoculados por via subcutânea com 10^5 PFU, com os maiores títulos sendo encontrados no linfonodo, assim como no nosso estudo. Em camundongos nocautes inoculados com uma dose mais baixa (10^3 PFU), o vírus FA 17D não foi detectado em nenhum órgão nem no soro dos animais, corroborando a ideia da menor proliferação deste vírus atenuado.

5.3. Biodistribuição do vírus FA 17D

Em nosso estudo, demonstramos que o vírus FA 17D é capaz de infectar camundongos e se replicar em diversos tecidos, inclusive em órgãos viscerais representados pelo fígado e baço, e que a eficiência de replicação deste vírus é dose dependente. Não foi avaliado o grau de neurotropismo apresentado por este vírus, embora esta característica do vírus FA 17D esteja bastante descrita na literatura (2, 121, 131).

As duas técnicas utilizadas para detecção e quantificação do RNA viral em soro e órgãos de camundongos vacinados revelaram-se complementares no estudo sobre a biodistribuição do vírus FA 17DD. Durante o estabelecimento do modelo de estudo, primeiramente inoculamos uma dose do vírus FA 17DD semelhante à dose vacinal para humanos (10^5 PFU). Entretanto, poucas amostras apresentaram resultado positivo por RT-PCR semi-nested, provavelmente devido à baixa replicação viral nos tecidos. Na tentativa de aumentar a detecção de RNA viral nas amostras, aumentamos 20 vezes a dose de vírus inoculada e utilizamos o dobro do número de camundongos em cada dia analisado. Com esta dose mais alta, conseguimos detectar e quantificar o RNA viral em muitas amostras. Interessantemente, o período de viremia detectado por RT-PCR semi-nested foi mais precoce quando inoculada a dose mais alta de vírus, o que também ocorreu nas amostras de fígado e baço, demonstrando que a replicação viral foi mais rápida, atingindo níveis detectáveis logo no 1º dia pós-inoculação, enquanto na dose menor a viremia só foi detectada após o 4º dia, no baço após o 2º e no fígado só no 11º dia.

O linfonodo drenante do local da inoculação foi o órgão onde detectamos maiores títulos virais, de acordo com os estudos de Lee e Lobigs (38) e Meier *et al* (124). Nossos resultados indicam a rápida transferência de vírus do local da inoculação, provavelmente mediada pela infecção de células de Langerhans e/ou por células dendríticas (59, 132) e possivelmente replicação viral no tecido linfóide, até o início da resposta imune adaptativa. A replicação primária do vírus detectada na pele do local da inoculação poderia, em parte, estar contribuindo para os altos títulos virais encontrados no linfonodo drenante nos primeiros dias de infecção. Nas amostras de pele, também encontramos altas cargas virais no 1º dia pós-inoculação, que pode corresponder à infecção e início da replicação primária do vírus retido neste local. Esta replicação é, provavelmente, controlada pelas defesas da

imunidade inata, como a fagocitose por macrófagos, células NK e células de Langerhans e pela liberação de IFN tipo I, mas se mantém até o 7º dia de infecção, quando a imunidade adaptativa começaria a contribuir para a eliminação do vírus deste local.

Estudos com outros flavivirus sugerem que a pele do local na inoculação é o sítio de replicação primária, especificamente em células de Langerhans que, quando ativadas, migram para o linfonodo drenante local induzidas por IL-1 β (132, 133). Acredita-se que o vírus atinge a corrente sanguínea através da via eferente linfática e do ducto torácico (68, 134). A viremia parece ser eliminada do sangue por anticorpos neutralizantes, mas a replicação viral pode continuar por períodos mais longos nos tecidos, sendo eliminada somente após a resposta efetora de células T citotóxicas (68, 135).

O linfonodo drenante do local da inoculação também é sítio de replicação primária para vários outros flavivírus (124, 136). Esta replicação primária é importante para gerar a viremia sérica e para disseminar o vírus para outros órgãos. Em nosso estudo, a disseminação viral para os órgãos parece ocorrer durante as primeiras 24 h de infecção, na condição em que os camundongos foram inoculados com a maior dose do vírus (2×10^6 PFU), como demonstrado pela detecção do RNA viral no 1º dia de infecção tanto em amostras de fígado quanto de baço.

O vírus FA 17DD parece manter uma replicação controlada no fígado, provavelmente em células de Kupffer e hepatócitos (114), com as maiores cargas virais sendo encontrados em uma amostra do 7º e uma do 11º dia de infecção, porém com grande variação de carga viral entre os camundongos analisados no mesmo dia. No baço, embora a técnica de qRT-PCR tenha apresentado problemas na normalização, conseguimos detectar RNA viral em todos os dias analisados, com maiores cargas virais também no 7º e 11º dia de infecção. Estes resultados demonstram que a replicação viral parece estar ocorrendo nestes órgãos, provavelmente além do 11º dia de infecção. Seria interessante analisar dias mais tardios para identificar o período de duração da replicação viral nestes órgãos.

No estudo de Monath *et al* (68) sobre a biodistribuição do vírus FA recombinante constituinte da vacina “ChimeriVax-West Nile”, comparado ao vírus FA 17D, em macacos cynomolgus, foi observada replicação do vírus FA 17D na pele do local da inoculação e linfonodo drenante nos primeiros 7 dias de infecção. Um

macaco apresentou uma baixa carga viral no fígado no 7º dia de infecção. O vírus FA 17D foi detectado no baço e linfonodo drenante no 7º dia e no 14º dia pós-inoculação. Estes resultados concordam com o que nós encontramos em nosso modelo murino, na qual foi detectado RNA viral na pele e linfonodo drenante do local da inoculação principalmente até o 7º dia de infecção e no baço a partir do 7º dia. No fígado, também encontramos baixas cargas virais. O vírus quimérico (FA 17D contendo proteínas E e prM do vírus do Oeste do Nilo) apresentou tropismo semelhante ao vírus FA 17D, porém com diferente cinética de replicação, apresentando viremia mais alta nos primeiros 4 dias de infecção, bem como maiores cargas virais em pele e linfonodos drenantes dos animais analisados no 3º dia de infecção. Apesar da replicação do vírus quimérico mostrar-se mais rápida que o vírus FA 17D, sua eliminação dos tecidos foi mais precoce, caindo a níveis não detectáveis após o 14º dia de infecção.

Em um estudo pós-mortem de 4 casos de eventos adversos graves pós-vacinação com o vírus FA 17DD, foram detectados altos níveis de RNA viral no soro e em diversos órgãos como: fígado, pulmões, rins e cérebro por qRT-PCR e antígenos virais foram detectados nestes órgãos por imunohistoquímica (137). Estes achados indicam que a doença viscerotrópica causada em raros casos pela vacinação pode ocorrer, pelo menos em parte, devido à replicação viral descontrolada, que leva a uma disseminação anormal do vírus FA 17D no organismo. O sequenciamento do genoma dos vírus encontrados nestes pacientes não identificou nenhuma mutação que pudesse justificar o aumento na virulência do vírus vacinal. Portanto, acredita-se que a maior suscetibilidade à infecção por este vírus seja devido a predisposições genéticas individuais do vacinado. Entretanto, estes resultados demonstram um potencial de virulência residual do vírus FA 17D e, conseqüentemente, dos vírus recombinantes gerados a partir deste vetor. Assim, novos candidatos vacinais constituídos por estes vírus recombinantes devem ser testados quanto ao seu potencial proliferativo e patogênico em modelos animais de testes pré-clínicos, como o proposto neste trabalho.

5.4. Avaliação da função hepática pós-vacinação

Sabe-se que a doença viscerotrópica causada pelo vírus FA selvagem é promovida pela replicação viral principalmente no fígado, causando sérias lesões neste órgão, incluindo esteatose, infiltração inflamatória por linfócitos e macrófagos,

apoptose e necrose de células hepáticas (114, 115). No entanto, o vírus atenuado vacinal FA 17D é caracterizado pela perda do viscerotropismo e da virulência em órgãos viscerais.

É comum haver elevação nos níveis séricos de transaminases (AST e ALT) e de bilirrubina total em pacientes com doença viscerotrópica típica da febre amarela e em casos de eventos adversos pós-vacinação (137-139). Também já foi descrita elevação nestes marcadores em animais suscetíveis inoculados com o vírus FA selvagem (140). Porém, como o vírus FA 17D normalmente não causa danos hepáticos, não seria esperado aumento destes marcadores nos animais inoculados.

Neste trabalho tentamos avaliar se o vírus FA 17DD seria capaz de causar alguma disfunção ou lesão hepática e se o grau do comprometimento hepático poderia ser avaliado através da dosagem de marcadores séricos de função hepática, como as transaminases (AST e ALT) e bilirrubina total. Os níveis séricos das transaminases não apresentaram diferença significativa entre o grupo controle (*mock*) e o grupo inoculado com o vírus 17DD, e o nível de bilirrubina total esteve abaixo do limite de detecção em todos os camundongos, demonstrando que, apesar de ocorrer replicação viral no fígado, este órgão não sofre nenhuma lesão que altere seu funcionamento.

5.5. Perfil de citocinas

Nossos resultados sobre a biodistribuição do vírus FA 17DD sugerem que o sistema imune do camundongo é capaz de controlar a infecção por este vírus, no entanto, em nosso ensaio de dosagem de citocinas séricas não detectamos nenhuma alteração significativa que pudesse sugerir algum tipo de resposta induzida pela vacinação. Acreditamos que a técnica aplicada para a dosagem das citocinas não foi sensível o suficiente para detectar alterações, pois os níveis séricos das citocinas analisadas apresentaram-se muito baixos, e em alguns casos, abaixo do limite de detecção da técnica.

Meier *et al* (124) utilizaram uma técnica semelhante a utilizada por nós para dosar IL-6 e MCP-1 em soro de camundongos inoculados com o vírus FA selvagem (cepa Asibi) e vacinal (cepa 17D-204). Os níveis de ambas citocinas apresentaram elevação, com pico no 4^o dia pós-inoculação com o vírus selvagem, entretanto, com

o vírus vacinal, os níveis se mantiveram semelhantes aos níveis basais detectados no grupo controle (*mock*).

Li *et al* (140) avaliaram as alterações na produção de citocinas em hamsters após inoculação com uma cepa do vírus FA adaptada para produzir doença viscerotrópica, utilizando qRT-PCR para quantificação relativa da expressão gênica das citocinas IFN- γ , IL-10, TNF- α , IL-12(p40), TGF- β , IL-2 e IL-4 em órgãos como fígado, baço, rins e coração. Assim como outros estudos, este demonstrou aumento na expressão da maioria destas citocinas. Não foram detectadas alterações no nível de expressão de IL-4, que se mantiveram baixos tanto em hamsters inoculados quanto nos controles.

Gaucher *et al* (66) dosaram as citocinas IL-2, IFN- γ , IL-13, IL-5 e IL-10 a partir de sobrenadante de cultura de células T CD4+, co-cultivadas com células dendríticas, e incubadas com o vírus FA 17D. Este método revelou aumento da produção de todas as citocinas avaliadas, exceto da IL-10, conhecida inibidora de macrófagos e células dendríticas ativadas (141). Estes resultados demonstraram que a vacina composta pelo vírus FA 17D estimula resposta de células T CD4+, com um perfil balanceado entre a resposta imune Th1/Th2. A resposta imune inata também foi avaliada através da dosagem de IL-1 β em cultura de células dendríticas incubadas com o vírus 17D, apresentando grande elevação. Este estudo também sugere aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-12, IL-5, IL1 β , TNF- α e IFN tipo I através de análises de microarranjos, porém suas concentrações séricas não foram dosadas.

Silva *et al* (142) analisaram o perfil de citocinas intracitoplasmáticas em leucócitos do sangue periférico de indivíduos vacinados e observaram um padrão balanceado de citocinas ativadoras/moduladoras. A resposta imune inata parece contribuir na primeira semana após vacinação, pois foi revelado aumento nos níveis de TNF- α produzidos por neutrófilos e monócitos e de IFN- γ por células NK, que são contrabalanceados pelo aumento nos níveis de IL-10 produzida por monócitos após 15 dias de vacinação. A resposta imune adaptativa foi caracterizada pelo aumento de IFN- γ , TNF- α e IL-5 por células T CD4+ após 15 dias de vacinação e por aumento de IL-12 e IL-5 por células T CD8+ após 30 dias. Este perfil também foi contrabalanceado pela produção de IL-10 por células B após 15 e 30 dias de vacinação.

Estudos em pacientes com eventos adversos graves após vacinação demonstraram produção aumentada de citocinas como IL-6, IL-8, IL-4, IL-5, IL-17 e IL-10, quando comparadas à produção normal após vacinação em indivíduos que não sofreram eventos adversos (139, 143). Além disto foi sugerido que o nível de MCP-1 pode estar relacionado à taxa de replicação viral, pois foram detectados níveis mais elevados em pacientes com maior viremia, associada a doença viscerotrópica grave. A liberação de RANTES parece ser uma reação natural à vacinação com o vírus 17D, pois foram detectados altos níveis desta quimiocina em todos os indivíduos analisados (139).

Sabe-se que a doença hemorrágica fatal causada pelo vírus Febre Amarela selvagem é acompanhada de uma produção exacerbada de citocinas e quimiocinas, assim como em outras viroses hemorrágicas causadas pelo Dengue e pelo vírus Lassa (144, 145). Em contrapartida o vírus atenuado FA 17D induz apenas um leve aumento na produção de citocinas e quimiocinas (146), capaz de estimular de forma controlada a resposta imune contra o vírus. Esta resposta imune controlada está provavelmente associada à menor capacidade de replicação do vírus atenuado FA 17D e esta característica parece ser essencial para a indução da imunidade protetora sem os efeitos patogênicos da infecção pelo vírus selvagem. A avaliação da alteração na produção de citocinas após a vacinação pode dar indícios de como o sistema imune está sendo ativado a fim de gerar resposta imune protetora tão eficaz, como ocorre com a vacina da febre amarela.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho demonstramos que o modelo murino pode ser utilizado para o estudo da infecção pelo vírus FA vacinal. Apesar da menor susceptibilidade deste modelo, comparado a modelos de primatas não-humanos ou camundongos imunocomprometidos, foi possível detectar a presença e a replicação viral em diversos tecidos do camundongo através das técnicas de RT-PCR semi-nested e qRT-PCR. Além disto, a replicação viral não apresentou patogenicidade para o fígado, como demonstrado pela dosagem de marcadores de função hepática.

Os dados coletados sobre a biodistribuição do vírus FA 17DD aliado a avaliação do comprometimento hepático podem servir como base de comparação para avaliar novos candidatos vacinais constituídos de vírus FA recombinantes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Monath T. Milestones in the conquest of yellow fever. In: Koprowski H OM, editor. *Microbe hunters: then and now*. Lansing, MI: Medi-Ed Press; 1996. p. 95–112.
2. Monath TP, Cetron MS, Teuwen DE. Yellow Fever Vaccine. In: Elsevier S, editor. *Vaccines2008*. p. 959 - 1056.
3. Reed W, Carroll J, Agramonte A, Lazear JW. The Etiology of Yellow Fever-A Preliminary Note. *Public Health Pap Rep*. 1900;26:37-53.
4. Reed W, Carroll J, Agramonte A. The etiology of yellow fever: an additional note. *Mil Med*. 1901 Sep;166(9 Suppl):44-53.
5. Frierson JG. The yellow fever vaccine: a history. *Yale J Biol Med*. 2010 Jun;83(2):77-85.
6. Strode GK. *Yellow Fever1951*.
7. Stokes A. BJH, Hudson N.P. Experimental transmission of yellow fever to laboratory animals. *Am J Trop Med*. 1928.
8. Theiler M. Susceptibility of White Mice to the Virus of Yellow Fever. *Science*. 1930 Apr 4;71(1840):367.
9. Theiler M. Studies on action of yellow fever virus in mice. *Ann Trop Med Parasit*. 1930b:249-72.
10. Soper FL. The Newer Epidemiology of Yellow Fever. *Am J Public Health Nations Health*. 1937 Jan;27(1):1-14.
11. Benchimol JL. *Febre Amarela: A doença e a vacina, uma história inacabada*: Editora Fiocruz; 2001.
12. Theiler M, Smith HH. The Use of Yellow Fever Virus Modified by in Vitro Cultivation for Human Immunization. *J Exp Med*. 1937 May 31;65(6):787-800.
13. Theiler M, Smith HH. The Effect of Prolonged Cultivation in Vitro Upon the Pathogenicity of Yellow Fever Virus. *J Exp Med*. 1937 May 31;65(6):767-86.
14. Smithburn KC. *Yellow Fever Vaccination*. World Health Organization: Monograph Series No 30; Geneva1956.
15. Monath TP. Glad tidings from yellow fever research. *Science*. 1985 Aug 23;229(4715):734-5.
16. Löwy I. *Vírus, Mosquitos e Modernidade: a febre amarela no Brasil entre ciência e política*. Fiocruz, editor2006.
17. Monath TP, Heinz FX. Flaviviruses. In: B. N. Fields DMK, P. M. Howley, et al, editor. *Fields Virology*. 3 ed. Philadelphia: Lippincott - Raven; 1996.

18. Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science*. 1985 Aug 23;229(4715):726-33.
19. Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis*. 2001 Aug;1(1):11-20.
20. Zanotto PM, Gould EA, Gao GF, Harvey PH, Holmes EC. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jan 23;93(2):548-53.
21. Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol*. 2008 Aug;11(4):369-77.
22. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Jan;3(1):13-22.
23. Murray CL, Jones CT, Rice CM. Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Sep;6(9):699-708.
24. Mackenzie J. Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic*. 2005 Nov;6(11):967-77.
25. Gillespie LK, Hoenen A, Morgan G, Mackenzie JM. The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. *J Virol*. 2010 Oct;84(20):10438-47.
26. Lindenbach BD, Rice CM. trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *J Virol*. 1997 Dec;71(12):9608-17.
27. Lindenbach BD, Rice CM. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol*. 1999 Jun;73(6):4611-21.
28. Youn S, Cho H, Fremont DH, Diamond MS. A short N-terminal peptide motif on flavivirus nonstructural protein NS1 modulates cellular targeting and immune recognition. *J Virol*. 2010 Sep;84(18):9516-32.
29. Leung JY, Pijlman GP, Kondratieva N, Hyde J, Mackenzie JM, Khromykh AA. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *J Virol*. 2008 May;82(10):4731-41.
30. Kummerer BM, Rice CM. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J Virol*. 2002 May;76(10):4773-84.
31. Liu WJ, Chen HB, Wang XJ, Huang H, Khromykh AA. Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. *J Virol*. 2004 Nov;78(22):12225-35.
32. Roosendaal J, Westaway EG, Khromykh A, Mackenzie JM. Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in

rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein. *J Virol.* 2006 May;80(9):4623-32.

33. Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker J, Buhler S, Bartenschlager R. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J Biol Chem.* 2007 Mar 23;282(12):8873-82.

34. Westaway EG, Mackenzie JM, Khromykh AA. Kunjin RNA replication and applications of Kunjin replicons. *Adv Virus Res.* 2003;59:99-140.

35. Munoz-Jordan JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martinez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI, et al. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol.* 2005 Jul;79(13):8004-13.

36. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, et al. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe.* 2009 Apr 23;5(4):365-75.

37. Nickells J, Cannella M, Droll DA, Liang Y, Wold WS, Chambers TJ. Neuroadapted yellow fever virus strain 17D: a charged locus in domain III of the E protein governs heparin binding activity and neuroinvasiveness in the SCID mouse model. *J Virol.* 2008 Dec;82(24):12510-9.

38. Lee E, Lobigs M. E protein domain III determinants of yellow fever virus 17D vaccine strain enhance binding to glycosaminoglycans, impede virus spread, and attenuate virulence. *J Virol.* 2008 Jun;82(12):6024-33.

39. J. Erin Staples, Mark Gershman, Fischer M. Yellow Fever Vaccine. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). In: CDC, editor. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* Atlanta GA: Office of Surveillance, Epidemiology, and Laboratory Services, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), U.S. Department of Health and Human Services; 2010.

40. Quaresma JA, Barros VL, Pagliari C, Fernandes ER, Guedes F, Takakura CF, et al. Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF-beta, TNF-alpha and NK cells activity. *Virology.* 2006 Feb 5;345(1):22-30.

41. Quaresma JA, Barros VL, Pagliari C, Fernandes ER, Andrade HF, Jr., Vasconcelos PF, et al. Hepatocyte lesions and cellular immune response in yellow fever infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007 Feb;101(2):161-8.

42. Yellow Fever. Geneva: World Health Organization; 1998; Available from: www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF/www9842.pdf.

43. Saúde Md. Portal da Saúde. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1448.

44. ANVISA. Available from: <http://www.anvisa.gov.br/paf/febre/index.htm>.

45. Barrett AD, Teuwen DE. Yellow fever vaccine - how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? *Curr Opin Immunol*. 2009 Jun;21(3):308-13.
46. Barrett AD. Yellow fever vaccines. *Biologicals*. 1997 Mar;25(1):17-25.
47. Galler R, Post PR, Santos CN, Ferreira, II. Genetic variability among yellow fever virus 17D substrains. *Vaccine*. 1998 May-Jun;16(9-10):1024-8.
48. Hahn CS, Dalrymple JM, Strauss JH, Rice CM. Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Apr;84(7):2019-23.
49. Pulendran B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. *Nat Rev Immunol*. 2009 Oct;9(10):741-7.
50. Galler R, Pugachev KV, Santos CL, Ocran SW, Jabor AV, Rodrigues SG, et al. Phenotypic and molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil. *Virology*. 2001 Nov 25;290(2):309-19.
51. Guirakhoo F, Zhang Z, Myers G, Johnson BW, Pugachev K, Nichols R, et al. A single amino acid substitution in the envelope protein of chimeric yellow fever-dengue 1 vaccine virus reduces neurovirulence for suckling mice and viremia/viscerotropism for monkeys. *J Virol*. 2004 Sep;78(18):9998-10008.
52. Monath TP, Arroyo J, Levenbook I, Zhang ZX, Catalan J, Draper K, et al. Single mutation in the flavivirus envelope protein hinge region increases neurovirulence for mice and monkeys but decreases viscerotropism for monkeys: relevance to development and safety testing of live, attenuated vaccines. *J Virol*. 2002 Feb;76(4):1932-43.
53. Khromava AY, Eidex RB, Weld LH, Kohl KS, Bradshaw RD, Chen RT, et al. Yellow fever vaccine: an updated assessment of advanced age as a risk factor for serious adverse events. *Vaccine*. 2005 May 9;23(25):3256-63.
54. Pulendran B, Miller J, Querec TD, Akondy R, Moseley N, Laur O, et al. Case of yellow fever vaccine--associated viscerotropic disease with prolonged viremia, robust adaptive immune responses, and polymorphisms in CCR5 and RANTES genes. *J Infect Dis*. 2008 Aug 15;198(4):500-7.
55. Poland JD, Calisher CH, Monath TP, Downs WG, Murphy K. Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bull World Health Organ*. 1981;59(6):895-900.
56. Van Epps HL. Broadening the horizons for yellow fever: new uses for an old vaccine. *J Exp Med*. 2005 Jan 17;201(2):165-8.
57. Reinhardt B, Jaspert R, Niedrig M, Kostner C, L'Age-Stehr J. Development of viremia and humoral and cellular parameters of immune activation after vaccination with yellow fever virus strain 17D: a model of human flavivirus infection. *J Med Virol*. 1998 Oct;56(2):159-67.

58. Wrammert J, Miller J, Akondy R, Ahmed R. Human immune memory to yellow fever and smallpox vaccination. *J Clin Immunol*. 2009 Mar;29(2):151-7.
59. Barba-Spaeth G, Longman RS, Albert ML, Rice CM. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. *J Exp Med*. 2005 Nov 7;202(9):1179-84.
60. Querec T, Bennouna S, Alkan S, Laouar Y, Gorden K, Flavell R, et al. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J Exp Med*. 2006 Feb 20;203(2):413-24.
61. Santos AP, Matos DC, Bertho AL, Mendonca SC, Marcovistz R. Detection of Th1/Th2 cytokine signatures in yellow fever 17DD first-time vaccinees through ELISpot assay. *Cytokine*. 2008 May;42(2):152-5.
62. Co MD, Terajima M, Cruz J, Ennis FA, Rothman AL. Human cytotoxic T lymphocyte responses to live attenuated 17D yellow fever vaccine: identification of HLA-B35-restricted CTL epitopes on nonstructural proteins NS1, NS2b, NS3, and the structural protein E. *Virology*. 2002 Feb 1;293(1):151-63.
63. Miller JD, van der Most RG, Akondy RS, Glidewell JT, Albott S, Masopust D, et al. Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity*. 2008 May;28(5):710-22.
64. Neves PC, Rudersdorf RA, Galler R, Bonaldo MC, de Santana MG, Mudd PA, et al. CD8+ gamma-delta TCR+ and CD4+ T cells produce IFN-gamma at 5-7 days after yellow fever vaccination in Indian rhesus macaques, before the induction of classical antigen-specific T cell responses. *Vaccine*. 2010 Nov 29;28(51):8183-8.
65. Neves PC, Matos DC, Marcovistz R, Galler R. TLR expression and NK cell activation after human yellow fever vaccination. *Vaccine*. 2009 Sep 18;27(41):5543-9.
66. Gaucher D, Therrien R, Kettaf N, Angermann BR, Boucher G, Filali-Mouhim A, et al. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J Exp Med*. 2008 Dec 22;205(13):3119-31.
67. Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D, et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol*. 2009 Jan;10(1):116-25.
68. Monath TP. A live, attenuated recombinant West Nile virus vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(17):6694-9.
69. Guy B, Guirakhoo F, Barban V, Higgs S, Monath TP, Lang J. Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses. *Vaccine*. 2010 Jan 8;28(3):632-49.
70. Jiang X, Dalebout TJ, Bredenbeek PJ, Carrion R, Jr., Brasky K, Patterson J, et al. Yellow fever 17D-vectored vaccines expressing Lassa virus GP1 and GP2 glycoproteins provide protection against fatal disease in guinea pigs. *Vaccine*. 2011 Feb 1;29(6):1248-57.

71. Franco D, Li W, Qing F, Stoyanov CT, Moran T, Rice CM, et al. Evaluation of yellow fever virus 17D strain as a new vector for HIV-1 vaccine development. *Vaccine*. 2010 Aug 9;28(35):5676-85.
72. Bonaldo MC, Martins MA, Rudersdorf R, Mudd PA, Sacha JB, Piaskowski SM, et al. Recombinant yellow fever vaccine virus 17D expressing simian immunodeficiency virus SIVmac239 gag induces SIV-specific CD8+ T-cell responses in rhesus macaques. *J Virol*. 2010 Apr;84(7):3699-706.
73. Stoyanov CT, Boscardin SB, Deroubaix S, Barba-Spaeth G, Franco D, Nussenzweig RS, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant yellow fever vaccine against the murine malarial parasite *Plasmodium yoelii*. *Vaccine*. 2010 Jun 23;28(29):4644-52.
74. Bonaldo MC, Garratt RC, Caufour PS, Freire MS, Rodrigues MM, Nussenzweig RS, et al. Surface expression of an immunodominant malaria protein B cell epitope by yellow fever virus. *J Mol Biol*. 2002 Jan 25;315(4):873-85.
75. Nogueira RT, Nogueira AR, Pereira MC, Rodrigues MM, Galler R, Bonaldo MC. Biological and immunological characterization of recombinant Yellow Fever 17D Viruses expressing a *Trypanosoma cruzi* Amastigote Surface Protein-2 CD8+ T cell epitope at two distinct regions of the genome. *Virology*. 2011;8:127.
76. Liniger M, Zuniga A, Naim HY. Use of viral vectors for the development of vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2007 Apr;6(2):255-66.
77. Bonaldo MC, Garratt RC, Freire MS, Galler R. Expression of foreign protein epitopes at the surface of recombinant yellow fever 17D viruses based on three-dimensional modeling of its envelope protein. *Cell Biochem Biophys*. 2006;44(3):313-24.
78. McAllister A, Arbetman AE, Mandl S, Pena-Rossi C, Andino R. Recombinant yellow fever viruses are effective therapeutic vaccines for treatment of murine experimental solid tumors and pulmonary metastases. *J Virol*. 2000 Oct;74(19):9197-205.
79. Tao D, Barba-Spaeth G, Rai U, Nussenzweig V, Rice CM, Nussenzweig RS. Yellow fever 17D as a vaccine vector for microbial CTL epitopes: protection in a rodent malaria model. *J Exp Med*. 2005 Jan 17;201(2):201-9.
80. Bonaldo MC, Mello SM, Trindade GF, Rangel AA, Duarte AS, Oliveira PJ, et al. Construction and characterization of recombinant flaviviruses bearing insertions between E and NS1 genes. *Virology*. 2007;4:115.
81. Bredenbeek PJ, Molenkamp R, Spaan WJ, Deubel V, Marianneau P, Salvato MS, et al. A recombinant Yellow Fever 17D vaccine expressing Lassa virus glycoproteins. *Virology*. 2006 Feb 20;345(2):299-304.
82. Deubel V, Huerre M, Cathomas G, Drouet MT, Wuscher N, Le Guenno B, et al. Molecular detection and characterization of yellow fever virus in blood and liver specimens of a non-vaccinated fatal human case. *J Med Virol*. 1997 Nov;53(3):212-7.

83. Porterfield JS. A plaque technique for the titration of yellow fever virus and antisera. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1959 Nov;53:458-66.
84. Eldadah ZA, Asher DM, Godec MS, Pomeroy KL, Goldfarb LG, Feinstone SM, et al. Detection of flaviviruses by reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 1991 Apr;33(4):260-7.
85. Bae HG, Drosten C, Emmerich P, Colebunders R, Hantson P, Pest S, et al. Analysis of two imported cases of yellow fever infection from Ivory Coast and The Gambia to Germany and Belgium. *J Clin Virol.* 2005 Aug;33(4):274-80.
86. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002 Mar 15;30(6):1292-305.
87. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond).* 2005 Oct;109(4):365-79.
88. Watzinger F, Ebner K, Lion T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Mol Aspects Med.* 2006 Apr-Jun;27(2-3):254-98.
89. Bae HG, Nitsche A, Teichmann A, Biel SS, Niedrig M. Detection of yellow fever virus: a comparison of quantitative real-time PCR and plaque assay. *J Virol Methods.* 2003 Jun 30;110(2):185-91.
90. Cavrini F, Pepa ME, Gaibani P, Pierro AM, Rossini G, Landini MP, et al. A rapid and specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal fluid. *J Clin Virol.* 2010 Dec 12.
91. Trindade GF, Marchevsky RS, Fillipis AM, Nogueira RM, Bonaldo MC, Acero PC, et al. Limited replication of yellow fever 17DD and 17D-Dengue recombinant viruses in rhesus monkeys. *An Acad Bras Cienc.* 2008 Jun;80(2):311-21.
92. Huang JL, Lin HT, Wang YM, Weng MH, Ji DD, Kuo MD, et al. Sensitive and specific detection of strains of Japanese encephalitis virus using a one-step TaqMan RT-PCR technique. *J Med Virol.* 2004 Dec;74(4):589-96.
93. Anwar A, Wan G, Chua KB, August JT, Too HP. Evaluation of Pre-Analytical Variables in the Quantification of Dengue Virus by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Molecular Diagnostics.* 2009;11(6):537-42.
94. Poloni TR, Oliveira AS, Alfonso HL, Galvao LR, Amarilla AA, Poloni DF, et al. Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. *Virology Journal.* 2010;7(1):22.
95. Tang Y, Anne Hapip C, Liu B, Fang CT. Highly sensitive TaqMan RT-PCR assay for detection and quantification of both lineages of West Nile virus RNA. *Journal of Clinical Virology.* 2006;36(3):177-82.
96. Chao DY, Davis BS, Chang GJJ. Development of Multiplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays for Detecting Eight Medically Important Flaviviruses in Mosquitoes. *Journal of Clinical Microbiology.* 2006;45(2):584-9.

97. Kong Y, Thay C, Tin T, Devi S. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. *Journal of Virological Methods*. 2006;138(1-2):123-30.
98. Johnson N, Wakeley PR, Mansfield KL, McCracken F, Haxton B, Phipps LP, et al. Assessment of a Novel Real-Time Pan-Flavivirus RT-Polymerase Chain Reaction. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2010;10(7):665-71.
99. Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, Godsey MS, Mitchell CJ, Savage HM, et al. Rapid detection of west nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2000 Nov;38(11):4066-71.
100. Mantel N, Aguirre M, Gulia S, Girerdchambaz Y, Colombani S, Moste C, et al. Standardized quantitative RT-PCR assays for quantitation of yellow fever and chimeric yellow fever-dengue vaccines. *Journal of Virological Methods*. 2008;151(1):40-6.
101. Pierre V, Drouet MT, Deubel V. Identification of mosquito-borne flavivirus sequences using universal primers and reverse transcription/polymerase chain reaction. *Res Virol*. 1994 Mar-Apr;145(2):93-104.
102. Scaramozzino N, Crance JM, Jouan A, DeBriel DA, Stoll F, Garin D. Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *J Clin Microbiol*. 2001 May;39(5):1922-7.
103. Bauer J.H. MAF. Susceptibility of African monkeys to yellow fever. *Am J Hyg*. 1930.
104. Sawyer WA, Lloyd W. The Use of Mice in Tests of Immunity against Yellow Fever. *J Exp Med*. 1931 Sep 30;54(4):533-55.
105. Reactions of various animals to yellow fever virus. *First International Congress for Microbiology, Paris*. 1932.
106. Susceptibility of hedgehog to yellow fever; viscerotropic virus. *Tr Roy Soc Trop, Med & Hyg*. 1934a.
107. Susceptibility of hedgehog to yellow fever; neurotropic virus. *Tr Roy Soc Trop Med & Hyg*. 1934b.
108. Whitman. Response to yellow fever virus in non susceptible rabbit. *J Immunol*. 1935.
109. Hudson NP. The Pathology of Experimental Yellow Fever in the Macacus Rhesus: III. Comparison with the Pathology of Yellow Fever in Man. *Am J Pathol*. 1928 Sep;4(5):419-30 9.
110. Bearcroft WG. Studies on the livers of yellow-fever-infected African monkeys. *J Pathol Bacteriol*. 1962 Jan;83:49-58.

111. Smetana HF. The histopathology of experimental yellow fever. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med.* 1962;335:411-27.
112. Scott SK, Kosch PC, Hilmas DE. Serum lactate dehydrogenase of normal, stressed, and yellow fever virus-infected rhesus monkeys. *Lab Anim Sci.* 1976 Jun;26(3):436-42.
113. Monath TP, Brinker KR, Chandler FW, Kemp GE, Cropp CB. Pathophysiologic correlations in a rhesus monkey model of yellow fever with special observations on the acute necrosis of B cell areas of lymphoid tissues. *Am J Trop Med Hyg.* 1981 Mar;30(2):431-43.
114. Monath TP, Barrett AD. Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever. *Adv Virus Res.* 2003;60:343-95.
115. Quaresma JA, Barros VL, Fernandes ER, Pagliari C, Takakura C, da Costa Vasconcelos PF, et al. Reconsideration of histopathology and ultrastructural aspects of the human liver in yellow fever. *Acta Trop.* 2005 May;94(2):116-27.
116. Quaresma JA, Duarte MI, Vasconcelos PF. Midzonal lesions in yellow fever: a specific pattern of liver injury caused by direct virus action and in situ inflammatory response. *Med Hypotheses.* 2006;67(3):618-21.
117. Tesh RB, Guzman H, da Rosa AP, Vasconcelos PF, Dias LB, Bunnell JE, et al. Experimental yellow fever virus infection in the Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). I. Virologic, biochemical, and immunologic studies. *J Infect Dis.* 2001 May 15;183(10):1431-6.
118. Xiao SY, Zhang H, Guzman H, Tesh RB. Experimental yellow fever virus infection in the Golden hamster (*Mesocricetus auratus*). II. Pathology. *J Infect Dis.* 2001 May 15;183(10):1437-44.
119. Sbrana E, Xiao SY, Popov VL, Newman PC, Tesh RB. Experimental yellow fever virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) III. Clinical laboratory values. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Jun;74(6):1084-9.
120. McArthur MA, Suderman MT, Mutebi JP, Xiao SY, Barrett AD. Molecular characterization of a hamster viscerotropic strain of yellow fever virus. *J Virol.* 2003 Jan;77(2):1462-8.
121. Mateo RI, Xiao SY, Travassos da Rosa AP, Lei H, Guzman H, Lu L, et al. Yellow fever 17-D vaccine is neurotropic and produces encephalitis in immunosuppressed hamsters. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Nov;77(5):919-24.
122. Chambers TJ, Nickells M. Neuroadapted yellow fever virus 17D: genetic and biological characterization of a highly mouse-neurovirulent virus and its infectious molecular clone. *J Virol.* 2001 Nov;75(22):10912-22.
123. Nickells M, Chambers TJ. Neuroadapted yellow fever virus 17D: determinants in the envelope protein govern neuroinvasiveness for SCID mice. *J Virol.* 2003 Nov;77(22):12232-42.

124. Meier KC, Gardner CL, Khoretonenko MV, Klimstra WB, Ryman KD. A mouse model for studying viscerotropic disease caused by yellow fever virus infection. *PLoS Pathog.* 2009 Oct;5(10):e1000614.
125. Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques.* 2000 Aug;29(2):332-7.
126. Radonic A, Thulke S, Bae HG, Muller MA, Siegert W, Nitsche A. Reference gene selection for quantitative real-time PCR analysis in virus infected cells: SARS corona virus, Yellow fever virus, Human Herpesvirus-6, Camelpox virus and Cytomegalovirus infections. *Viol J.* 2005;2:7.
127. Jarosova J, Kundu JK. Validation of reference genes as internal control for studying viral infections in cereals by quantitative real-time RT-PCR. *BMC Plant Biol.* 2010;10:146.
128. Jorgensen SM, Kleveland EJ, Grimholt U, Gjoen T. Validation of reference genes for real-time polymerase chain reaction studies in Atlantic salmon. *Mar Biotechnol (NY).* 2006 Jul-Aug;8(4):398-408.
129. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034.
130. Jabs WJ, Hennig H, Kittel M, Pethig K, Smets F, Bucsky P, et al. Normalized quantification by real-time PCR of Epstein-Barr virus load in patients at risk for posttransplant lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol.* 2001 Feb;39(2):564-9.
131. Barrett AD, Gould EA. Comparison of neurovirulence of different strains of yellow fever virus in mice. *J Gen Virol.* 1986 Apr;67 (Pt 4):631-7.
132. Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med.* 2000 Jul;6(7):816-20.
133. Johnston LJ, Halliday GM, King NJ. Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus. *J Invest Dermatol.* 2000 Mar;114(3):560-8.
134. Malkova D. The role of the lymphatic system in experimental infection with tick-borne encephalitis. I. The tick-borne encephalitis virus in the lymph and blood of experimentally infected sheep. *Acta Virol.* 1960 Jul;4:233-40.
135. Marchette NJ, Halstead SB, Falkler WA, Jr., Stenhouse A, Nash D. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. 3. Sequential distribution of virus in primary and heterologous infections. *J Infect Dis.* 1973 Jul;128(1):23-30.
136. Chambers TJ, Diamond MS. Pathogenesis of flavivirus encephalitis. *Adv Virus Res.* 2003;60:273-342.

137. Whittembury A, Ramirez G, Hernandez H, Ropero AM, Waterman S, Ticona M, et al. Viscerotropic disease following yellow fever vaccination in Peru. *Vaccine*. 2009 Oct 9;27(43):5974-81.
138. Oudart JL, Rey M. [Proteinuria, proteinaemia, and serum transaminase activity in 23 confirmed cases of yellow fever]. *Bull World Health Organ*. 1970;42(1):95-102.
139. Bae HG, Domingo C, Tenorio A, de Ory F, Munoz J, Weber P, et al. Immune response during adverse events after 17D-derived yellow fever vaccination in Europe. *J Infect Dis*. 2008 Jun 1;197(11):1577-84.
140. Li G, Duan T, Wu X, Tesh RB, Soong L, Xiao SY. Yellow fever virus infection in Syrian golden hamsters: relationship between cytokine expression and pathologic changes. *Int J Clin Exp Pathol*. 2008;1(2):169-79.
141. Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular*. 5 ed: Elsevier; 2005.
142. Silva ML, Martins MA, Espirito-Santo LR, Campi-Azevedo AC, Silveira-Lemos D, Ribeiro JG, et al. Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults. *Vaccine*. 2011 Jan 10;29(3):583-92.
143. Silva ML, Espirito-Santo LR, Martins MA, Silveira-Lemos D, Peruhype-Magalhaes V, Caminha RC, et al. Clinical and immunological insights on severe, adverse neurotropic and viscerotropic disease following 17D yellow fever vaccination. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 Jan;17(1):118-26.
144. ter Meulen J, Sakho M, Koulemou K, Magassouba N, Bah A, Preiser W, et al. Activation of the cytokine network and unfavorable outcome in patients with yellow fever. *J Infect Dis*. 2004 Nov 15;190(10):1821-7.
145. Peters CJ. Viral hemorrhagic fevers. In: Nathanson N, editor. *Viral pathogenesis*: Lippincott-Raven: Philadelphia; 1997. p. 779–99.
146. Woodson SE, Freiberg AN, Holbrook MR. Differential cytokine responses from primary human Kupffer cells following infection with wild-type or vaccine strain yellow fever virus. *Virology*. 2011 Mar 30;412(1):188-95.

Anexo: Resultados da qRT-PCR

Amostra	Tecido	Dia	N° cópias 17DD	Quant 18S	Fator Normalizador	N° cópias 17DD normalizadas
0	Baço	0	192,404	0,079	8,328	1602,388
1	Baço	1	262,003	0,081	8,099	2121,955
2	Baço	1	736,583	0,425	1,547	1139,518
3	Baço	1	246,644	0,685	0,959	236,517
4	Baço	1	402,595	0,137	4,794	1930,227
5	Baço	2	176,327	0,096	6,811	1201,052
6	Baço	2	122,718	0,046	14,404	1767,591
7	Baço	2	NA	NA	NA	NA
8	Baço	2	NA	NA	NA	NA
9	Baço	4	NA	NA	NA	NA
10	Baço	4	NA	1,102	0,596	NA
11	Baço	4	243,355	1,499	0,438	106,645
12	Baço	4	135,857	0,595	1,104	150,001
13	Baço	7	492,402	0,466	1,411	694,828
14	Baço	7	269,133	1,058	0,621	167,081
15	Baço	7	108,024	0,796	0,825	89,142
16	Baço	7	5900,405	0,629	1,045	6164,351
17	Baço	11	1320,777	1,479	0,444	586,714
18	Baço	11	5090,390	1,666	0,394	2006,785
19	Baço	11	3380,135	1,122	0,585	1978,402
20	Baço	11	8034,767	1,503	0,437	3512,671
0	Fígado	0	220,047	2,117	0,365	80,275
0	Fígado	0	113,221	0,575	1,344	152,120
0	Fígado	0	143,147	0,745	1,036	148,287
1	Fígado	1	92,887	0,072	10,730	996,705
2	Fígado	1	963,436	1,708	0,452	435,599
3	Fígado	1	118,191	1,453	0,532	62,827
4	Fígado	1	1016,584	0,767	1,006	1023,028
5	Fígado	2	191,921	1,047	0,737	141,508
6	Fígado	2	361,719	0,772	1,000	361,719
7	Fígado	2	937,913	0,839	0,920	863,198
8	Fígado	2	476,151	0,588	1,313	625,239
9	Fígado	4	159,615	0,704	1,096	175,011
10	Fígado	4	352,020	0,395	1,957	688,928
11	Fígado	4	614,491	1,501	0,514	316,009
12	Fígado	4	445,240	2,239	0,345	153,531
13	Fígado	7	427,665	0,052	14,717	6293,749
14	Fígado	7	123,544	1,349	0,572	70,727
15	Fígado	7	274,607	1,280	0,603	165,626
16	Fígado	7	122,718	1,715	0,450	55,256
17	Fígado	11	361,600	1,404	0,550	198,838
18	Fígado	11	76,874	0,443	1,743	134,004
19	Fígado	11	230,633	0,765	1,009	232,800
20	Fígado	11	238,504	0,158	4,895	1167,523

0	Linfonodo	0	250,150	0,593	0,273	68,166
0	Linfonodo	0	NA	0,092	1,763	NA
0	Linfonodo	0	135,717	0,079	2,037	276,410
1	Linfonodo	1	NA	NA	NA	NA
2	Linfonodo	1	3357,523	0,115	1,409	4729,806
3	Linfonodo	1	1154,858	0,067	2,426	2801,236
4	Linfonodo	1	2619,165	0,038	4,276	11199,616
5	Linfonodo	2	803,743	0,144	1,119	899,780
6	Linfonodo	2	397,291	0,031	5,169	2053,759
7	Linfonodo	2	631,213	0,611	0,264	166,920
8	Linfonodo	2	2384,253	0,027	5,919	14112,501
9	Linfonodo	4	539,641	0,162	1,000	539,641
10	Linfonodo	4	598,213	0,139	1,166	697,310
11	Linfonodo	4	2549,780	0,467	0,346	882,842
12	Linfonodo	4	359,181	1,587	0,102	36,592
13	Linfonodo	7	899,280	1,725	0,094	84,292
14	Linfonodo	7	485,836	0,693	0,233	113,269
15	Linfonodo	7	457,356	1,497	0,108	49,386
16	Linfonodo	7	241,728	0,711	0,227	54,983
17	Linfonodo	11	505,801	0,272	0,595	301,126
18	Linfonodo	11	1124,265	0,486	0,333	374,033
19	Linfonodo	11	618,630	0,765	0,211	130,732
20	Linfonodo	11	335,863	0,048	3,377	1134,362
0	Pele	0	305,740	0,042	1,000	305,740
1	Pele	1	204,386	1,090	0,038	7,818
2	Pele	1	466,659	0,847	0,049	22,983
3	Pele	1	657,152	0,020	2,049	1346,759
4	Pele	1	814,605	0,004	10,468	8527,565
5	Pele	2	NA	NA	NA	NA
6	Pele	2	1178,349	0,038	1,102	1298,489
7	Pele	2	276,456	0,767	0,054	15,021
8	Pele	2	NA	NA	NA	NA
9	Pele	4	454,296	0,003	13,890	6310,351
10	Pele	4	670,519	0,393	0,106	71,054
11	Pele	4	574,600	0,252	0,166	95,145
12	Pele	4	243,355	0,028	1,494	363,615
13	Pele	7	2708,557	0,084	0,494	1338,075
14	Pele	7	144,168	0,002	24,223	3492,178
15	Pele	7	NA	NA	NA	NA
16	Pele	7	NA	NA	NA	NA
17	Pele	11	NA	NA	NA	NA
18	Pele	11	526,587	0,025	1,658	873,250
19	Pele	11	124,801	0,053	0,787	98,225
20	Pele	11	NA	NA	NA	NA