

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz
Pós-graduação em Biologia Parasitária

Michelli Faria de Oliveira

**Aprimoramento da plataforma de expressão na região intergênica E/NS1 do vírus da
Febre Amarela 17D**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências na área de Biologia Parasitária.

Orientadora: Dr^a. Myrna Cristina Bonaldo

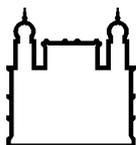
Rio de Janeiro

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz
Pós-graduação em Biologia Parasitária

Esta dissertação intitulada:

**Aprimoramento da plataforma de expressão na região intergênica E/NS1 do vírus da
Febre Amarela 17D**

apresentada por

Michelli Faria de Oliveira

Será avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Titulares:

Dra. Ada Maria de Barcelos Alves, Laboratório de Imunopatologia, IOC, FIOCRUZ –
Revisora.

Dr. Ricardo Galler, Vice-diretor de Bio-Manguinhos, FIOCRUZ.

Dr. Ronaldo da Silva Mohana Borges, Laboratório de Genômica Estrutural, Instituto de
Biofísica Carlos Chagas, UFRJ.

Suplentes:

Dr. Adeilton Alves Brandão, Laboratório de Epidemiologia Molecular de Doenças
Infecciosas, IOC, FIOCRUZ.

Dra. Claire Fernandes Kubelka, Laboratório de Imunologia Viral, IOC, FIOCRUZ.

Rio de Janeiro, 17 de abril de 2008.

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz e no Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV) do Departamento de Desenvolvimento Tecnológico/Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, sob a orientação da Dra. Myrna Cristina Bonaldo.

Dedico esta dissertação àqueles que estiveram ao meu lado, me apoiando durante todos os momentos da minha vida com infinita dedicação e amor. Aos meus pais, Derli e Manoel.

“Tudo é ousado para quem nada se atreve”

Fernando Pessoa

Agradecimentos

Agradeço à Dra. Myrna Bonaldo pela oportunidade de aprendizado, pela orientação e confiança destinadas a mim durante todo o trabalho desde que me aceitou como membro de sua equipe. Agradeço também pelas enriquecedoras discussões científicas que inúmeras vezes despertaram em mim a busca pelo saber mais.

Agradeço ao Dr. Ricardo Galler por todo seu apoio à equipe, pelo conhecimento compartilhado e sugestões valiosas para o enriquecimento de todos os trabalhos realizados em nosso laboratório sempre com muita clareza, objetividade e inteligência.

Agradeço ao Dr. Marcos da Silva Freire pela disponibilização da estrutura do Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV) do Departamento de Desenvolvimento Tecnológico/Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, onde foi possível realizar os experimentos utilizando cultura de células e vírus. Agradeço também a todos os membros de sua equipe que sempre me receberam em seu laboratório com muita simpatia, atenção e solicitude.

Aos membros do Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus:

Aos técnicos, Armindo Caldeira da Rocha e Paula Borba Cruz, pelo seu empenho para o bom funcionamento do laboratório e pelo pronto atendimento às minhas solicitações.

À secretária do laboratório Patrícia Carvalho pela dedicação e agradável convivência.

Ao Marlon Giuseppe, que com seu jeito de “menino curioso” e as inúmeras palavras de amor à ciência, sempre me fazia lembrar de que vale a pena. Desistir JAMAIS!

À pesquisadora Adriana Lima Vallochi pela importante ajuda com a maior parte dos experimentos de citometria de fluxo e com a organização e interpretação dos resultados.

Agradeço também pelas valiosas dicas, sugestões e ajuda na correção da tese.

À aluna de doutorado Gisela Freitas Trindade pela ajuda nos experimentos de microscopia de fluorescência e, principalmente, pelo carinho.

À aluna de doutorado Raquel Tayar Nogueira, pelo apoio e ajuda no laboratório. Obrigada pela amizade, pelos momentos agradáveis que passamos e também pelas incontáveis caronas para casa.

Um agradecimento muito especial às alunas de mestrado Ana Luiza Chaves Valadão e Ana Paula Montenegro Generino, com quem eu tive a oportunidade de conviver a maior parte do tempo na bancada. Ana Paula, com sua forma simples de ver as coisas, me

abasteceu de ânimo e incentivo em inúmeros momentos dessa caminhada. Ana Luiza, com sua enorme dedicação, me serviu de exemplo e auxílio desde quando estudamos juntas e juntas fomos aprovadas na seleção de mestrado. Meus sinceros agradecimentos pelo conhecimento compartilhado e companheirismo durante as longas horas de trabalho e, acima de tudo, obrigada pela preciosa amizade.

Agradeço, também, àquelas que hoje já não fazem parte da equipe do laboratório, mas que o tempo de convivência, durante este trabalho, foi suficiente para torná-las importantes:

À Dra. Aymara Rangel pela amizade, torcida, carinho e incentivo.

À ex-secretária, Danielle Cristina de Paula, por sua dedicação e eficiência. Obrigada pela torcida, pelo carinho e pela grande amizade.

À Msc. Samanta Mattei de Mello pelas dicas em algumas etapas experimentais e pelos momentos de descontração no período em que convivemos.

À Msc. Ingrid Siciliano Horbach pelas dicas em diversas etapas experimentais. Por todo incentivo, pelos momentos alegres que passamos, pela paciência, carinho e, principalmente, por ter se tornado uma grande e valorosa amiga, a quem admiro por toda força e coragem.

À ex-técnica do laboratório, Adriana dos Santos Duarte, os meus sinceros agradecimentos por todas as horas de apoio, dedicação e generosidade durante meu treinamento no laboratório. Agradeço ainda mais pela grande e sincera amizade, pela paciência, compreensão e todos os momentos felizes que passamos juntas durante este período. Muito obrigada!

À Amanda Torrentes de Carvalho, do Laboratório de Imunologia Viral e colega de turma, pela ajuda com o citômetro de fluxo, em alguns experimentos, pelo conhecimento compartilhado e pelo tempo gasto comigo.

Às amigas e colegas de turma Érika de Araújo Abi-Chacra e Joanna Reis Santos de Oliveira pela agradabilíssima convivência e amizade durante todo o curso e em nossos encontros “extracurriculares”.

Às minhas velhas e grandes amigas Rhanara, Thaíse, Valquíria e Vívian, pelo incentivo, torcida e por sempre receberem minhas vitórias com alegria. Meus sinceros agradecimentos por sua preciosa amizade.

Aos meus amigos Darwin e Pingo, por me receberem toda semana de volta em casa com pulos de alegria e saudades e terem se transformado em meus terapeutas profissionais.

Ao meu namorado Jeff, por toda sua a dedicação e incentivo. Por sempre ter recebido minhas vitórias com alegria e satisfação, mesmo sem saber como se constrói um vírus ou como ele “nasce”. Agradeço por seus valiosos conselhos, pela paciência, companheirismo, compreensão e amor, o que fez todos esses dias serem muito mais leves e alegres.

Aos meus avós Augusta e Felipe, pelas orações e torcida pelo meu sucesso pessoal e profissional. Agradeço, imensamente, pelo apoio à minha mãe no momento mais difícil de sua vida, o que me deu tranquilidade para realizar minhas tarefas durante o mestrado, longe dela. Muito Obrigada!

O maior dos meus agradecimentos aos meus pais Derli e Manoel, por sua infinita dedicação nesta e em todas as outras etapas de minha vida. Por estarem ao meu lado desde os momentos de fraqueza aos momentos de vitória sempre com palavras de amor, abraços e beijos confortantes. Por serem minha referência, minha segurança e meu alívio. E, como não posso esquecer, por também terem sido, na maior parte do tempo, minha “agência de fomento pessoal” sem a qual tudo teria sido muito mais difícil. Agradeço de todo o meu coração, pois por vocês cheguei até aqui e irei ainda mais além.

Agradeço aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite para avaliar este trabalho. Meu agradecimento especial à revisora Dra. Ada Maria de Barcelos Alves pelas correções e sugestões que contribuiram muito para a finalização deste trabalho.

Às plataformas PDTIS-FIOCRUZ de Sequenciamento de DNA e de Microscopia Confocal pelo suporte técnico.

Agradeço à FIOCRUZ, ao IOC e ao CNPQ pelo suporte financeiro.

E acima de todos os outros, os meus agradecimentos a Deus por TUDO.

Índice

Abreviaturas e sigla	xii
Lista de figuras	xiv
Lista de tabelas	xvi
Resumo	xvii
Abstract	xviii
1. Introdução	1
1.1. Os flavivírus e sua estrutura genômica	1
1.2. Ciclo de replicação viral	4
1.3. A Febre Amarela, ciclo biológico e a vacina cepa 17 D	6
1.4. Tecnologia do clone infeccioso	8
1.5. Diferentes abordagens referentes ao uso do vírus vacinal 17D como vetor de expressão de genes heterólogos	9
1.6. Expressão de proteínas heterólogas na região intergênica E/NS1	13
2. Objetivos	18
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
2.2.1. Criação dos vírus 17D recombinantes	18
2.2.2. Caracterização biológica e genética do vírus 17D recombinante	18
3. Material e métodos	19
3.1. Certificados	19
3.2. Bactérias	19
3.3. Cultura de células	21
3.4. Vírus	22
3.4.1. Vírus FA 17DD	22
3.4.2. Vírus FA 17D/G1.2-T3	22
3.4.3. Vírus FA 17D/G1.2-T3/EGFP/HA Den4	23
3.4.4. Vírus FA 17D/G1.2-T3/EGFP/HA Den4 Trun	23
3.5. Purificação e extração de ácidos nucleicos	23
3.5.1. Extração de DNA plasmidial	23
3.5.2. Extração de DNA de gel de agarose	24
3.5.3. Purificação de fragmentos de PCR	24
3.5.4. Precipitação de DNA	24

3.5.5. Extração de RNA de sobrenadante de cultura celular	25
3.6. Sequenciamento nucleotídico	26
3.7. Eletroforese de ácidos nucléicos	26
3.8. Construção das plataformas de expressão de EGFP	27
3.8.1. Descrição dos oligonucleotídeos sintéticos	27
3.8.2. PCR dos genes EGFP e HA Den4	28
3.8.3. Construção dos cassetes de expressão EGFP (PCR de “Fusão”)	29
3.9. Clonagem molecular das plataformas de expressão de EGFP	30
3.9.1. Clonagem no plasmídeo <i>PCR-Blunt II-TOPO</i> (Invitrogen)	30
3.9.2. Clonagem no plasmídeo <i>pGEM-T Easy</i> (Promega)	32
3.9.3. Clonagem no plasmídeo pT3	33
3.9.4. Transformações em bactérias <i>E. coli</i>	34
3.9.5. Preparo de estoque bacteriano	35
3.10. Montagem dos moldes de cDNA virais	36
3.11. Transcrição <i>in vitro</i> dos moldes de cDNA dos vírus FA 17D	37
3.12. Transfecção dos RNAs virais	38
3.13. Produção do estoque viral (2P)	38
3.14. Caracterização viral	39
3.14.1. Titulação viral por contagem de placas de lise	39
3.14.2. Cinética de Replicação viral	40
3.14.3. Estabilidade genética	40
3.14.4. Reações de transcrição reversa e reações em cadeia da polimerase (RT-PCR)	41
3.14.5. Citometria de fluxo	42
3.14.6. Microscopia de fluorescência	44
3.15. Meios e soluções	45
4. Resultados	50
4.1. Construção dos vírus recombinantes expressando EGFP	50
4.1.1. Construção e clonagem das plataformas de expressão Construção I e Construção II	50
4.1.2. Clonagem no plasmídeo pT3 e construção dos moldes de cDNA virais	60
4.1.3. Obtenção dos vírus parental FA 17D G1/2-T3 e recombinantes	65
4.2. Produção e caracterização dos estoques virais	67

4.2.1. Cinética de Multiplicação Viral	69
4.2.2. Caracterização da cinética de expressão de EGFP pelos vírus recombinantes por citometria de fluxo	71
4.2.3. Estudo da cinética de expressão de EGFP em células Vero infectadas pelos vírus recombinantes por microscopia de fluorescência	73
4.2.4. Estudo da estabilidade genética dos vírus recombinantes	75
4.2.4.1. Vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4	78
4.2.4.1.1. Análise por RT-PCR e sequenciamento	78
4.2.4.1.2. Análise por citometria de fluxo	79
4.2.4.2. Vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun	80
4.2.4.2.1. Análise por RT-PCR e sequenciamento	80
4.2.4.2.2. Análise por citometria de fluxo	81
5. Discussão	84
6. Conclusões	93
7. Referências bibliográficas	94

Abreviaturas e Siglas

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
α -FA	Anticorpo anti-Febre Amarela
Bio-Manguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês “bovine serum albumin”)
C	1. Proteína do capsídeo; 2. carbóxi
CAP	Estrutura em <i>cap</i> da extremidade 5' do RNAm
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CMC	Carboximetilcelulose
CPE	Efeito citopático (do inglês “cytopathic effect”)
CQB	Certificado de Qualidade em Biossegurança
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
Den4	Vírus da Dengue sorotipo 4
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleotídeos Trifosfato
E	Proteína de envelope
EGFP	Do inglês “Enhanced Green Fluorescent Protein”
EUA	Estados Unidos da América
<i>et al.</i>	e colaboradores
FA	Febre Amarela
FA 17D	Cepa 17D da vacina contra Febre Amarela
FA 17DD	Cepa 17DD da vacina contra Febre Amarela
FACS	Do inglês “Fluorescence-activated cell sorting”
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IRES	Sítios internos de entrada de Ribossomo (do inglês “Internal Ribosome Entry Sites”)
LATEV	Laboratório de Tecnologia Viroológica
M	1. Concentração molar ou molaridade; 2. Proteína de Membrana

Meio BHI	Meio “Brain Heart Infusion”
Meio LB	Meio “Luria-Bertani”
MOI	Multiplicidade de infecção (do inglês “multiplicity of infection”)
N	1. Concentração normal ou normalidade; 2. Amino
nt	Nucleotídeos
OGM	Organismos Geneticamente Modificados
p.i.	Pós-infecção
pb	par(es) de base(s)
PBS	Solução salina fosfato tamponada (do inglês “phosphate buffered saline solution”)
PCR	Reação em cadeia de polimerase (do inglês “polymerase chain reaction”)
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
PE	Ficoeritrina (do inglês “Phycoerythrin”)
PFU	Unidade formadora de placa (do inglês “plaque forming unit”)
pH	Potencial hidrogeniônico
poli-A	Estrutura poliadenilada da extremidade 3’ do RNAm
prM	Precursor da proteína de membrana
pré-GPC	Glicoproteína precursora
q.s.p.	Quantidade suficiente para completar
rcf	Força centrífuga relativa
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RT	1. Transcriptase reversa (do inglês “reverse transcriptase”) 2. Reação de transcrição reversa (do inglês “reverse transcription”)
RT-PCR	Sistema de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
SFB	Soro fetal bovino
U	Unidade

Lista de Figuras

Figura 1.1: Organização do genoma do vírus FA	4
Figura 1.2: Ciclo replicativo de <i>Flavivirus</i>	5
Figura 1.3: Esquema representativo do sistema de dois plasmídeos que constituem o clone infeccioso do vírus da FA	9
Figura 1.4: Substituição dos genes prM/E do vírus da Febre Amarela pelos genes homólogos do vírus Dengue	10
Figura 1.5: Representação esquemática da estratégia de inserção entre regiões intergênicas do vírus 17D franqueadas pelos sítios de clivagem da protease NS2B/NS3	11
Figura 1.6: Estratégia de inserção de epítomos na proteína E	12
Figura 1.7: Estratégia de inserção de gene heterólogo na região 3' não-traduzida	13
Figura 1.8: Plataforma de expressão da proteína EGFP no clone infeccioso 17D	15
Figura 3.1: Mapa do plasmídeo <i>PCR-Blunt II-TOPO</i> (Invitrogen) do kit Zero Blunt TOPO	31
Figura 3.2: Mapa do plasmídeo <i>pGEM-T Easy</i> (Promega)	33
Figura 3.3: Mapa do plasmídeo pT3	34
Figura 3.4: Mapa do plasmídeo pG1/2	37
Figura 4.1: Alinhamento das regiões HA FA e HA Den4 (completa ou truncada)	51
Figura 4.2: Região intergênica E/NS1 de FA e seu processamento em relação ao Retículo Endoplasmático	53
Figura 4.3: Estratégia de construção das plataformas de expressão de EGFP por PCR	56
Figura 4.4: Obtenção das plataformas de expressão de EGFP por PCR	57
Figura 4.5: Clonagens das plataformas de expressão de EGFP (Construção I e Construção II) nos plasmídeos <i>PCR-Blunt II-TOPO</i> e <i>pGEM-T Easy</i>	58
Figura 4.6: Esquema representativo dos plasmídeos	59
Figura 4.7: Esquema da clonagem das plataformas de expressão de EGFP em pT3	61
Figura 4.8: Clonagem das plataformas de expressão de EGFP em pT3	62
Figura 4.9: Esquema da montagem dos moldes de cDNA virais	64
Figura 4.10: Montagem dos moldes de cDNA viral	65
Figura 4.11: Geração dos RNAs virais infecciosos por transcrição <i>in vitro</i>	66
Figura 4.12: Produtos de RT-PCR da 2P dos vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HADen4 e FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HADen4 Trun	67

Figura 4.13: Cinética de Multiplicação dos Vírus Recombinantes FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 e FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun, e dos vírus de referência FA 17DD e FA 17D/G1/2-T3 em células Vero	70
Figura 4.14: Cinética de expressão de EGFP por citometria de fluxo	72
Figura 4.15: Cinética de expressão de EGFP por microscopia confocal	74
Figura 4.16: Localização da EGFP no Retículo Endoplasmático	75
Figura 4.17: Cromatograma representativo da perda de parte da inserção heteróloga em 10P1 do vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4	79
Figura 4.18: Estudo da estabilidade genética dos vírus recombinantes FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 e FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun submetidos a passagens seriadas em monocamada de células Vero	82

Lista de Tabelas

Tabela 3.1: Características genótípicas das cepas bacterianas utilizadas nas etapas de clonagem	20
Tabela 3.2: Oligonucleotídeos utilizados nas reações de sequenciamento	26
Tabela 3.3: Oligonucleotídeos utilizados nas etapas de PCR para obtenção das plataformas de expressão de EGFP (Construções I e II).....	28
Tabela 4.1: Identidade entre as seqüências HA FA e HA Den4 (completa ou truncada)	52
Tabela 4.2: Valores dos títulos virais dos vírus recombinantes e dos vírus de referência	68
Tabela 4.3: Valores encontrados na Cinética de Multiplicação Viral em Cultura de Células Vero (Log10 PFU/mL)	70
Tabela 4.4: Passagens seriadas independentes dos vírus recombinantes FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 e FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun	77

Resumo

A Febre Amarela (FA) é uma doença viral endêmica da África e América do Sul e é transmitida por mosquitos. O vírus da FA é o protótipo do gênero *Flavivirus* e caracteriza-se por ser um vírus envelopado com genoma de RNA fita simples positiva. O controle da FA foi possível após o desenvolvimento de uma vacina atenuada e, graças às suas boas características, tem sido amplamente utilizada. Também tem sido avaliada como vetor de expressão para antígenos exógenos, tendo em vista a obtenção de novas vacinas. Como o genoma de FA é pequeno e compacto, inserções poderiam provocar um efeito deletério sobre a viabilidade viral e, assim, deve-se respeitar os motivos funcionais importantes para o processamento viral. Foi desenvolvida em nosso laboratório, uma estratégia de expressão de proteínas exógenas, por meio da inserção do gene da proteína repórter EGFP na região intergênica E/NS1 do genoma do vírus vacinal FA 17D. Esta abordagem considerou os motivos funcionais desta região, que foram duplicados e utilizados para flanquear a EGFP, permitindo o correto processamento da poliproteína viral. Foram construídos dois vírus que diferiam entre si por conter a região completa ou truncada da Haste-âncora de FA (HA FA) fusionada à EGFP. Eles foram caracterizados quanto à capacidade de replicação e imunogenicidade em comparação ao vacinal FA 17DD e quanto à expressão e estabilidade da inserção heteróloga no genoma viral (Bonaldo *et al.*, 2007; Mello, 2007). Os resultados obtidos apontaram para a necessidade de aprimoramento da estabilidade das inserções no genoma. Portanto, nesta dissertação, apresentamos uma variação desta estratégia com a finalidade de melhoramento da estabilidade das inserções no genoma dos vírus recombinantes. Uma modificação realizada foi a utilização da variante pG1/2 na construção destes novos vírus, a fim de torná-los fenotipicamente mais próximos do vacinal. A outra modificação foi a substituição dos domínios HA completo ou truncado de FA, que foram fusionados ao gene exógeno, pelas seqüências homólogas dos elementos HA Den4. As características de replicação, expressão e estabilidade da inserção heteróloga no genoma viral foram determinadas e comparadas com as da primeira geração de vírus construídos por esta estratégia, após o cultivo em monocamadas celulares. Sugerimos aqui, que estes novos vírus apresentaram um perfil mais replicativo do que os da primeira geração, porém menos replicativo que o vacinal. A EGFP foi eficientemente expressa, porém manteve-se retida no Retículo Endoplasmático (RE), confirmando-se como uma característica comum dos vírus construídos por esta tecnologia. Observou-se um aprimoramento da estabilidade genética da inserção contendo a HA Den4 truncada, indicando que a diminuição da identidade seqüencial entre este domínio e aquele natural do vírus FA foi capaz de melhorar a estabilidade da inserção, mas somente quando omitidos os elementos H1 e CS, sugerindo uma interferência deletéria do acúmulo destes motivos no RE.

Abstract

Yellow fever (YF) is a mosquito borne viral disease from Africa and South America. This virus is the prototype virus of *Flavivirus* genus that groups virus with enveloped and has an RNA positive, single stranded genome. YF control became possible because of the creation of an attenuated vaccine whose advantageous characteristics made it widely used. YF vaccine virus has been evaluated as an expression vector to exogenous antigens aiming the development of new vaccines. As YF genome is short and compact, insertions can induce deleterious effects on viral viability; hence, important functional motifs to the viral processing must be respected. It has been previously described by our laboratory a new strategy to express a heterologous protein, the reporter protein EGFP, in the intergenic region E/NS1 of the viral YF 17D genome. This approach has taken into account the functional motifs flanking this region. So, the expression cassette was built using these duplicated domains flanking EGFP gene, allowing the right processing of the viral poliprotein. Two different cassettes were constructed bearing either the complete or truncated YF stem-anchor (SA) region. They were compared to the YF 17D in terms of replication, heterologous protein expression, and immunogenicity capabilities. It was also evaluated the genetic stability of the heterologous insertion in the viral genome. These data have indicated a requirement to improve the genetic stability of the insertions as well as the immunogenicity of the viral constructs (Bonaldo *et al.*, 2007; Mello, 2007). Herein, this dissertation presents an alternative strategy to improve the recombinant genome insertions stability. One of the performed changes was the replacement of the pG1/2 plasmid - used in the construction of YF infectious clone template - to obtain new recombinant viruses displaying a closer phenotype to the 17D vaccine strain. The other modification was the substitution of complete or truncated YF stem SA domains, that were fused to the foreign gene, by the homologous sequences of the Den4 virus SA elements. In this work, growth characteristics, GFP expression pattern and genetic stability of the exogenous insertions were determined and compared with the viruses described by Bonaldo *et al.* (2007) and Mello (2007), using a similar approach. We proposed that these new viruses proliferated better than the previously obtained viruses, although less than the vaccine 17D YF virus. EGFP was efficiently expressed, but it seemed to be retained to the Endoplasmic Reticulum, confirming a common characteristic of viruses built by this technology. An increase in the genetic stability properties was displayed by the virus, which was constructed with the truncated SA Dengue 4 region, indicating that the decrease in sequence identity between this domain and the YF one could enhance insertion stability, but only in the absence of H1 and CS elements. This suggests a deleterious interference of these elements accumulation in the ER.

1. Introdução

1.1. Os flavivírus e sua estrutura genômica

O gênero *Flavivirus* é composto por aproximadamente 70 vírus dos quais muitos são capazes de provocar doenças sérias no homem como a Encefalite Japonesa, Encefalite Transmitida por Carrapato, a Febre de Dengue e a Febre Amarela. O vírus da Febre Amarela é considerado o protótipo do grupo que é caracterizado por reunir vírus pequenos (aproximadamente 40 – 60 nm) e esféricos possuindo um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica, envolto externamente por um envelope lipoprotéico.

O material genômico dos flavivírus é constituído de uma fita simples de RNA com orientação positiva, composto de aproximadamente 11.000 nucleotídeos cuja replicação ocorre em complexos citoplasmáticos associados às membranas do Retículo Endoplasmático (RE). A região 5' do genoma é não-codificante, formada por, aproximadamente, 120 nucleotídeos e possui CAP. A região 3' também é não-codificante formada por, aproximadamente, 500 nucleotídeos e não possui cauda poli-A (Rice *et al.*, 1985; Westaway, 1987), mas apresenta estruturas em forma de alças que parecem estar envolvidas na replicação do RNA viral (Tilgner *et al.*, 2005; You *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2005). A região codificante é transcrita em uma poliproteína de aproximadamente 3.411 resíduos de aminoácidos que, após clivagens por proteases virais e celulares, gera 10 polipeptídeos (Rice *et al.*, 1985).

Três polipeptídios codificados na porção N-terminal são considerados proteínas estruturais, pois estão envolvidos na formação da partícula viral e na sua liberação da célula e são conhecidos como proteína de capsídeo (C), proteína precursora de membrana (prM/M) e proteína de envelope (E) (Chambers *et al.*, 1990a; Lindenbach e Rice, 2001). A proteína C (~ 11kDa) pode formar complexos com o RNA genômico mediando a formação do nucleocapsídeo (Rice *et al.*, 1985; Lindenbach e Rice, 2001). Além disso, esta proteína contém um domínio hidrofóbico em seu C-terminal que atua como seqüência sinal para translocação da prM para o lúmen do RE (Nowak *et al.*, 1989).

A proteína prM e a proteína E são glicoproteínas que possuem duas hélices transmembranares cada, que as sustentam na membrana do RE durante o processamento da poliproteína. A prM (~ 27 kDa), funciona como uma chaperona que facilita no dobramento e montagem da proteína E (Lorenz *et al.*, 2002). Além disso, a prM ajuda a evitar uma prematura exposição do peptídeo de fusão da E ao reduzido pH encontrado nas vesículas da via secretora, em virions imaturos (Heinz *et al.*, 2003). Pouco antes da liberação dos virions pela célula hospedeira, a prM é clivada por uma furina-protease celular, convertendo as

partículas virais para sua forma madura, individualizando a proteína M (~ 8 kDa) (Stadler *et al.*, 1997; Murray *et al.*, 1993). A proteína E (monômero de ~ 50 kDa) é a maior proteína de superfície da partícula viral sendo o principal alvo para a resposta imune do hospedeiro (Monath, 2004; Lindenbach *et al.*, 2006). Estudos indicam que a proteína E é dividida em três domínios estruturais e, forma hastes homodiméricas que parecem estar alinhadas paralelamente à superfície do virion (Rey *et al.* 1995). Ela é responsável pelas fases iniciais da infecção, uma vez que, interage com receptores celulares mediando a fusão das membranas do vírus e da vesícula endossômica por meio de um processo dependente de pH ácido. O pH baixo induz uma mudança de conformação nos dímeros da proteína, o que leva à formação de trímeros, com conseqüente exposição do peptídeo de fusão (Lorenz *et al.*, 2002; Allison *et al.*, 1995; Schalich *et al.*, 1996). Dessa forma, mutações na proteína E podem afetar suas funções biológicas (Ball, 2001; Mandl *et al.*, 2000). Após a montagem dos virions a proteína E mantém-se ancorada na superfície do envelope viral devido à presença das duas hélices transmembranares (TM1 e TM2), em sua região C-terminal (Rey *et al.* 1995; Allison *et al.*, 1999).

Os outros sete polipeptídeos da poliproteína são codificados na região C-terminal gerando proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) e compreendem replicases, helicases, e outras enzimas envolvidas na replicação viral, além de proteases que atuam no processamento da poliproteína traduzida, mas suas funções não estão completamente estabelecidas (Chambers *et al.*, 1990a; Lindenbach e Rice, 2001).

As proteínas NS1, NS3 e NS5 têm seqüências muito conservadas entre os *Flavivírus*. A proteína NS1, após o processo de translocação para o RE, pode-se se associar como homodímeros interagindo com a membrana (Winkler *et al.*, 1988; Winkler *et al.*, 1989). Uma fração da NS1 se mantém associada com organelas intracelulares e, dessa forma, parece estar envolvida com o processo inicial de replicação viral (Mackenzie *et al.*, 1996; Lindenbach *et al.*, 1997; Muylaert *et al.*, 1997). A proteína pode também ser exportada ao longo da via secretora, podendo ficar ancorada na membrana plasmática da célula hospedeira (Jacobs *et al.*, 2000) ou ser excretada como hexâmeros solúveis (Crooks *et al.*, 1994; Flamand *et al.*, 1999).

A NS3 (~ 70 kDa) é uma proteína hidrofílica e possui três funções enzimáticas. Uma delas é a função de protease, estando envolvida no processamento proteolítico da poliproteína, em sítios voltados para o RE (onde a protease celular não atua) (Chambers *et al.*, 1990b; Falgout *et al.*, 1991; Yamshchikov *et al.*, 1995; Yamshchikov *et al.*, 1997; Stocks e Lobigs, 1998). Além disso, ela exerce também as funções de helicase e nucleotídeo-trifosfatase

(Gorbalenya *et al.*, 1989a; Gorbalenya *et al.*, 1989b; Wengler e Wengler, 1993). A NS5 (103 kDa), por sua vez, é a maior e mais altamente conservada das proteínas virais (Mandl *et al.*, 1989) e exerce a função de RNA polimerase viral, por possuir elementos estruturais próprios de RNA polimerases (O'Reilly e Kao, 1998), assim como atividade de RNA polimerase dependente de RNA (Steffens *et al.*, 1999; Ackermann *et al.*, 2001; Guyatt *et al.*, 2001) e de capeamento do RNA viral.

As proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são pequenas proteínas pouco conservadas entre os *Flavivirus*, mas contém múltiplos domínios hidrofóbicos conservados em sua posição, sugerindo que estas proteínas possam se apresentar associadas à membranas (Mandl *et al.*, 1989). NS2A (~ 23kDa) parece ser requerida para o correto processamento da proteína NS1 (Falgout *et al.*, 1989). NS2B pode se associar com a proteína NS3 funcionando como um co-fator para o complexo proteolítico viral (Falgout *et al.*, 1991; Chambers *et al.*, 1993; Jan *et al.*, 1995). A proteína NS4A (~ 16 kDa) parece interagir com a NS1 e, dessa forma, teria um papel durante a replicação do RNA (Lindenbach e Rice, 1999). Já a NS4B (~ 27 kDa), parece atuar sobre replicação viral via interação com a NS3 (Umareddy *et al.*, 2006). Uma vez que a síntese de RNA viral ocorra no citoplasma da célula infectada, em associação com a membrana do RE, postula-se que estas proteínas, por conterem estes domínios hidrofóbicos, estariam agregadas a membranas e participariam de complexos replicativos por meio de interações com NS3 e NS5 (Rice, 1996).

A organização do genoma e o processamento da poliproteína podem ser acompanhados pelo esquema a seguir:

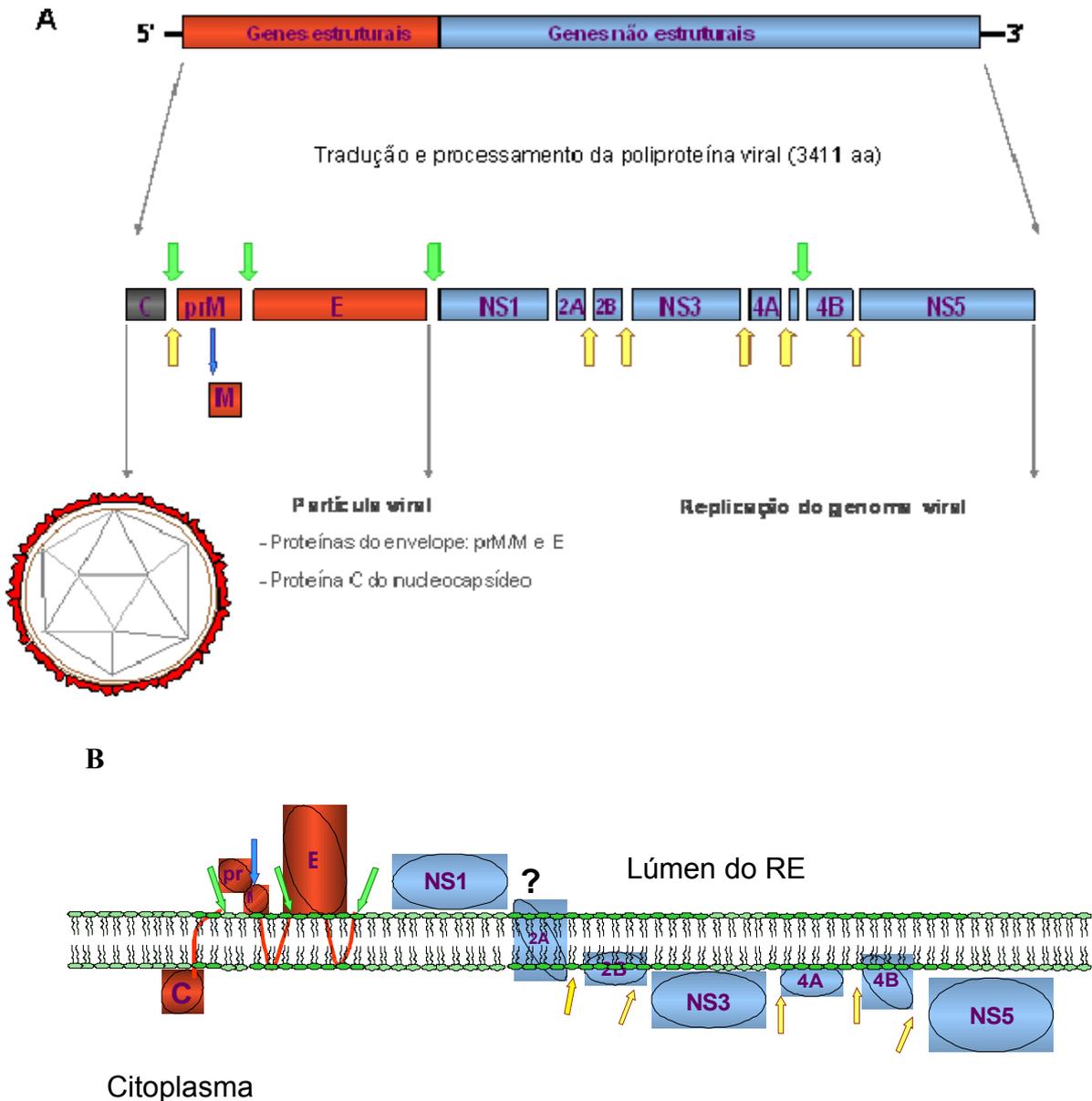


Figura 1.1: Organização do genoma do vírus FA. (A) Organização do genoma de flavivírus e processamento da poliproteína viral para formação das proteínas estruturais (C, prM/M e E) e não estruturais (NS) virais. (B) Disposição das proteínas em relação à membrana do retículo endoplasmático e ao citoplasma celular. As setas indicam os sítios de clivagem da poliproteína viral para formação das proteínas maduras. Seta verde: clivagens por peptidase sinal celular; seta amarela: clivagem por proteases virais; seta azul: clivagem por furina; ponto de interrogação, protease de origem desconhecida. Fonte: Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus – IOC/FIOCRUZ

1.2. Ciclo de replicação viral:

Acredita-se que os flavivírus entrem na célula por endocitose mediada por receptores específicos para as proteínas do envelope e, a ligação da proteína a receptores celulares induz a formação de vesículas endocíticas recobertas por clatrina. Após a internalização, o ambiente

ácido do endossoma provoca a trimerização da proteína E que resulta na fusão das membranas viral e da célula (Allison *et al.*, 1995), com conseqüente liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. No interior da célula, a fita de RNA viral positiva, serve como molde para a produção de fitas negativas que, por sua vez, servirão de molde para a produção de outras fitas positivas. Estas fitas positivas poderão então ser usadas para a tradução da poliproteína ou serem encapsidadas para formar virions (Lindenbach e Rice, 2001; Lindenbach e Rice, 2003; Chambers *et al.*, 1990a). A montagem das partículas virais ocorre em associação com a membrana do RE das células infectadas, onde a formação do nucleocapsídeo ocorre com a interação entre o domínio citoplasmático da proteína C com o RNA genômico viral. As proteínas prM e E são translocadas para o RE e ficam ancoradas na membrana por seus domínios hidrofóbicos transmembranares. A formação das partículas virais ocorre por meio do envolvimento do nucleocapsídeo viral com as proteínas do envelope ancoradas na membrana do RE celular. Os virions imaturos brotam para o lúmen do RE, adquirindo, assim, um envelope lipídico e partem seguindo a via secretora sendo liberados como virions maduros, após o fusionamento das vesículas à membrana plasmática das células hospedeiras (Mackenzie e Westaway, 2001; Lindenbach e Rice, 2001; Chambers *et al.*, 1990a) (Figura 1.2).

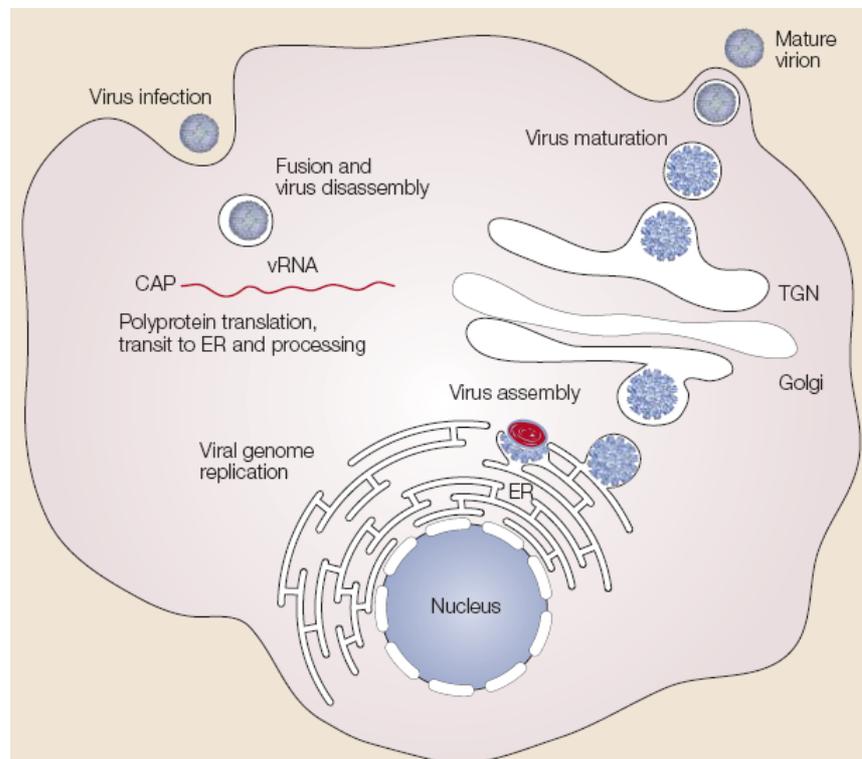


Figura 1.2: Ciclo replicativo de *Flavivirus*. Fonte: Mukhopadhyay *et al.*, 2005.

1.3. A Febre Amarela, ciclo biológico e vacina:

A Febre Amarela é uma zoonose endêmica das regiões tropicais da África e América do Sul. A apresentação clínica da doença pode variar desde sintomas brandos e inespecíficos até febre hemorrágica fatal. Durante o período de incubação, que pode durar entre 3 a 6 dias, podem ser observadas febre, dor de cabeça, náusea, vômitos, mialgia generalizada e calafrios. Neste período, os vírus estão presentes no sangue do paciente a títulos entre 10^5 - 10^6 partículas infecciosas podendo este servir como fonte de infecção para os mosquitos. O período de incubação pode ser seguido pelo período de remissão, caracterizado pelo desaparecimento dos sintomas por até 24 horas. Neste período o vírus é combatido por anticorpos e pela resposta imune celular do hospedeiro. Pacientes com infecções abortivas podem passar deste estágio sem mais sintomas e sinais, mas, entre 15% a 25% das pessoas afetadas progridem para a fase de intoxicação. Nesta fase, a doença se apresenta de forma mais severa com febre, vômitos, dor epigástrica, insuficiência renal, prostração e hemorragia, podendo, o paciente, ser levado ao óbito. Dentre os eventos precedentes ao óbito estão hipotensão, delírio, coma, hipoglicemia e hipotermia. (Monath, 2001).

A primeira epidemia reportada de Febre Amarela data de 1648 na Península de Yucatan (Monath, 1988 e Soper, 1944). A expansão geográfica da doença tem sido relacionada ao espalhamento dos mosquitos *Ae. aegypti* oriundos da África em virtude das práticas comerciais com outras regiões dos trópicos nos séculos XVII e XVIII. Um maior entendimento sobre a epidemiologia da Febre Amarela veio em 1900 quando Reed e a Comissão de Febre Amarela, em Cuba, documentaram que a doença era causada por um agente filtrável transmitido por mosquitos *Ae. aegypti* (Reed *et al.*, 1901). A partir de então, foram amplamente implementados programas de controle e prevenção, focando o controle do vetor *Ae. aegypti* que resultou num grande declínio no número de epidemias e incidência de Febre Amarela. Após alguns anos de ausência, a Febre Amarela reemergiu em algumas regiões e, investigações levaram a descoberta de um ciclo selvagem da doença (Monath, 1988 e Soper, 1944). Pôde-se, então, diferenciar duas formas de transmissão: por um ciclo urbano (Febre Amarela urbana) e por um ciclo silvestre (Febre Amarela silvestre). Na América do Sul o ciclo silvestre é mantido entre macacos e transmitida por mosquitos do gênero *Haemagogus*, enquanto que, na África a transmissão se dá através de mosquitos da espécie *Ae. africanus*. Este ciclo de transmissão para seres humanos ocorre de forma acidental pelo contato com áreas silvestres. A Febre Amarela urbana ocorre pela transmissão entre seres humanos através do mosquito do gênero *Aedes sp* e o controle da doença foi obtido por meio de programas de combate ao mosquito vetor e principalmente dos programas de vacinação.

O primeiro isolado do vírus da Febre Amarela foi obtido a partir de amostras de sangue humano coletado de um indivíduo chamado Asibi, cujo nome passou a identificar a linhagem virulenta do vírus (Stokes *et al.*, 1928). Esta cepa foi sub-cultivada em tecido embrionário de camundongo e em embrião de galinha com ou sem tecido nervoso. Após 18 passagens foi isolada a cepa denominada 17D. Esta cepa foi submetida a 58 passagens em tecido embrionário completo de galinha e, depois, a 114 passagens em tecido embrionário de galinha desnervado. Nesta passagem, o vírus apresentou sinais de atenuação, além da perda da capacidade de ser transmitida pelos insetos vetores. Na passagem 195, foi obtida a subcepa 17DD. Em 1936, as passagens 227 e 229 desta cepa foram utilizadas em 8 voluntários com resultados satisfatórios (Theiler *et al.*, 1937). Na passagem 195, a cepa 17DD foi isolada e independentemente passada outras 48 vezes em cultura de tecido quando, então foi propagada em ovos embrionados até a passagem 286. O vírus FA 17DD foi recuperado a partir do homogenado de embrião sendo administrado em humanos (Santos *et al.*, 1995).

Em 1937, a cepa 17D foi trazida para o Brasil, onde se estabeleceu uma produção local e uma campanha de vacinação em massa, em 1938, com mais de 2 milhões de pessoas imunizadas (Monath, 2007). Atualmente, BioManguinhos – FIOCRUZ é o seu maior produtor mundial e o único produtor da subcepa 17DD, utilizada na vacinação no Brasil (Post *et al.*, 2001). Foi possível, assim, o desenvolvimento da vacina atenuada, que tem sido amplamente utilizada para a vacinação humana (aproximadamente 400 milhões de pessoas) com eficácia e segurança por cerca de 60 anos, causando raros efeitos colaterais severos ou morte. Os níveis de proteção por anticorpos neutralizantes aparecem em 90% dos vacinados dentro de 10 dias e, 99% dentro de 30 dias após a vacinação (Monath, 2001). A imunidade é durável, apresentando proteção de cerca de 10 anos após uma dose simples da vacina.

Desde sua utilização, há mais de 60 anos, alguns casos de reação adversa foram relatados. Estes casos, em geral, são brandos onde cerca de 20 - 25% dos vacinados podem reclamar de sintomas como dor e vermelhidão no local da injeção, dor de cabeça e mialgia que aparecem por poucos dias após a vacinação. Como efeito severo, já pôde ser observada encefalite pós-vacinal em crianças muito jovens, mas estes casos são extremamente raros. (Monath, 2001). A metodologia de produção desta vacina apresenta baixo custo de produção, é eficaz e bem definida, com um controle de qualidade que inclui testes de neurovirulência em macacos, além de ser geneticamente estável. Diante de tais características, este vírus vacinal tem sido utilizado no desenvolvimento de diversas estratégias para a expressão de genes de outros patógenos, tendo em vista a obtenção de novas vacinas (Pugachev *et al.*, 2005).

1.4. Tecnologia do clone infeccioso:

Devido às dificuldades técnicas, a manipulação genética da molécula de RNA é limitada. Diante disso, um trabalho pioneiro de Racaniello e Baltimore (1981) mostrou a capacidade de gerar poliovírus, um vírus de genoma de RNA fita positiva, a partir de DNA complementar (cDNA). Baseados nesta metodologia, Rice e colaboradores, em 1989, construíram pela primeira vez um molde completo de cDNA do vírus vacinal 17D, capaz de produzir moléculas de RNA viral infeccioso. A metodologia de clones infecciosos de FA é baseada no sistema de dois plasmídeos onde cada um contém partes do cDNA correspondente ao genoma viral de FA (Figura 1.3). Com este molde, foi possível a obtenção de lotes sementes vacinais, a partir de cDNA, em boas condições e práticas de produção o que, futuramente, poderá se tornar um modo de modernização da produção da vacina contra a Febre Amarela (Galler & Freire, 2001). Além disso, estes cDNAs que correspondem à seqüência completa do genoma de RNA de FA, podem ser utilizados para a introdução de modificações genéticas sendo, posteriormente, transcritos *in vitro* e introduzidos nas células em cultura. As partículas virais resultantes conterão as alterações genômicas que foram introduzidas e espera-se analisar um fenótipo correspondente a tal alteração. Assim, com esta tecnologia são possíveis estudos que visam entender fenômenos como a virulência e atenuação, penetração celular, replicação e o desenho de mutações em regiões do genoma sem função conhecida, bem como, a manipulação do genoma do vírus para a expressão de proteínas pertencentes a outros patógenos, a fim da obtenção de novas vacinas (Bonaldo *et al.*, 2000).

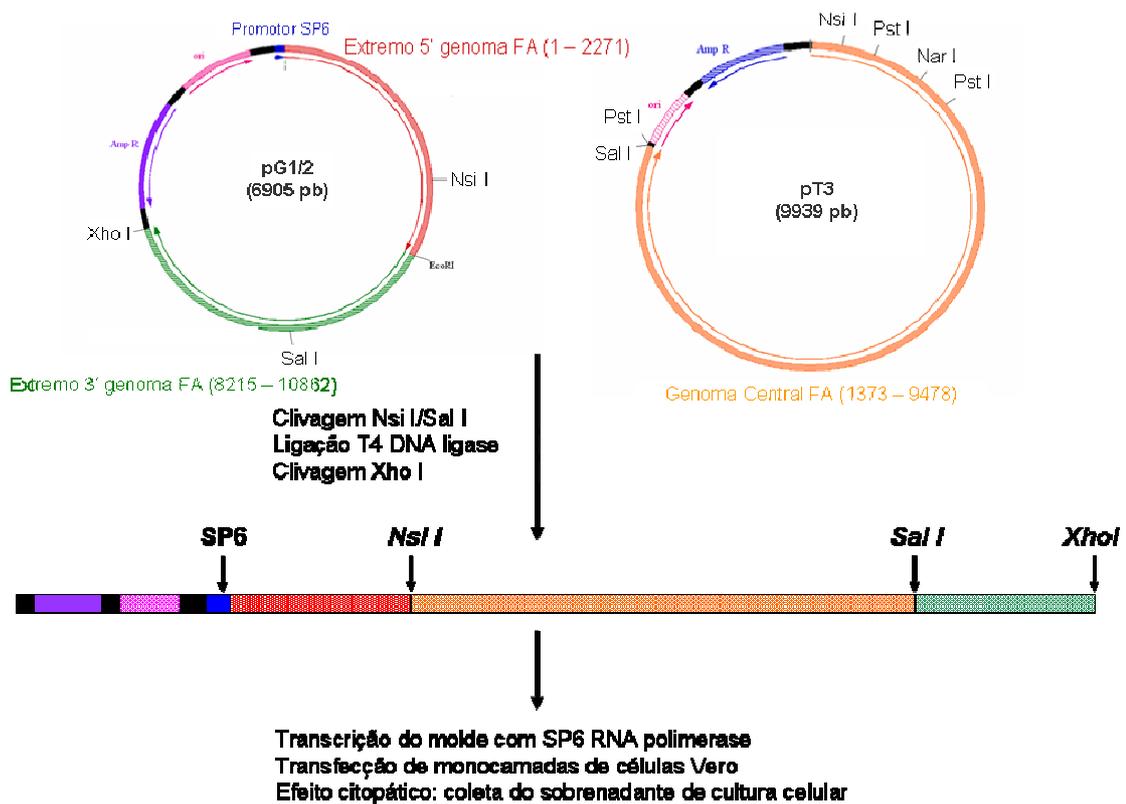


Figura 1.3: Esquema representativo do sistema de dois plasmídeos que constituem o clone infeccioso do vírus da FA. O molde de cDNA correspondente ao genoma viral é obtido após reações de clivagens seguidas de reações de ligação com os fragmentos obtidos. Os clones circulares são linearizados e a presença de uma região promotora da RNA polimerase do bacteriófago SP6 permite a síntese do RNA viral infeccioso *in vitro*. Fonte: Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus – IOC/FIOCRUZ.

1.5. Diferentes abordagens referentes ao uso do vírus vacinal 17D como vetor de expressão de genes heterólogos:

Diferentes estratégias para a expressão de genes heterólogos são possíveis e estas variam de acordo com a região do genoma viral eleita e o antígeno a ser expresso. Em geral, a expressão de antígenos heterólogos em um genoma viral, com potencial para o desenvolvimento de novas vacinas, deve respeitar alguns critérios básicos. Podemos mencionar, por exemplo, que o desenvolvimento de estratégias, que permitam a inserção de genes exógenos no genoma do vírus, não pode comprometer a sua viabilidade. Além disso, deve-se garantir que a criação destes novos vírus não leve a geração de um vírus patogênico, de forma que, este tenha certo grau de atenuação, mas mantenha suas propriedades imunogênicas e expresse o antígeno exógeno para que este também induza resposta imune adequada. Um outro critério é que estes vírus sejam capazes de se multiplicar em culturas de

células certificadas para a produção de vacinas e que ao longo de inúmeros eventos de multiplicação viral, a seqüência exógena possa se manter estável no seu genoma.

Com relação à utilização do vírus vacinal FA 17D como vetor de expressão de genes heterólogos, a abordagem de maior sucesso, até o presente momento, diz respeito à criação de vírus quiméricos através da substituição dos genes prM/E de FA pelos genes homólogos de outros flavivírus (Monath *et al.*, 2002; Monath *et al.*, 2003; Lai *et al.*, 2003; , Chambers *et al.*, 1999; Guirakhoo *et al.*, 2002). Dessa forma, são produzidos vírus quiméricos que contêm a maquinaria de replicação de um flavivírus e expressam proteínas de envelope de outro flavivírus (Figura 1.4). Como a proteína E é o principal alvo para a resposta imune do hospedeiro, a substituição dos genes prM/E induziria uma resposta dirigida contra o vírus doador desta seqüência. Esta estratégia foi primeiramente descrita por Bray e Lai (1991, US Patents 6,184,204 e 6,676,936) onde os novos vírus continham os genes prM/E de Dengue 1 e 2 e o restante do genoma de Dengue 4. Novas vacinas candidatas, utilizando o vírus FA como vetor, estão sendo submetidas a testes clínicos se mostrando altamente imunogênicas e bem toleradas (Pugachev *et al.*, 2005). Em nosso grupo de pesquisa, esta estratégia também foi abordada, a fim da obtenção de uma vacina quimérica contra a dengue 2 que se mostrou imunogênica em camundongos e macaco *Rhesus* (Caufour *et al.*, 2001; Galler *et al.*, 2005).

Vírus quimérico FA/Den2

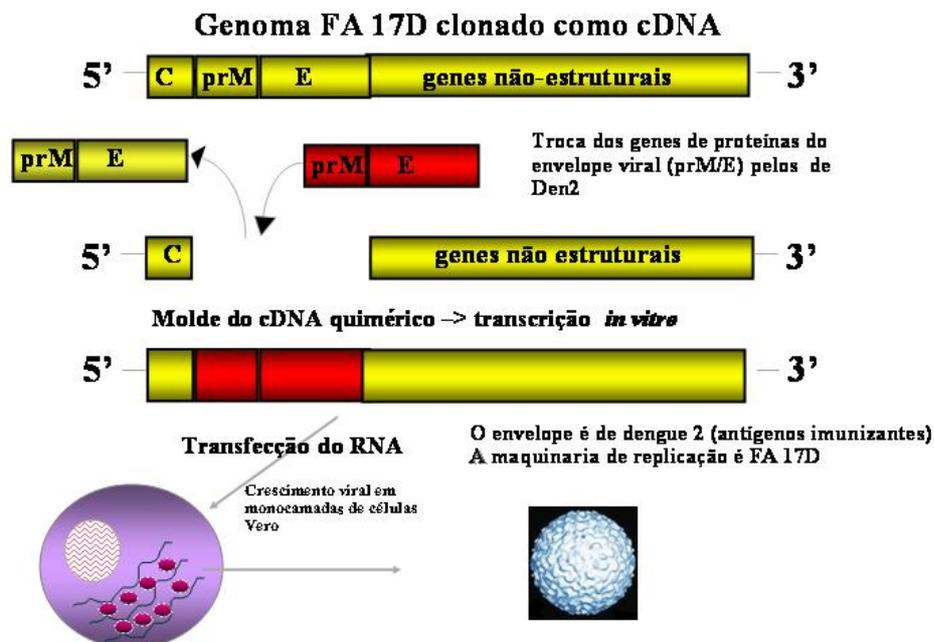


Figura 1.4: Substituição dos genes prM/E do vírus da Febre Amarela pelos genes homólogos do vírus Dengue. Fonte: Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus – IOC/FIOCRUZ.

heterólogas de epítomos de 10 a 25 aminoácidos (Bonaldo *et al.*, 2002; Bonaldo *et al.*, 2006) (Figura 1.6). Por meio de análises tridimensionais por modelagem molecular, foi possível a identificação de locais viáveis para a inserção destes epítomos heterólogos e, a determinação das melhores características físico-químicas da seqüência de aminoácidos a ser inserida nesta região (Bonaldo *et al.*, 2006). A alça *fg* da proteína E, um sítio que é exposto na superfície do vírus, foi identificado como uma destes possíveis sítios de inserção, e alguns epítomos de diferentes microorganismos foram inseridos e expressos nele (Bonaldo *et al.*, 2002; Bonaldo *et al.*, 2005). Além deste, um outro sítio também foi determinado (a alça E₀F₀ da proteína E) e estudos semelhantes estão sendo realizados.

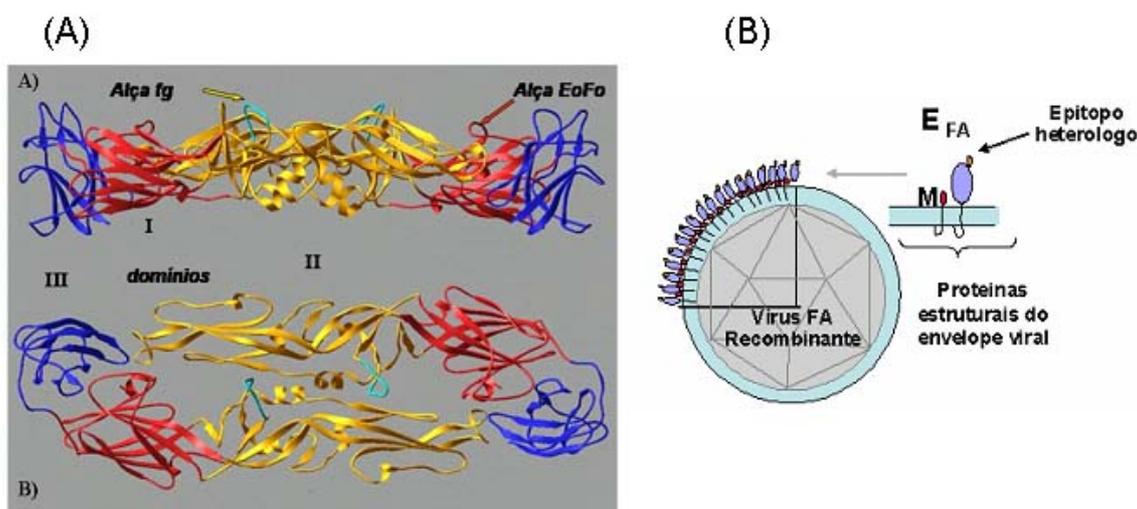


Figura 1.6: Estratégia de inserção de epítomos na proteína E. (A) Modelo em 3D da proteína E do envelope viral, vista lateral (topo) e superficial (baixo). Os dois sítios que foram escolhidos para a inserção de seqüências exógenas, as alças *fg* e E₀F₀ estão indicadas por uma seta. (B) Grau de representatividade do epítomo heterólogo na superfície viral. Fonte: Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus – IOC/FIOCRUZ.

Uma outra abordagem, descrita pela primeira vez por Andino e colaboradores (2002), utiliza os chamados sítios internos de entrada ribossomal (SIER) e se refere à inserção de genes na região 3' não-traduzida, por meio da criação de sítios de restrição nesta região. Com esta estratégia, é gerado um módulo de tradução bicistrônico, onde o segundo cistron, contendo o gene heterólogo, permite a entrada da subunidade ribossomal e a expressão deste gene na região 3' não-traduzida, de forma independente da tradução da poliproteína viral (Figura 1.7). Os resultados obtidos por este trabalho apontaram para deleções nucleotídicas nestes vírus, indicando uma instabilidade genética relacionada a esta estratégia de inserção. Nosso grupo obteve vírus 17D por esta metodologia, mas estes foram instáveis geneticamente, visto que, perderam a seqüência heteróloga logo na primeira passagem em

monocamadas celulares. A instabilidade genética de inserções realizadas por esta metodologia foi também demonstrada por Pierson e colaboradores (2005).

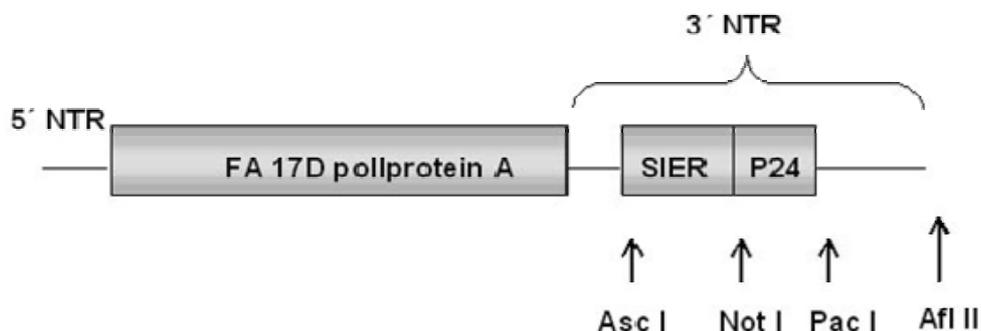


Figura 1.7: Estratégia de inserção de gene heterólogo na região 3' não-traduzida. Fonte: Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus – IOC/FIOCRUZ.

Outra abordagem explorada para o uso do vírus 17D como vetor de antígenos heterólogos, diz respeito à utilização de replicons. Estas moléculas foram desenvolvidas a partir do genoma viral com a retirada das regiões contendo os genes estruturais necessários à formação da partícula viral. Nelas restam apenas os genes envolvidos na replicação do RNA viral que, quando contendo genes heterólogos, permitem a expressão transitória destes genes sugerindo a possibilidade de seu uso em vacinação (Khromykh, 2000; Westaway *et al.*, 2003; Harvey *et al.*, 2004; Tannis *et al.*, 2005). Uma série de replicons foram desenvolvidos a partir do vírus vacinal 17D (Jones *et al.*, 2005), mas não houve nenhum estudo mostrando a imunogenicidade dos genes heterólogos produzidos nem a estabilidade genética dos mesmos, assim como não foram especificados os níveis de expressão das proteínas heterólogas. Desta forma, a utilização desta metodologia para a obtenção de novas vacinas não foi estabelecida, estando seu uso, portanto, limitado a estes estudos.

1.6. Expressão de proteínas heterólogas na região intergênica E/NS1

Uma tecnologia recentemente desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa foi alvo de depósito de patente em outubro de 2005 (Bonaldo *et al.*, 2007). Esta estratégia se baseia na inserção de seqüências maiores entre os genes que codificam as proteínas E e NS1, no vírus vacinal FA 17D. Esta região de inserção, também foi explorada por um outro grupo de pesquisa, onde o vírus vacinal FA 17D foi capaz de se replicar em cultura celular e expressou eficientemente a proteína pré-GPC (glicoproteína precursora) de Lassa vírus. Este vírus recombinante foi capaz de induzir a produção de anticorpos específicos contra a proteína

heteróloga e também contra o vírus FA. Além disso, 80% das cobaias que receberam uma única dose subcutânea deste vírus foram protegidas contra uma dose letal de Lassa vírus (Bredenbeek *et al.*, 2006). Neste trabalho é mencionado que a seqüência heteróloga foi estável até a 5ª passagem viral em cultura celular, entretanto, não houve a demonstração formal desta informação, sendo esta característica de grande importância para fins de produção e utilização de vírus recombinantes como vacina.

A região intergênica E/NS1, por constituir de uma região de transição entre genes estruturais e não-estruturais, foi eleita para a inserção de seqüências exógenas, pois parece ser uma boa região quando se tem por objetivo interferir o mínimo possível sobre o processamento e viabilidade dos vírus recombinantes. No entanto, as características importantes que compreendem o processamento desta região e, conseqüentemente, da poliproteína viral devem ser estudadas e consideradas. Sabe-se que durante o processamento da poliproteína viral, a proteína E fica ancorada na membrana do RE por sua região C-terminal, denominada Haste-âncora (HA). A região HA de Flavivírus é constituída da região Haste, que contém os elementos H1, H2 e CS (conecta as hélices, H1 e H2) e Âncora, que contém as regiões transmembranares TM1 e TM2 (Allison *et al.*, 1999) A Haste é constituída de duas α -hélices (H1 e H2) e, como um prolongamento da Âncora para o meio hidrofílico, sustenta a proteína E acomodando eletrostaticamente a superfície inferior do seu ectodomínio, em relação aos fosfolípídeos da membrana (Zhang *et al.*, 2003). A Âncora é constituída de duas α -hélices anti-paralelas (TM1 e TM2), onde a TM1 se insere na membrana do RE da célula infectada durante a replicação viral e, posteriormente, mantém-se inserida no envelope do vírus ancorando a proteína E em sua superfície (Zhang *et al.*, 2003). A região TM2 serve como peptídeo-sinal para o processo de translocação de NS1 no RE (Op de Beeck *et al.*, 2004) e retém o sítio de clivagem para a peptidase sinal celular no motivo VXA, possibilitando o processamento desta proteína. Por sua vez, a seqüência de aminoácidos DXGC da região N-terminal de NS1 é bastante conservada em *Flavivirus*.

Tendo em vista este panorama, a estratégia desenvolvida por Bonaldo e colaboradores (2007) levou à construção de uma plataforma de expressão para a proteína heteróloga EGFP, respeitando estes motivos que são importantes para o ideal processamento da poliproteína viral. Dessa forma, o vírus recombinante resultante expressa a proteína heteróloga, flanqueada pelos 9 primeiros aminoácidos da proteína NS1, na região N-terminal e, pelo domínio completo da HA de FA na região C-terminal (Figura 1.8). Com a duplicação da região N-terminal de NS1, ficam asseguradas, a clivagem pela peptidase sinal celular, acarretando na formação do C-terminal da proteína E, e a liberação do N-terminal da proteína recombinante

no lúmen do RE. Por outro lado, a duplicação do domínio HA do vírus FA, no C-terminal da proteína exógena, permite a translocação e processamento da proteína NS1 no RE, devido à presença do domínio TM2.

Por meio deste modelo de inserção, ficam asseguradas as condições para o ideal endereçamento das proteínas E e NS1, na membrana e lúmen do RE, respectivamente, e, além disso, o ancoramento da proteína exógena na membrana do retículo endoplasmático pode ocorrer graças à presença das regiões transmembranares TM1 e TM2.

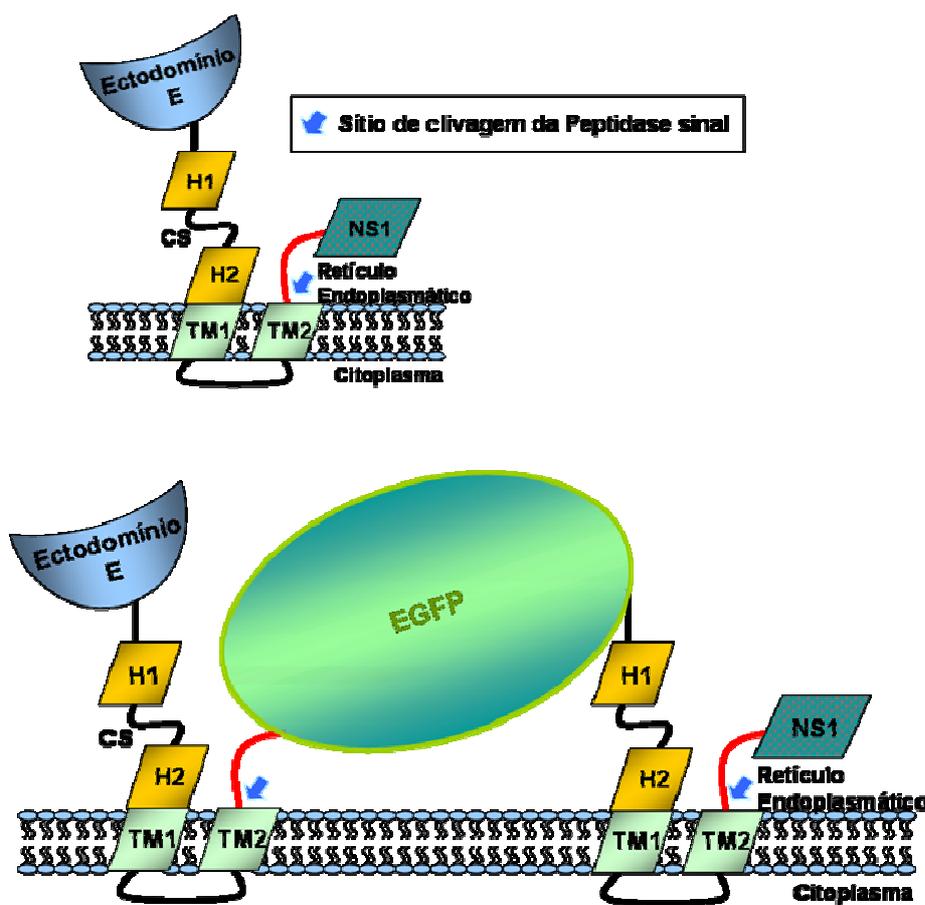


Figura 1.8: Plataforma de expressão da proteína EGFP no clone infeccioso 17D. As regiões correspondentes ao domínio haste (H1 e H2) e âncora (TM1 e TM2) da proteína E encontram-se duplicadas e uma das cópias fusionada à região C-terminal da proteína heteróloga. Na região N-terminal da proteína, encontram-se fusionados os nove primeiros aminoácidos da proteína NS1 seguidos da segunda cópia dos domínios haste e âncora da proteína E. Fonte: Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus – IOC/FIOCRUZ.

Foram construídos dois vírus com esta tecnologia, onde o segundo vírus representava uma variação desta estratégia, uma vez que a plataforma inserção da proteína heteróloga (EGFP) continha apenas parte da região HA FA duplicada, de onde foram omitidos os

elementos H1 e CS. Esta construção foi realizada alternativamente, visto que a deleção destas porções da HA poderia resultar num efeito diferenciado sobre o ciclo do vírus recombinante resultante, quando comparado àquele contendo a região HA completa. Tendo em vista a função de cada uma das porções desta região, os elementos H1 e CS foram excluídos por aparentemente representarem menor potencial de perturbação do sistema (Mello, 2007). O elemento H2 foi mantido, pois é constituído de uma hélice contínua com o elemento TM1 (Allison *et al.*, 1999, Zhang *et al.*, 2003) e sua exclusão poderia resultar numa desestabilização desta porção.

Os resultados, obtidos com tal abordagem, foram promissores nos aspectos relacionados com a taxa de proliferação viral e imunogenicidade. Os vírus replicaram-se e expressaram EGFP de forma eficiente. Além disso, foram capazes de induzir a produção de anticorpos, tanto para EGFP quanto para o vírus FA 17D, embora os títulos de anticorpos neutralizantes anti-FA tenham sido menores (Bonaldo *et al.*, 2007). Com relação à estabilidade do inserto no genoma após cultivo celular, não foi detectada a perda da inserção até a 10^a passagem para o vírus FA17D/Esa/5.1 glic (que possui a HA FA completa fusionada ao gene da EGFP), e foi observada a perda de inserção heteróloga de parte da população viral até a 5^a passagem do vírus FA17D/Esa trun/4 glic (que possui a HA FA truncada fusionada ao gene da EGFP - Bonaldo *et al.*, 2007; Mello, 2007). Diante da necessidade do aumento da imunogenicidade e estabilidade genética viral, uma tentativa de aprimoramento da plataforma viral de expressão de antígenos heterólogos começou a ser estabelecida.

A perda do inserto poderia estar sendo favorecida pela duplicação do domínio HA do vírus de FA que, no momento da replicação viral poderia interferir no pareamento correto do intermediário dupla fita de RNA. Esta evidência foi reforçada, por meio de resultados obtidos com um vírus quimérico FA/Den4, construído em nosso laboratório. Este vírus foi obtido pela substituição das proteínas prM/E do vírus FA pelas proteínas homólogas do vírus Dengue 4, segundo a metodologia já mencionada acima nesta dissertação. Entre a região E/NS1 deste vírus, foi inserida a plataforma de expressão de EGFP contendo a HA FA, que possui uma percentagem de identidade seqüencial menor em relação à HA Den4. Foi observado que a inserção heteróloga se manteve estável no genoma até a 20^a passagem em cultura celular (Bonaldo *et al.*, 2007). Portanto, estes resultados indicavam que um aumento de estabilidade da inserção heteróloga, utilizando esta estratégia, poderia ser possível com a diminuição de identidade seqüencial entre as porções HA duplicadas no genoma recombinante.

Baseada nesta suposição, esta dissertação se propôs a desenvolver dois vírus recombinantes semelhantes aos construídos anteriormente (Bonaldo *et al.*, 2007; Mello,

2007), mas com um desempenho melhor de estabilidade genética da inserção no genoma viral. Para isto, propomos a construção de plataformas de inserção de EGFP mediante a substituição das HA da proteína E de FA pelas homólogas do vírus Dengue 4, com a finalidade de diminuir a identidade entre as duas seqüências HA duplicadas no genoma viral recombinante. Com isso, esperávamos que houvesse uma diminuição potencial em possíveis mal-pareamentos dos intermediários dupla-fita de RNA, durante o processo replicativo viral, que poderiam acarretar em formas defectivas do gene heterólogo, resultando em variantes virais que perderam a inserção. Decidiu-se então pela construção das duas plataformas descritas anteriormente por Bonaldo *et al.* (2007) e Mello (2007) fusionados aos elementos HA den4 completo e truncado, este último sem os elementos H1 e CS do domínio haste. Adicionalmente, optou-se pela geração de uma nova plataforma genômica viral para a expressão do cassete de expressão da EGFP pela substituição de um dos plasmídeos geradores do molde de cDNA viral, pois a previamente utilizada parecia ser mais atenuada que a do vírus FA 17D, o que poderia estar explicando, em parte, a menor capacidade de indução de anticorpos neutralizantes anti-FA pelos vírus FA recombinantes (Bonaldo *et al.*, 2007). Este trabalho de Dissertação trata destes aperfeiçoamentos introduzidos no desenvolvimento da plataforma FA 17D para a expressão de antígenos heterólogos.

2. Objetivos:

2.1. Objetivo Geral:

Desenvolver vírus da Febre Amarela 17D recombinantes expressando a proteína heteróloga EGFP fusionada aos domínios Haste e Âncora, ou parte destes, da proteína E do vírus Dengue 4, e inserida entre os genes das proteínas E e NS1 do genoma viral, como uma estratégia de aprimoramento da tecnologia desenvolvida por Bonaldo e colaboradores (2007).

2.2. Objetivos específicos:

2.2.1. Criação dos vírus 17D recombinantes:

- Clonar e expressar o gene da proteína fluorescente EGFP por meio de inserção na região intergênica E/NS1 do vírus vacinal de Febre Amarela cepa 17D, utilizando a tecnologia do clone infeccioso.

2.2.2. Caracterização biológica e genética dos vírus FA 17D recombinantes:

- Obter um lote de estoque viral de segunda passagem celular para uso em todas as etapas deste projeto;
- Comparar o potencial de proliferação dos vírus FA 17D recombinantes em relação ao vírus vacinal 17DD;
- Caracterizar a expressão de EGFP pelos vírus FA 17D recombinantes;
- Estabelecer a estabilidade dos insertos no genômica viral após passagem seriada em monocamadas celulares e compará-la com a estabilidade apresentada pelos vírus desenvolvidos por Bonaldo e colaboradores (2007) e Mello (2007).

3. Material e métodos

Os meios e soluções utilizados durante o desenvolvimento de todas as etapas deste trabalho têm sua composição descrita no item 3.15 desta seção. Meios e soluções utilizados para o cultivo e manutenção de células Vero foram produzidos pela estrutura do Laboratório de Sarampo (LASA/DEPRO/BioManguinhos - FIOCRUZ).

3.1. Certificados

As etapas envolvidas na construção e clonagem dos genomas virais em *E. coli* foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, que possui licença para trabalho com Organismos Geneticamente Modificados (OGM) nível I emitida pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio - CQB 105/99).

As etapas de obtenção e caracterização dos vírus FA 17D foram desenvolvidas no Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV) do Departamento de Desenvolvimento Tecnológico de Bio-Manguinhos – FIOCRUZ que, de acordo com a licença emitida pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio - CQB 110/99), enquadra-se para trabalho com Organismos Geneticamente Modificados (OGM) nível II.

Os experimentos com camundongos foram realizados nas instalações do Laboratório de Experimentação Animal (LAEAM/DEQUAL/BioManguinhos/FIOCRUZ) em concordância com o CQB 110/99 da CNTBio.

3.2. Bactérias

Nas etapas de clonagem molecular foram utilizadas as linhagens de bactérias *E.coli* DH5 α (Invitrogen), MC1061 (Promega) e SURE (Stratagene). (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Características genotípicas das cepas bacterianas utilizadas nas etapas de clonagem.

Cepa de <i>E.coli</i>	Genótipo
DH5α-T1^R	F ⁻ δ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ ,m _k ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA</i> (resistente ao fago T1)
MC1061	F ⁻ <i>araD139</i> Δ (<i>araABC-leu</i>), 7679 <i>galU</i> <i>galK</i> Δ <i>lacX74</i> , <i>hsdR</i> (r _k ⁻ ,m _k ⁺), <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>thi-1 mcrB</i> (P3: Kan ^R , Amp ^R (amber), Tet ^R (amber))
SURE (<i>Stop Unwanted Rearrangement Events</i>)	e14-(McrA-) Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)171 <i>endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB</i> <i>recJ sbcC umuC::Tn5</i> (Kan ^R) <i>uvrC</i> [F' <i>proAB lacIqZ</i> Δ M15 Tn10 (Tetr)].

A cepa DH5 α quimiocompetente era provida pelo kit de clonagem *Zero Blunt TOPO* (Invitrogen) e ficava estocada a -70°C, estando pronta para o uso. As cepas MC1061 e SURE ficavam estocadas à -20°C na presença de 15% de glicerol (Sigma) (estoque bacteriano), após serem cultivadas em meio LB.

Resumidamente, as células *E.coli* MC1061, para preparação de bactérias quimiocompetentes, foram preparadas realizando-se um pré-inóculo de 20 μ L de bactéria comercial em 5 mL do meio BHI (Brain Heart Infusion) seletivo incubado durante a noite a 37 °C sob agitação de 200 rpm (Environ-Shaker, Lab-Line). Após o período de incubação, o inóculo foi renovado em 50 mL do mesmo meio e esta nova cultura foi cultivada durante 1-2 horas até atingir uma OD de 0,5 (600 nm). Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 4°C por 10 min a 5000 rpm (Sorvall, rotor SL-250T), o sobrenadante foi retirado e o precipitado bacteriano ressuspense em 5 mL de cloreto de cálcio gelado (100 mM). Mais 25 mL de cloreto de cálcio gelado foram adicionados e a suspensão foi incubada em gelo por 30 min. Uma nova centrifugação foi realizada a 4° C por 5 min a 5000 rpm (Sorvall, rotor SL-250T), o sobrenadante foi retirado e o precipitado foi ressuspense em 2,5 mL de cloreto de cálcio gelado (100 mM). As suspensões de bactérias competentes foram incubadas em gelo por 2 h e glicerol foi adicionado para uma proporção de 15 % em volume final. A suspensão foi alíquotada e armazenada a - 70°C.

Para preparação de bactérias eletrocompetentes, foi preparado um pré inóculo de 10 μ L de bactéria comercial em 5 mL do meio BHI contendo Kanamicina (10 μ g/mL) e Ampicilina (10 μ g/mL), durante a noite a 37 °C sob agitação de 200 rpm (Environ-Shaker,

Lab-Line). Após incubação, 2 mL deste pré-inóculo foi adicionado em 200mL de BHI contendo Kanamicina (10µg/mL) e Tetraciclina (10µg/mL) e, posteriormente, foram incubados a 37 °C sob agitação de 200 rpm (Environ-Shaker, Lab-Line), até atingir DO de 0,6 em espectrofotômetro. As bactérias foram, incubadas em gelo, por 15 minutos e, e centrifugadas a 4500 (Sorvall, rotor SL-250T) rpm a 4° C. O precipitado de bactérias foi lavado duas vezes com água deionizada gelada e posteriormente ressuspensão em glicerol 10% estéril e gelado. Um nova centrifugação foi realizada, o sobrenadante foi retirado e o precipitado de bactérias ressuspensão em glicerol a 10% estéril, para um volume final de 0,8mL. A suspensão foi aliqüotada, incubada a -20° C por 1 hora e, depois, estocada a -70° C.

3.3. Cultura de células

Neste trabalho, utilizamos células Vero para realização de todos os experimentos envolvidos na obtenção e propagação viral. Este tipo celular corresponde a células epiteliais normais de rim de macaco Verde Africano (*Cercopithecus aethiops*) adulto e foi obtido a partir da Coleção Americana de Culturas e Depósitos (ATCC, 1994) que assim a denominou linhagem CCL-81 (“Certified Cell Line-81”).

O estoque, propagação e manutenção das células eram de responsabilidade dos técnicos do LATEV seguindo os Protocolos Operacionais Padrões (POP) estabelecidos por Bio-Manguinhos. As passagens eram realizadas semanalmente e a manutenção das células feita em garrafas descartáveis de 175 cm² em meio de cultura Earle 199 completo com 2,5% de NaHCO₃ (sistema fechado) e mantidas em estufa à 37°C com atmosfera de CO₂ 5%.

Uma parte das garrafas mantidas semanalmente pelo LATEV era destinada para a realização deste trabalho. Com 24 horas de antecedência à realização dos experimentos de transfecção, infecção ou propagação dos vírus, a monocamada confluyente de células foi dissociada da garrafa, após ser lavada duas vezes com solução de 50 mL de verseno com 500 µL de tripsina (tripsinização) e incubada a 37°C por 5 minutos. As células foram ressuspensas em 5 mL de meio Earle 199 completo e sua densidade estimada por contagem em câmara de Neubauer (Absler, 1973). Estas células foram novamente cultivadas em densidade e sistemas diferentes de acordo com a necessidade de cada experimento e mantidas em estufa à 37°C com atmosfera de CO₂ 5%. Para manutenção das culturas em garrafas em sistema fechado, era utilizado meio Earle 199 completo com 2,5% de NaHCO₃ e, em placas e garrafas com tampas com filtro (sistema aberto), meio Earle 199 com 5% de NaHCO₃, de forma a se manter o pH adequado em cada um dos sistemas.

3.4. Vírus

3.4.1. Vírus FA 17DD

O vírus FA 17DD corresponde à vacina contra FA produzida por Bio-Manguinhos – FIOCRUZ na forma liofilizada (50 doses) e utilizada na vacinação da população brasileira. A vacina foi armazenada a -70°C até o momento do uso, quando então foi reconstituída em 2 mL de água bidestilada estéril e gelada, homogeneizada e mantida em gelo por 10 minutos. Para propagação deste vírus, a vacina reconstituída foi misturada a 3 mL de meio Earle 199 completo com 2,5 % de NaHCO_3 e incubada sobre monocamada de células Vero (garrafa de 175 cm^2 com densidade de $80000\text{ células/cm}^2$) por 1 hora a 37°C em estufa com atmosfera de CO_2 5%, sendo a garrafa agitada em todas as direções em intervalos de 10 – 15 minutos para adsorção mais homogênea dos vírus às células. Posteriormente, foi adicionado 75 mL de Earle 199 com 2,5% de NaHCO_3 sobre a monocamada e esta foi incubada em estufa até o aparecimento de efeito citopático (CPE) moderado, quando o sobrenadante viral foi aliquotado na presença de sorbitol 8% e estocado a -70°C até o momento de uso.

3.4.2. Vírus FA 17D/G1/2-T3

O vírus parental FA 17D/G1/2-T3 foi desenvolvido por meio da tecnologia de clones infecciosos utilizando os plasmídeos pG1/2 e pT3. Estes plasmídeos foram desenvolvidos por mutagênese em nosso laboratório a partir dos plasmídeos originais pYF5'3'IV e pYFM5.2, respectivamente (Rice, et al 1989).

O plasmídeo pG1/2 é derivado do plasmídeo pYF5'3'IV (Jabor, 2001) e contém o cDNA correspondente a porção 5'-terminal de 2271 pb e a porção 3'-terminal de 2588 pb do genoma do vírus da cepa FA 17D-204 e, além disso, contém um promotor do fago SP6. Este plasmídeo contém alterações nos nucleotídeos 1140, 1436/1437 (no gene da proteína E), 8656, 8808, 9605 (no gene da proteína NS5), 10454 e 10722 (na 3' não-traduzida) quando comparado ao plasmídeo original pYF5'3'IV (Jabor, 2001).

O plasmídeo pT3 é derivado do plasmídeo pYFM5.2 (Jabor, 2001) e possui 9939 pb que contém o cDNA correspondente à região central do genoma do vírus da cepa FA 17D-204 de 6006 pb. Este plasmídeo é mais longo que o original pYFM5.2 uma vez que apresenta um sítio de restrição *Sal I*. Além disso, apresenta alterações nos nucleotídeos 8656 (criando

um sítio de restrição *BstE II*) e 8808 (ambos no gene da proteína NS5), no 2356 (na proteína E) e 2602, 2677 e 2681 (na proteína NS1) (Jabor, 2001).

3.4.3. Vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4

O vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 foi desenvolvido durante a realização deste trabalho, por meio da tecnologia de clones infecciosos, utilizando os plasmídeos pG1/2 e pT3. Este vírus foi construído de forma a conter o gene da proteína EGFP fusionado ao gene que codifica a porção HA do vírus Dengue 4 na região intergênica E/NS1 do genoma do vírus FA.

3.4.4. Vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun

O vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun foi desenvolvido por meio da tecnologia de clones infecciosos utilizando os plasmídeos pG1/2 e pT3. Este vírus foi construído de forma a conter o gene da proteína EGFP fusionado ao gene que codifica a porção HA do vírus Dengue 4, em sua versão truncada, na região intergênica E/NS1 do genoma do vírus FA.

3.5. Purificação e extração de ácidos nucleicos

3.5.1. Extração de DNA plasmidial

A extração de DNA plasmidial em pequena e grande escala foi realizada preparando-se culturas a partir de colônias bacterianas selecionadas de placas seletivas ou a partir de estoque bacterianos em glicerol, em incubação durante a noite a 37°C sob agitação. As culturas foram então processadas utilizando-se os sistemas QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Inc) e *HiSpeed Plasmid Purification Kit* (QIAGEN, Inc), segundo o manual fornecido pelo fabricante

(Qiagen, <http://www1.qiagen.com/literature/Default.aspx?Term=QIAprep+Miniprep&Language=EN&LiteratureType=4%3b8%3b9%3b10&ProductCategory=0>) e <http://www1.qiagen.com/literature/Default.aspx?Term=HiSpeed+Plasmid+Purification+Kit&Language=EN&LiteratureType=4%3b8%3b9%3b10&ProductCategory=0>). Estes sistemas baseiam-se na separação do DNA por afinidade em colunas de sílica após lise alcalina sobre as culturas bacterianas.

Após extração, as amostras de DNA plasmidial foram pré-avaliadas em gel de agarose 0,8% onde, em geral, tinham padrão de migração mais alto para clones positivos com relação aos clones negativos. As bactérias contendo o DNA plasmidial desejado, confirmado por perfil de restrição foram cultivadas e estocadas (secção 3.9.5).

3.5.2. Extração de DNA de gel de agarose

A extração de DNA de gel de agarose foi utilizada para purificar e isolar fragmentos nucleotídicos de peso molecular desejado, de outros fragmentos de pesos moleculares diferentes que compunham uma amostra heterogênea. Para isso as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE e o fragmentos de DNA foram visualizados após coloração com brometo de etídeo (0.5 µg/mL) (BIORAD) por aproximadamente 3 minutos. A área de gel contendo o fragmento de DNA de interesse pôde ser recortada do restante da malha com o auxílio de um bisturi e o DNA foi extraído por meio do sistema *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN) segundo o manual fornecido pelo fabricante (<http://www1.qiagen.com/literature/Default.aspx?Term=QIAquick+Gel+Extraction&Language=EN&LiteratureType=4%3b8%3b9%3b10&ProductCategory=0>). Este sistema baseia-se na separação do DNA por afinidade em colunas de sílica.

3.5.3. Purificação de fragmentos de PCR

Amostras de PCR de produtos homogêneos gerados neste trabalho puderam ser purificadas utilizando o sistema *QIAquick PCR Purification* (QIAGEN) segundo o manual fornecido pelo fabricante (<http://www1.qiagen.com/literature/Default.aspx?Term=QIAquick+PCR+Purification&Language=EN&LiteratureType=4%3b8%3b9%3b10&ProductCategory=0>). Este procedimento foi utilizado com a finalidade de eliminar reagentes utilizados em reações de PCR, de forma que estes reagentes não interferissem nas etapas posteriores, em que os fragmentos desejados fossem utilizados. Este sistema baseia-se na separação do DNA por afinidade em colunas de sílica.

3.5.4. Precipitação de DNA

A precipitação de DNA foi utilizada neste trabalho para purificação e aumento de concentração de amostras de ácidos nucleicos por meio do método de acetato de amônio/etanol (Sambrook *et al.*, 1989). Para isto, foram adicionados às amostras 0,5 volume de acetato de amônia (7,5 M), 3 volumes de etanol absoluto (Merck) e 20 µg de gliocogênio (Invitrogen), este último, utilizado de acordo com a conveniência. A mistura foi submetida à centrifugação a 12.000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de DNA foi lavado após adição de 3 volumes de etanol a 80%, centrifugado por 5 minutos, nas

mesmas condições, e o sobrenadante novamente descartado. Para retirada do excesso de etanol, as amostras foram submetidas a duas centrifugações adicionais com retirada de sobrenadante após cada uma. O precipitado de DNA foi submetido à secagem por exposição ao ambiente e ressuspensão em 10 µL de tampão TE.

3.5.5 Extração de RNA de sobrenadante de cultura celular

A extração de RNA de culturas celulares foi realizada por *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Quiagen) ou pelo método do *TRIZOL LS* (Invitrogen) (Chomczynski e Sacchi, 1987; Chomczynski, 1993). As extrações por *QIAamp Viral RNA Mini Kit* foram realizadas segundo o manual fornecido pelo fabricante (<http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000199>).

Para extrações realizadas pelo método do *TRIZOL LS*, foram homogeneizados vigorosamente 250 µL de suspensão viral em 750 µL de *Trizol LS* por 1 minuto e, posteriormente, o homogenado foi incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck) e a mistura foi homogeneizada vigorosamente por 15 segundos, seguido de incubação de 5 minutos a temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram submetidas à centrifugação de 12.000 g por 5 min durante a qual ocorre a separação de 3 fases. A fase inferior vermelha (orgânica) contém o fenol-clorofórmio, a fase intermediária contém as proteínas e, a fase superior transparente corresponde à fase aquosa onde se encontra o RNA viral. Esta última, foi cuidadosamente retirada e transferida para um tubo novo de 1,5 mL. Para precipitação do RNA, foram adicionados às amostras 20 µg de glicogênio (Invitrogen) e 500 µL de isopropanol absoluto (Merck) e estas foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram novamente centrifugadas a 12,000 g por 10 min e o sobrenadante foi posteriormente descartado. Para lavagem do precipitado de RNA, foi adicionado 1 mL de etanol 75 %, misturado rapidamente e centrifugado a 12.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado de RNA viral obtido foi exposto à temperatura ambiente, de forma a eliminar os traços de solução etanólica por evaporação, e ressuspensão em 20 µL de água livre de *RNase* sendo armazenado a – 70 °C até o momento do uso. Esta etapa foi sempre realizada em condições de esterilidade e com material tratado, livre de nucleases.

3.6. Sequenciamento nucleotídico

Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de sequenciamento, como descrito a seguir, estão listados na tabela 3.2

Tabela 3.2: Oligonucleotídeos utilizados nas reações de sequenciamento.

Oligonucleotídeo	Polaridade	Seqüência	Gene/Posição
RG 19	-	5' GGGAGTCAACTGAATTTAGGC 3'	Proteína NS1 (2638 – 2659)
RG 174	-	5' CGGGGTGTGGAGAGAGATGCA 3'	Proteína E FA (1640 – 1661)
RG 175	+	5' CCCAACTGACACTGGCCATGG 3'	Proteína E FA (1900 – 1921)
RG 355	+	5' CACCTACGGCAAGCTGACCCTGAA 3'	EGFP (111 – 134)
RG 358	+	5' CTCGCCGGACACGCTGAACTTG 3'	EGFP (75 - 96)
RG 359	-	5' CCAGCTTGTGCCCCAGGATGTT 3'	EGFP (403 - 424)

As reações de sequenciamento nucleotídico foram realizadas utilizando-se primeiramente 5 pmoles de oligonucleotídeo e, aproximadamente, 30 - 40 ng de DNA plasmidial ou 40 - 50 ng de produtos de PCR em uma incubação a 95°C por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 2 µl de *Big Dye Terminator* (Applied Biosystems), tampão *Sequencing Buffer* (1x) e água bidestilada (*q.s.p.* 10 µl). As amostras foram submetidas a 30 ciclos de incubação a 94°C por 10 segundos, 45°C por 5 segundos, 60°C por 4 minutos. O sequenciamento das amostras foi realizado em seqüenciador automático modelo ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) da Plataforma multi-usuário de sequenciamento – PDTIS-FIOCRUZ. As seqüências foram analisadas por meio do programa Chromas versão 3.0 (Technelysium Pty Ltd) e do SeqMan II do conjunto Lasergene, versão 5.07 (DNASTar, Inc.). Por meio do sequenciamento foi possível verificar a integridade gênica das plataformas de expressão em diversas etapas deste trabalho.

3.7. Eletroforese de ácidos nucléicos

A eletroforese de ácidos nucléicos foi realizada utilizando gel de agarose nas concentrações de 0,8% e 1% e TAE como solução tamponante do sistema. A corrida eletroforética foi realizada utilizando-se 90 – 120 V. Para visualização dos ácidos nucléicos, o

gel foi exposto por aproximadamente 3 minutos a uma solução de brometo de etídio 0.5 µg/mL (BIORAD), que é capaz de se intercalar às cadeias dos ácidos nucleicos e torna-se fluorescente sob incidência de luz ultravioleta (transiluminador luz UV A 365 nm – Pharmacia LKB Macro Vue). Os padrões de peso molecular utilizados foram Low Mass (Invitrogen), λ Hind III (Invitrogen) e λ EcoR I Hind III (Invitrogen) e, tomando-os como referência foi também possível a quantificação de fragmentos de DNA por meio da comparação da intensidade de bandas da amostra com a dos padrões. As imagens dos géis obtidas com o transiluminador foram registradas utilizando-se câmera digital (Kodak DC120 – programa Kodak 1D Image Analysis)

3.8. Construção das plataformas de expressão de EGFP

Como fonte dos fragmentos gênicos de EGFP e HA Den4 foram utilizados plasmídeos contendo estas regiões de interesse. O plasmídeo pEGFP-N1 (Clontech) foi utilizado para a obtenção e amplificação do gene que codifica a EGFP. Por sua vez, para amplificação dos genes que codificam a HA Den4 em sua versão completa (Construção I) ou truncada (Construção II), foi utilizado o plasmídeo que compõe o clone infeccioso do vírus quimérico FA/Den4 (pFA/Den4), na qual os genes das proteínas estruturais E e prM do vírus FA foram substituídos pelos homólogos do vírus Dengue 4 (R. Galler, em preparação).

Os produtos de PCR gerados foram processados por meio de um dos métodos de purificação de DNA anteriormente descritos, para utilização nas etapas seguintes de construção das plataformas de expressão de EGFP.

3.8.1. Descrição dos oligonucleotídeos sintéticos

Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR descritas a seguir estão listados na tabela 3.3.

Tabela 3.3: Oligonucleotídeos utilizados nas etapas de PCR para obtenção das plataformas de expressão de EGFP (Construções I e II).

Oligonucleotídeo	sentido	Seqüência	TM
RG 328	+	5' CTAGGAGTTGGCGCCGATCAAGGATGCGCCATCAAC TTTGGCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT 3'	55,0°C
RG 380	-	5' GCCAAAGTTGATGGCGCATCCTTGATCGGGCGCCAAC TGTGAAGCCC 3'	72,6°C
RG 396	+	5' GGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGAAGA TGTTTGAGTCCACATACAGAGG 3'	69,3°C
RG 397	-	5' CCTCTGTATGTGGACTCAAACATCTTCTTGATACAGC TCGTCCATGCCGAGAGTGATCC 3'	69,3°C
RG 398	+	5' CTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGACATCATTGG GAAAGGCTGTGCACCAGG 3'	71,6°C
RG 399	+	5' CCTGGTGCACAGCCTTTCCCAATGATGTCTTGTACA GCTCGTCCATGCCGAGAG 3'	71,6°C

3.8.2. PCR dos genes EGFP e HA Den4

Foram utilizadas duas enzimas para as reações de PCR para a obtenção e amplificação dos fragmentos iniciais EGFP e HA Den4, utilizados para a construção de ambas as plataformas de expressão (Construção I e Construção II). Com a enzima *Platinum Taq DNA Polimerase High Fidelity* (Invitrogen) as PCRs foram realizadas em volume final de 50 µL utilizando: 6 ng de pEGFP-N1 ou 30 ng de pFA/Den4, dNTP (0,2 mM cada/Promega), MgSO₄ (1 mM), oligonucleotídeo (20 pmol) e 1U de enzima, nas condições fornecidas pelo fabricante. As reações com a enzima *Platinum Pfx DNA Polimerase* (Invitrogen) foram realizadas em volume final de 50 µL utilizando: 6 ng de pEGFP-N1 ou 30 ng do plasmídeo FA/Den4, dNTP (0,3 mM cada/Promega), MgSO₄ (1 mM), oligonucleotídeo (20 pmol) e 1U de enzima, nas condições fornecidas pelo fabricante l.

As reações foram submetidas a um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos e, posteriormente, 30 ciclos de incubação a 94°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos, 68°C por 1 minuto. Adicionalmente foi realizada uma extensão final a 68°C por 5 minutos. Esta ciclagem foi realizada em Termociclador da marca Applied Biosystems (PCR System 9700, Gene Amp).

Nas PCRs dos fragmentos iniciais para a Construção I, foi utilizado o par de oligonucleotídeos RG 328 (+) e RG 397 (-) (Tabela 3.3) para o fragmento EGFP e o par RG 396 (+) e RG 380 (-) (Tabela 3.3) para o fragmento HA Den 4, com produtos esperados de 782 pb e 347 pb, respectivamente. O RG 328 (+) possui uma porção complementar aos 15 nucleotídeos da região 3'-terminal da proteína E de FA, uma porção complementar aos 27 primeiros nucleotídeos do gene NS1 de FA e uma porção de 21 nucleotídeos complementar à região 5'-terminal do gene EGFP, com a qual ocorrerá pareamento durante a PCR. O RG 397 (-) é composto de 33 nucleotídeos complementares à região 3'-terminal do gene EGFP, com a qual ocorrerá pareamento durante a reação, e 39 nucleotídeos complementares à região 5'-terminal da porção H1 da HA Den4. O RG 396 (+) possui 33 nucleotídeos complementares à região 3'-terminal do gene EGFP e 39 nucleotídeos complementares à região 5'-terminal da porção H1 da HA Den4, com a qual ocorrerá pareamento durante a reação. Por sua vez, o RG 380 (-) possui a região complementar a 18 nucleotídeos do 3'-terminal da região HA Den4 e aos 27 nucleotídeos da região 5'-terminal do gene NS1 de FA.

Os fragmentos iniciais para a Construção II foram obtidos com o par de oligonucleotídeos RG 328 (+) e RG 399 (-) (Tabela 3.3), para o fragmento EGFP, e com o par RG 398 (+) e RG 380 (-) (Tabela 4.3), para o fragmento HA Den4, gerando produtos de 782 pb e 251 pb, respectivamente. O RG 399 (-) possui uma porção de 27 nucleotídeos complementar à porção 3'-terminal do gene da EGFP, com a qual ocorrerá pareamento durante a PCR, e uma porção de 27 nucleotídeos complementar ao 5'-terminal da porção H2 da HA Den4. O RG 398 (+) possui uma porção de 27 nucleotídeos complementar à porção 3'-terminal do gene da EGFP e uma porção de 27 nucleotídeos complementar ao 5'-terminal da porção H2 da HA Den4, com a qual ocorrerá pareamento durante a PCR.

Todos os fragmentos iniciais foram purificados por algum dos métodos de purificação de DNA descritos anteriormente, de acordo com a conveniência, antes de serem utilizados nas etapas de PCR seguintes.

3.8.3 Construção dos cassetes de expressão EGFP (PCR de “Fusão”)

Para a realização das PCRs de construção do cassete de expressão EGFP com a enzima *Platinum Taq DNA Polimerase High Fidelity* (Invitrogen) foram utilizados os fragmentos iniciais EGFP e HA Den4 nas proporções 150 ng de EGFP : 20 ng de HA Den4, para a fusão da Construção I, e 17,5 ng de HA Den4 : 52,5 ng de EGFP para a fusão da Construção II. As reações foram realizadas em volume final de 50 µL utilizando: dNTP (0,2 mM cada/Promega), MgSO₄ (1 mM), oligonucleotídeo (20 pmol) e 1U de enzima, nas

condições fornecidas pelo fabricante. As reações foram submetidas a um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos e, posteriormente, 30 ciclos de incubação a 94°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos, 68°C por 1 minuto. Adicionalmente foi realizada uma extensão final a 68°C por 5 minutos. Esta ciclagem foi realizada em Termociclador da marca Applied Biosystems (PCR System 9700, Gene Amp).

As reações com *Platinum Pfx DNA Polimerase* (Invitrogen) foram realizadas utilizando os fragmentos iniciais EGFP e HA Den4 nas proporções 20 ng de HA Den4 : 100 ng de EGFP, na reação de fusão para a Construção I, e 21 ng de HA Den4 : 160 ng de EGFP para a Construção II. As reações foram realizadas em volume final de 50 µL utilizando: dNTP (0,3 mM cada/Promega), MgSO₄ (1 mM), oligonucleotídeo (20 pmol), 1U de enzima e *PCR_x Enhancer Solution* (1x), nas condições fornecidas pelo fabricante. As reações foram submetidas a um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos e, posteriormente, 30 ciclos de incubação a 94°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos, 68°C por 1 minuto. Adicionalmente, foi realizada uma extensão final a 68°C por 5 minutos. Esta ciclagem foi realizada em Termociclador da marca Eppendorf (Mastercycle ep) e os oligonucleotídeos utilizados para ambas as Construções foram RG 328 (+) e RG 380 (-) (Tabela 3.3).

Os fragmentos contendo as plataformas de expressão foram purificados por algum método de purificação de DNA, de acordo com a conveniência, antes de serem utilizados nas etapas de clonagem molecular.

3.9. Clonagem molecular das plataformas de expressão de EGFP

3.9.1. Clonagem no plasmídeo *PCR-Blunt II-TOPO* (Invitrogen)

A reação de ligação dos produtos de PCR de “Fusão” no vetor *PCR-Blunt II-TOPO* (Invitrogen) (Figura 3.1) foi realizada em volume final de 6 µL por meio de incubação de 2 µL de produto de PCR, previamente purificado por algum método de purificação de ácidos nucléicos, com 1 µL do vetor, nas condições fornecidas pelo fabricante, por 5 minutos à temperatura ambiente

(http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/zerobluntopo_man.pdf). Após o período de incubação, o tubo de reação foi imediatamente acondicionado em gelo até a etapa de transformação em bactérias (Secção 3.9.4). As preparações plasmidiais de culturas bacterianas foram realizadas (Secção 3.5.1) e pré-visualizadas em gel de agarose 0,8%. Amostras com perfil de migração mais alto eram indicativas da presença de inserto e foram selecionadas. Para confirmação, estas amostras foram submetidas a reações com as enzimas de restrição

Turbo Nar I ou *EcoR I* (Promega) utilizando-se 3U de enzima e aproximadamente 100 – 300 ng de DNA, nas condições estabelecidas pelo fabricante para um volume final de 10 µL. As reações foram submetidas à incubação a 37°C por 1 hora e posteriormente visualizadas em gel de agarose 0,8%.

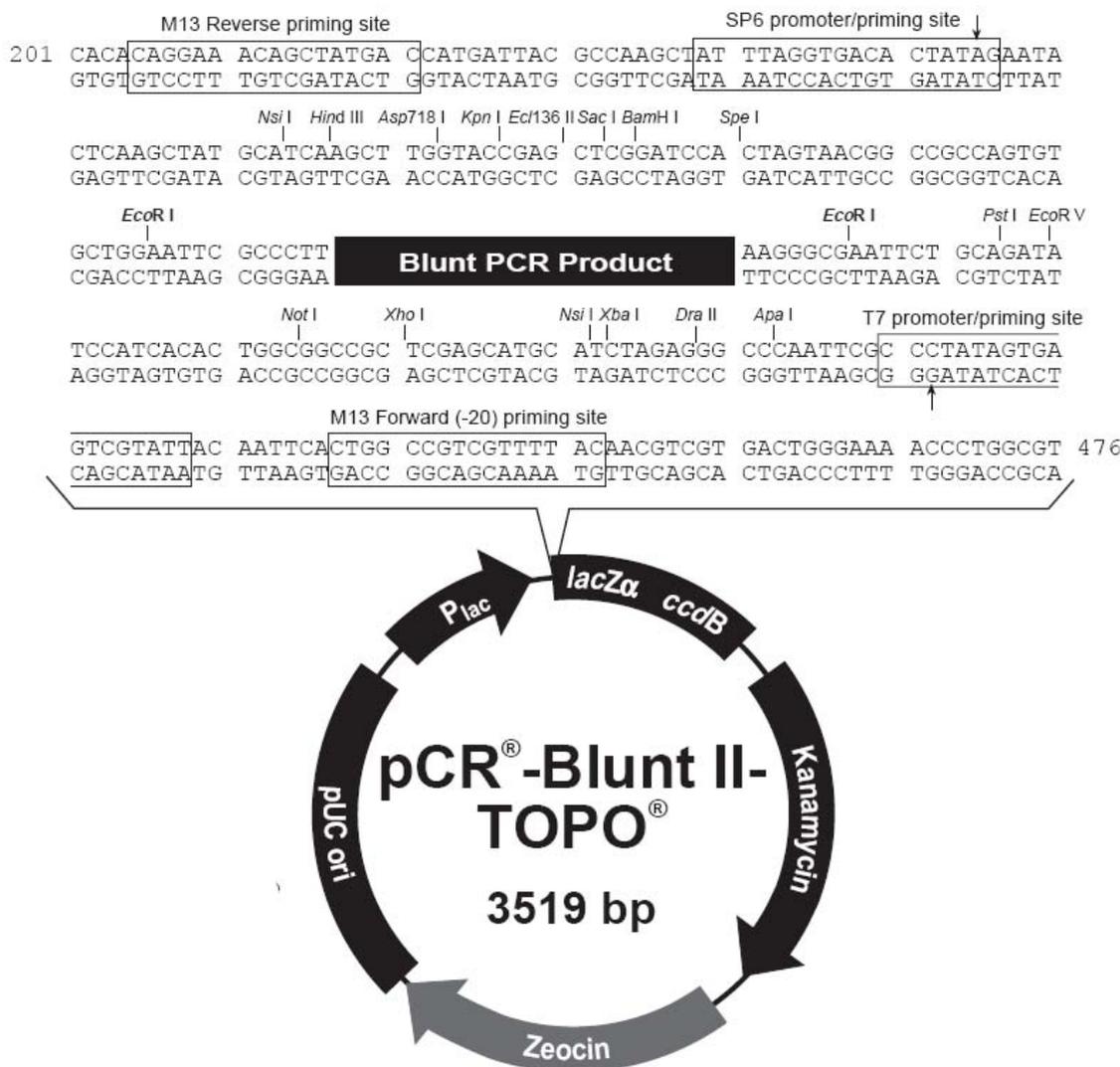


Figura 3.1: Mapa do plasmídeo PCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen) do kit Zero Blunt TOPO. No mapa estão indicados os diferentes sítios de restrição, os genes de resistência a antibióticos (Zeomicina e Kanamicina) e o sítio de clonagem de produtos de PCR (“Blunt PCR Product”). Fonte: InvitrogenTM (2006 - http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/zeroblunttopo_man.pdf).

3.9.2. Clonagem no plasmídeo *pGEM-T Easy* (Promega)

A reação de ligação dos produtos de PCR das plataformas de inserção no vetor *pGem-T Easy* necessita de adenilação destes produtos. Para a reação de adenilação, foram utilizados no mínimo 150 ng de fragmento de PCR, dATP (0,2 mM), 5U da enzima *Go Taq* (Promega), nas condições fornecidas pelo fabricante em volume final de 10 µL e em uma incubação a 70°C por 30 minutos. Após esta reação, o fragmento adenilado foi incubado a 4°C durante a noite com o vetor *pGEM-T Easy* (Figura 3.2) numa proporção 3 moléculas de inserto:1 molécula de vetor, em uma reação de ligação utilizando-se 1 U da enzima *T4 DNA Ligase* (Invitrogen), nas condições fornecidas pelo fabricante em volume final de 6 µl. Os produtos de ligação foram posteriormente utilizados na transformação de bactérias (Secção 3.9.4) e as preparações plasmidiais de culturas bacterianas foram realizadas (Secção 3.5.1) e pré-visualizadas em gel de agarose 0,8%. Amostras com perfil de migração em gel mais alto que o controle (preparações plasmidiais de culturas bacterianas transformadas com o vetor sem os insertos) eram indicativas de positividade (presença de inserto). Estas amostras foram selecionadas e submetidas a reações com as enzimas de restrição *Turbo Nar I* ou *EcoR I* (Promega) utilizando-se 3U de enzima e aproximadamente 100 – 300 ng de DNA, nas condições estabelecidas pelo fabricante para um volume final de 10 µL. As reações foram submetidas à incubação a 37°C por 1 hora e posteriormente visualizadas em gel de agarose 0,8%.

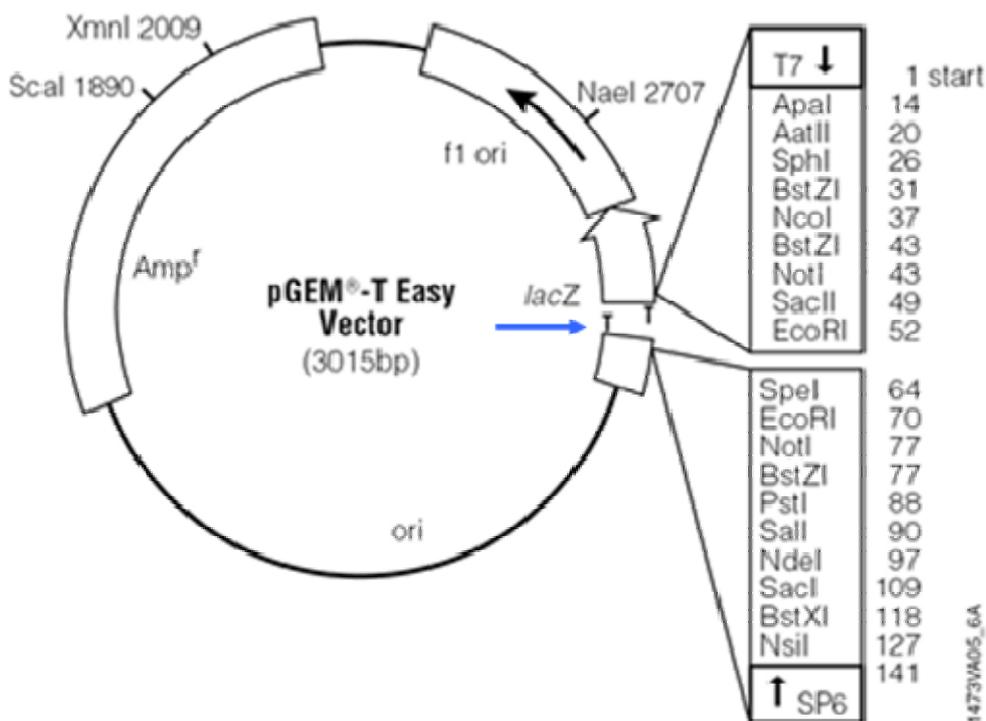


Figura 3.2: Mapa do plasmídeo pGEM-T Easy (Promega). No mapa, estão indicados o sítio de clonagem (seta azul), o gene de resistência a antibiótico (Ampicilina) e o sítio de restrição *EcoR I*.

3.9.3. Clonagem no plasmídeo pT3

As reações de clonagem dos fragmentos Construção I e II - obtidos após clonagem destes fragmentos, respectivamente, nos plasmídeos *PCR-Blunt II-TOPO* (Invitrogen) e *pGEM-T Easy* (Promega) - no plasmídeo pT3 (Figura 3.3), corresponde a primeira etapa de montagem dos clones infecciosos FA recombinantes. Para isto, os plasmídeos contendo os fragmentos e o pT3 foram previamente digeridos com a enzima de restrição *Turbo Nar I* (Promega) utilizando-se 5U de enzima para cada 1,5 µg de DNA, em uma incubação a 37°C por 2 h, nas condições fornecidas pelo fabricante em volume final de 100 µL.

Os insertos liberados pela digestão foram purificados por meio do *Kit QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN, Inc) e precipitados com acetato de amônio e etanol na presença de glicogênio (seção 3.5.4). O plasmídeo pT3 foi da mesma forma precipitado e, posteriormente, submetido à incubação a 65°C por 15 minutos para inativação da enzima *Turbo Nar I*. Além disso, o pT3 foi submetido à reação de defosforilação com 2U da enzima *SAP* - Fosfatase Alcalina de Camarão (Promega) a 37°C por 15 minutos, nas condições fornecidas pelo fabricante em volume final de 30 µL, e com posterior inativação da enzima a 65°C por 15 minutos.

As reações de ligação dos fragmentos das Construções I e II no pT3 foram realizadas em volume final de 15 μ L nas proporções 5 ou 10 moléculas de inserto : 1 molécula de vetor com a enzima *T4 DNA Ligase* (Invitrogen), em uma incubação a 4°C durante a noite e nas condições fornecidas pelo fabricante. Os produtos de ligação foram posteriormente utilizados na transformação de bactérias (Secção 3.9.4) e, a partir das colônias selecionadas, estas foram utilizadas para extração de DNA plasmidial (Secção 3.5.1). A análise dos clones foi realizada após reações utilizando 3U da enzima restrição *Pst I* (Promega) e aproximadamente 100 – 300 ng de DNA, nas condições estabelecidas pelo fabricante para um volume final de 10 μ L. As reações foram submetidas à incubação a 37°C por 1 hora e posteriormente visualizadas em gel de agarose 0,8%. Os clones bacterianos positivos foram identificados e cultivados (Secção 3.9.5) para a obtenção de DNA plasmidial em grande escala (Secção 3.5.1) para sua utilização na etapa de montagem do molde de cDNA.

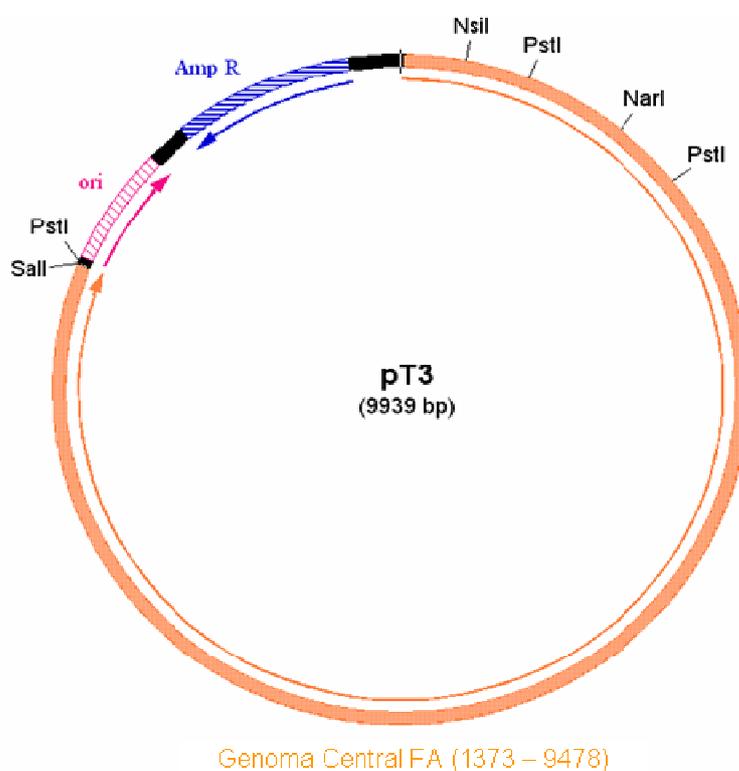


Figura 3.3: Mapa do plasmídeo pT3. O plasmídeo pT3 contém o genoma central do vírus FA (laranja). No mapa, estão indicados o gene de resistência a antibiótico (Ampicilina – Amp R), a origem de replicação do plasmídeo (ori) e os sítios das endonucleases *Nar I*, *Nsi I*, *Sal I* e *Pst I*.

3.9.4. Transformações em bactérias *E. coli*

Bactérias *E. coli* MC1061 quimiocompetentes foram transformadas com os plasmídeos *PCR-Blunt II-TOPO* ou *pGEM-T Easy*. Para isto, 2 μ L de cada um dos plasmídeos foram adicionados a 60 μ L de bactérias competentes. Esta suspensão foi incubada

por 30 minutos em gelo e, posteriormente, submetida a uma incubação a 42°C por 42 segundos, a fim de provocar a abertura de poros na membrana das bactérias e permitir a entrada dos plasmídeos. Em seguida, a suspensão de bactérias foi submetida a choque térmico em gelo, o que provoca o fechamento dos poros, e incubadas com 450 µL de meio SOC (Invitrogen) a 37°C sob agitação (200 rpm). Após uma hora de incubação, 100 µL deste inóculo foi plaqueado em meio LB ágar com 50 µg/mL de Kanamicina (Sigma) ou 50 µg/mL de Ampicilina (Sigma) e as placas foram incubadas em estufa a 37°C durante a noite. Após este período de incubação, colônias de bactérias foram selecionadas das placas e incubadas com 5 mL de meio LB líquido com 50 µg/mL de Kanamicina ou 25 µg/mL de Ampicilina em estufa a 37°C sob agitação (200 rpm – Environ-Shaker, LAB-Line) durante a noite.

Além dessa, também foi utilizada a bactéria *E. coli* DH5α provida pelo kit *PCR-Blunt II-TOPO* para transformação com o plasmídeo *PCR-Blunt II-TOPO* segundo o protocolo descrito pelo manual do fabricante

(http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/zeroblunttopo_man.pdf).

E. coli SURE (*Stop Unwanted Rearrangement Events*) eletrocompetentes foram transformadas com 2 µL do plasmídeo *pGEM-T* ou pT3 em 60 µL de bactérias, por meio de eletroporação com o sistema Gene Pulser XCell Total System (Biorad). Em seguida, as suspensões foram incubadas com 450 µL de meio SOC a 37°C por 1 hora sob agitação (200 rpm). Após este período, 100 µL deste inóculo foram plaqueados em meio LB ágar com 25 µg/mL de Ampicilina e incubadas a 37°C durante a noite. No dia seguinte, colônias de bactérias foram isoladas das placas de Petri e incubadas em 5 mL de meio LB líquido com 25 µg/mL de Ampicilina a 37°C durante a noite sob agitação (200 rpm). Como controle positivo das transformações foi utilizado o plasmídeo comercial pUC-19 (Invitrogen).

As culturas de bactérias preparadas a partir de colônias selecionadas foram processadas para extração de DNA plasmidial (Secção 3.5.1).

3.9.5. Preparo de estoque bacteriano

Possíveis clones positivos de transformação identificados nas diferentes etapas de clonagem deste trabalho tinham suas respectivas culturas de bactérias estocadas adicionando-se 200 µL de cultura de bactérias em 800 µL de glicerol 80% e armazenadas a -20°C. Sempre que necessário, estes estoques foram novamente cultivados utilizando-se 15 µL de estoque de glicerol em 5 mL de meio LB seletivo, sob agitação de 200 rpm (Environ-Shaker, LAB-Line), durante a noite a 37°C .

3.10. Montagem dos moldes de DNA que darão origem aos genomas virais

Para montagem dos cDNAs virais, os plasmídeos pT3 (com e sem os insertos Construção I e II) e pG1/2 (Figura 4.4) foram quantificados em gel de agarose e posteriormente digeridos com as endonucleases *Nsi I* e *Sal I* (Promega), em reações utilizando 30U de cada enzima para cada 1,5 µg de DNA plasmidial nas condições fornecidas pelo fabricante em volume final de 200 µL, em incubação a 37°C por 2 horas. Estas amostras foram purificadas por *QIaquick PCR Purification* e, posteriormente, utilizadas em reações de ligação em volume final de 30 µL utilizando: 300 ng dos plasmídeos pT3, 200 ng do plasmídeo pG1/2 e 1U da enzima *T4 DNA Ligase* (Invitrogen) em uma incubação a 4°C durante a noite, nas condições fornecidas pelo fabricante.

Após o período de incubação, foi realizada a inativação da ligase por 20 minutos a 65°C e as amostras foram linearizadas em uma reação de digestão com a enzima *XhoI* (Promega). Nesta reação utilizou-se todo o volume restante da reação de ligação pG1/2/T3 após a inativação, que foi incubado com 1U desta enzima a 37°C por 3 horas, nas condições fornecidas pelo fabricante em volume final de 90 µL. Os produtos resultantes foram precipitados com acetato de amônio e etanol sem glicogênio (Secção 3.5.4) e, então, foram utilizados na próxima etapa experimental para a transcrição em RNAs virais.

A montagem do molde pG1/2-T3 sem inserto, também foi realizada para a produção do vírus parental não recombinante que foi utilizado como referência em várias etapas deste trabalho.

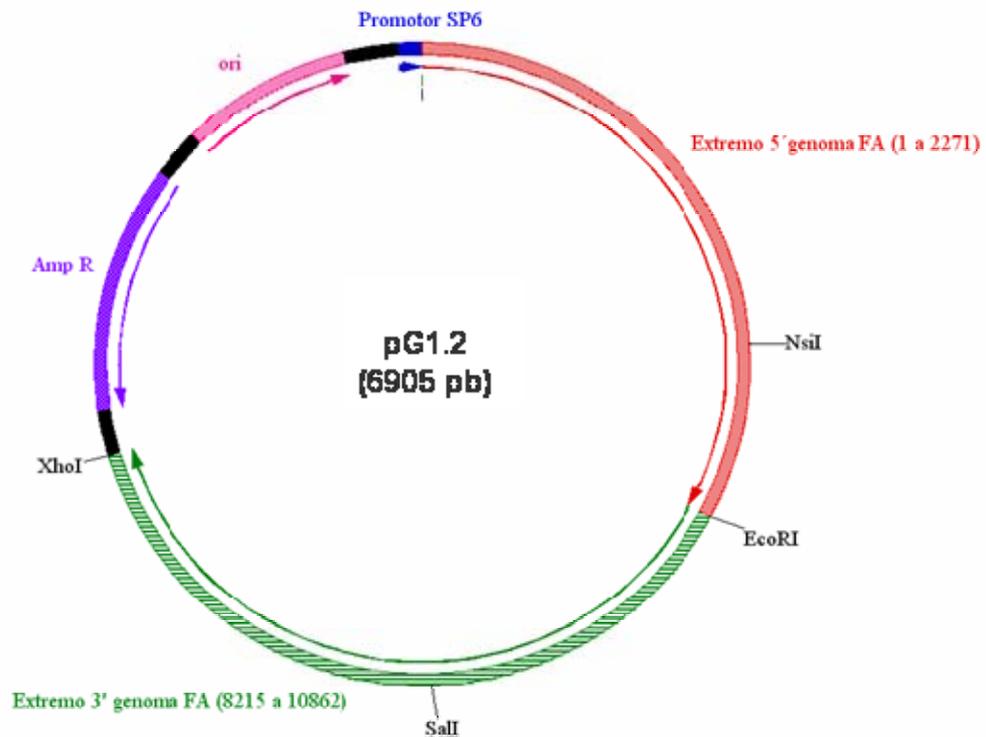


Figura 3.4: Mapa do plasmídeo pG1/2. O plasmídeo pG1/2 contém as regiões 5' e 3'-terminal do genoma central do vírus FA (vermelho e verde, respectivamente). No mapa estão indicados os sítios das endonucleases *EcoRI*, *NsiI*, *SalI* e *XhoI*, o gene de resistência a antibiótico (Ampicilina – Amp R), a origem de replicação do plasmídeo (*ori*) e o gene promotor para a polimerase SP6.

3.11. Transcrição *in vitro* dos moldes de DNA que darão origem aos genomas virais FA 17D

Devido à presença do promotor SP6 nas seqüências dos moldes de cDNA dos vírus FA 17D, foi possível a obtenção de RNAs infecciosos a partir de uma reação de transcrição utilizando-se o sistema “AmpliScrib SP6 High Yield Transcription Kit” (Epicentre Technologies) em condições de esterilidade e livres de nucleases. Nesta reação foram utilizados 1U da enzima SP6 polimerase, 20U da enzima RNAsin, Cap (3mM), rNTPs 7,5 mM (cada, exceto GTP utilizado a 0,75 mM), nas condições descritas pelo fabricante para volume final de 11 µL, em uma incubação a 37°C por 2 horas. Os transcritos gerados possuíam extremidades Cap 5' e foram imediatamente estocados a -70°C até o momento de uso. O material transcrito foi visualizado em gel de agarose 1%. Todo o processo foi realizado em condições de esterilidade com material tratado, livre de nucleases.

3.12. Transfecção dos RNAs virais

O método utilizado para a transfecção dos RNAs virais foi o emprego do lipídeo catiônico LipofectAmine (LA) (Gibco-BRL) em concentração final de 20 µg/mL em tampão Opti-MEM I (Reduced Serum Medium Modification of MEM - Gibco). Utilizamos aproximadamente 1µg de RNA complexando-o ao LA em 1 mL de meio Opti-MEM I 1X durante uma incubação de 10 minutos em gelo. O complexo RNA-LA em tampão foi posteriormente adicionado sobre monocamada de células Vero (densidade de 30.000 células/cm² em garrafas de 25cm² com tampa com filtro) previamente lavadas duas vezes com tampão PBS-DEPC. Foi realizado um controle negativo adicionando-se apenas meio Opti-MEM I e Lipofectamina (Mock). Para favorecer a infecção das células, foi realizada uma incubação em temperatura ambiente agitando as garrafas, a cada 2-5 minutos por 20 minutos, quando então, o excesso de inóculo foi retirado e as garrafas foram lavadas uma vez com 5 mL de PBS-DEPC. Para cultivo e obtenção dos vírus, foram adicionados 12 mL de meio de cultura completo Earle 199 10X com 5% de NaHCO₃ (sistema aberto) e as células foram incubadas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. As garrafas foram monitoradas diariamente em microscópio invertido até o aparecimento de CPE moderado. Com o aparecimento de CPE, quando o sobrenadante de transfecção (1P) foi recolhido na presença de 8% de sorbitol e imediatamente estocado a - 70°C. Uma alíquota de sobrenadante de transfecção (1P) de cada vírus recombinante foi submetida à extração de RNA pelo método do *Trizol LS* (Secção 3.5.5) e os RNAs empregados em reações de RT-PCR utilizando as enzimas *M-MLV RT* e *Taq Polimerase* para verificar a presença das inserções (Secção 3.14.4). O DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8% e as seqüências analisadas por meio de sequenciamento nucleotídico utilizando os oligonucleotídeos RG 355 (+), RG 358 (+), RG 359 (-), RG 174 (+), RG 175 (+) e RG 19(-) (Tabela 3.2).

3.13. Produção do estoque viral (2P)

Os estoques virais de segunda passagem (2P) foram obtidos do sobrenadante de cultura de células Vero infectadas com o sobrenadante da cultura da transfecção (1P). Estes estoques foram obtidos a partir da infecção de monocamadas de células Vero (62.500 células/cm² em garrafa de 175 cm²) com 2 - 5 mL do sobrenadante 1P de cada um dos vírus FA 17D, em uma incubação a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e utilizando-se

meio de cultura completo Earle 199 com 2,5% de NaHCO₃ (sistema fechado). Estas infecções foram realizadas utilizando-se garrafas de 175 cm² com densidade de 62.500 células/cm² que foram observadas com microscópio invertido até o aparecimento de CPE moderado, quando então, o sobrenadante das culturas foi coletado na presença de 8% de sorbitol e estocado a -70°C. Os estoques 2P foram obtidos e aliqotados em quantidades suficientes para a realização de todas as etapas de caracterização viral que geraram este trabalho. Uma alíquota de sobrenadante de transfecção (1P) de cada vírus recombinante foi submetida à extração de RNA pelo método do *Trizol LS* (Invitrogen) e os RNAs foram utilizados em reações de RT-PCR (Secção 3.14.4) utilizando as enzimas *M-MLV RT* (Promega) e *Taq DNA Polimerase* (Promega) para verificação da presença das inserções. O DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8% para verificação da integridade das seqüências por meio de sequenciamento nucleotídico utilizando os oligonucleotídeos RG 355 (+), RG 358 (+), RG 359 (-), RG 174 (+), RG 175 (+) e RG 19(-) (Tabela 3.2).

3.14. Caracterização viral

3.14.1. Titulação viral por contagem de placas de lise

A titulação das amostras virais obtidas em diferentes etapas deste trabalho foi realizada infectando-se monocamada de células Vero em densidade de 50.000 células/cm² em placas de 24 cavidades (2 cm²/ cavidade). No momento da infecção, o meio de cultura de cada cavidade foi retirado por aspiração por bomba de vácuo e sobre a monocamada foram depositados, em duplicata, 100 µL das suspensões virais previamente preparadas com meio de cultura Earle 199 10x completo, obtidas por diluições seriadas 10⁻¹ até 10⁻⁶. Para adsorção dos vírus às células, as placas foram incubadas a 37°C por 1 hora em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e agitadas gentilmente em intervalos de 10 - 15 minutos de forma a garantir uma adsorção homogênea. Após o período de incubação, o excesso de inóculo foi igualmente aspirado e cada cavidade recebeu 1 mL de CMC 3.5 % em meio completo Earle 199 10x com 5% de NaHCO₃ (sistema aberto), seguindo-se de incubação por 10 dias à 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Decorridos os 10 dias de incubação, a monocamada de células foi fixada com formaldeído 10 % por, no mínimo, 1 hora, lavadas e incubadas com uma solução de cristal violeta a 0.4 % para a observação e contagem das placas de lise (De Madrid e Porterfield, 1969).

O cálculo do título viral foi determinado mediante a utilização da seguinte fórmula:

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

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

$\log_{10} M$ é o logaritmo na base 10 da média do número de placas de lise contadas numa determinada diluição;

$\log_{10} ID$ é o logaritmo na base 10 do inverso da diluição onde as placas de lise foram contadas.

$\log_{10} FC$ é o fator de correção em \log_{10} do inóculo para mL, ou seja, é o logaritmo na base 10 da fração de 1 mL inoculada. Como o inóculo corresponde a 100 μ L, que é a décima parte ($1000/10=100$) de 1 mL, $FC=1$ ($\log 10=1$).

O título dos estoques virais produzidos foi obtido pela média de 3 ensaios de titulação realizados independentemente.

3.14.2. Cinética de Replicação viral

Para a determinação da Cinética de Replicação Viral, foram realizados três experimentos independentes por meio da infecção de monocamadas de células Vero (densidade de 62.500 células/cm² em frascos de 25 cm²) a uma M.O.I de 0,02 de vírus, em uma incubação de 1 hora a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após o período de adsorção dos vírus, foram adicionados 11 mL de meio Earle 199 completo com 5 % de NaHCO₃ e as células voltaram a ser incubadas em estufa. Alíquotas de sobrenadante das culturas foram coletadas em intervalos de 24 horas até o tempo de 144 horas pós infecção e imediatamente estocadas a -70°C, até serem submetidas à titulação por contagem de placas de lise (Secção 4.14.1). Os resultados foram expressos pela média aritmética e desvio padrão dos títulos virais dos três experimentos independentes realizados, utilizando o programa Excel (Microsoft, 2003). A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste *ANOVA one-way, post test* Tukey ou comparação múltipla de Bonferroni com $P<0,05$, com o auxílio do programa *GraphPadPrism3.02* (GraphPad, Inc).

3.14.3. Estabilidade genética

Para a avaliação da estabilidade genética, os vírus recombinantes foram submetidos a sucessivas passagens seriadas a partir do estoque viral 2P. Para isso, monocamadas de células Vero (densidade de 62.500 células/cm² em frascos de 25 cm²) foram infectadas com M.O.I de 0,02 de vírus em duas séries de passagens consecutivas independentes. Os sobrenadantes dessas culturas foram coletados após 72 horas, aliqüotados e imediatamente estocados a -70°C

até o momento de uso. O sobrenadante viral de cada passagem foi submetido à titulação por contagem de placas de lise (Secção 3.14.1) a fim do acompanhamento das variações de MOI. Como cada passagem era realizada antes de conhecer o título viral da passagem anterior, a cada 5 passagens, estas foram interrompidas para a obtenção dos resultados de titulação viral. A passagem que apresentou uma variação muito grande em relação a MOI 0,02, teve seu valor de MOI corrigido e, a partir desta correção, foram realizadas as passagens seguintes.

Para avaliação da estabilidade genética dos vírus recombinantes, o RNA viral foi extraído de alíquotas do sobrenadante dessas passagens, realizadas em duas séries independentes, e submetido a reações de RT-PCR (Secção 3.14.4) e sequenciamento (Secção 3.6). Foi possível verificar a presença das inserções heterólogas e sua integridade nucleotídica. Além disso, a estabilidade genética também foi avaliada por citometria de fluxo (Secção 3.14.5).

3.14.4 Reações de transcrição reversa e reações em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Amostras de RNA virais extraídas de culturas celulares foram submetidas a reações de RT-PCR utilizando as enzimas *M-MLV RT* (Promega) ou o sistema *ThermoScript RT-PCR System* (Invitrogen), na geração de cDNA, e a reações de PCR utilizando *Taq DNA Polimerase* (Promega) ou a enzima *GoTaq* (Promega).

Nas reações utilizando a enzima *M-MLV RT* (Promega) para geração do cDNA, 2 µL de RNA foi pré-incubado com 20 pmol do oligonucleotídeo RG 19 (-) - que anela no gene da NS1 (Tabela 3.2) - por 90°C por 2 min. Posteriormente, este foi adicionado a dNTP (0,8 mM cada), MgCl₂ (1 mM), 40U da enzima *Recombinant RNAsin Ribonuclease Inhibitor* e 200U da enzima *M-MLV RT*, nas condições fornecidas pelo fabricante em volume final de 20 µL e, submetido a 1 ciclo de 42°C por 60 min e 99°C por 5 min. Para a etapa de PCR, foram adicionados 7,5 µL de cDNA a MgCl₂ (1 mM), 20 pmol de oligonucleotídeo RG 174 (+) – que anela no gene da E (Tabela 3.2) - e 1,25 U de enzima *Taq DNA Polimerase* (Promega), nas condições fornecidas pelo fabricante em volume final de 50 µL. As reações foram submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C por 2 min e 25 ciclos a 94°C por 15 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 1 min. Foi realizada a extensão final a 72°C por 5 min.

O sistema *ThermoScript RT-PCR System* (Invitrogen) consiste de duas fases de reação, na primeira foram utilizados 3,0 µL de RNA, dNTP (0,4 mM), oligonucleotídeo RG 19 (-) (Tabela 4.2) (20 pmol), nas condições estabelecidas pelo fabricante para um volume final de 12,0 µL e a reação foi incubada a 65°C por 5 min para pareamento deste com a

seqüência de RNA. Na segunda fase, foi utilizado todo o volume de reação da primeira fase, 40U da enzima *RNAseOUT* e 15U da enzima *ThermoScript RT*, nas condições estabelecidas pelo fabricante para um volume final de 20,0 µL e submetida a 1 ciclagem a 55°C por 60 min e 85°C por 5 min. Após esta ciclagem, foram adicionados 2U de *E. coli RNAse H* na reação, que foi então incubada a 37°C por 20 min. Para a etapa de PCR foram utilizados 2,0 µL da reação de RT, dNTP (0,4 mM), MgCl₂ (2mM), oligonucleotídeos RG 19 (-) e RG 174 (+) (Tabela 3.2) (20 pmol) e 2,5U da enzima *GoTaq* (Promega), nas condições estabelecidas pelo fabricante para um volume final de 50,0 µL. A reação foi submetida a uma incubação inicial a 95°C por 2 min e 30 ciclos a 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 68°C por 2 min. Posteriormente, foi realizada uma extensão final a 72°C por 5 min.

Os produtos de reação de RT-PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8%. Os resultados dos pesos dos fragmentos obtidos foram estimados por comparação aos padrões de peso molecular utilizando o programa AlphaDigDoc 1000 v3.2 Beta, AlphaEaseFC; Alpha Inotech Corporation.

3.14.5. Citometria de fluxo

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada para caracterização da cinética de expressão da EGFP e avaliação da estabilidade genética dos vírus recombinantes.

Para o ensaio de cinética de expressão da EGFP, monocamadas de células Vero foram cultivadas (62000 células/cm²) em placas de seis cavidades e, após 24 horas foram infectadas com suspensões de 200 µL dos vírus em 2P (estoque viral), em uma MOI 0,02. Para esta infecção, as placas com as células foram incubadas por 1 hora em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, agitadas em intervalos de 10 - 15 minutos para uma adsorção viral mais homogênea. Após o período de incubação, cada cavidade das placas recebeu 3 mL de meio Earle 199 completo com 5% de NaHCO₃ (sistema aberto) e as placas foram incubadas novamente em estufa a 37°C. Como controle foram utilizadas células infectadas com o vírus FA 17D/G1/2/T3 e células não infectadas (Mock). Após 24 h, 48 h ou 72 h de infecção, as células foram lavadas com solução de verseno e, posteriormente, incubadas com solução de verseno/tripsina em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 30 segundos, de forma a soltarem do fundo das cavidades das placas. Após esta incubação, a solução de verseno/tripsina foi cuidadosamente retirada e sobre a monocamada celular foi adicionado 0,5 mL de meio completo Earle 199, com o qual as células foram ressuspensas, homogenizadas para desfazer os grumos celulares e coletadas em tubos de 1,5 mL. As células foram contadas com auxílio de Câmara de Neubauer e aliqüotadas em novos tubos em volumes que

continham aproximadamente 10^6 células/tubo e, posteriormente, centrifugadas a 1400 rpm por 7 minutos. Após esta centrifugação, os sobrenadantes foram retirados e o pellet de células foi ressuspensão e fixado em solução de paraformaldeído 2%. Os tubos devidamente identificados foram estocados em geladeira até o momento da marcação intracelular dos antígenos virais, por no máximo 2 dias.

Para o experimento de avaliação da estabilidade genética, monocamadas de células Vero foram infectadas com os vírus recombinantes em sua passagem 2P (estoque viral) e suas passagens seriadas independentes 5P1 e 5P2, 10P1 e 10P2, 15P1 e 15P2 e 20P1 e 20P2 em MOI 0,02. Após 72 h de infecção, as células foram processadas segundo o descrito acima para avaliação da presença da proteína EGFP. Como controles, utilizamos células Vero infectadas com o vírus FA 17D/G 1/2/T3 e células não infectadas (Mock).

Para a marcação intracelular dos antígenos virais em ambos os experimentos, foram utilizados anticorpos primários policlonais α -Febre Amarela (α -FA) (soro hiperimune de camundongo – ATCC, Bethesda, MA, EUA) e anticorpos secundários α -camundongo conjugado a Ficoeritrina (Dako, Glostrup, Dinamarca). Primeiramente, foram adicionados 0,5 mL de PBS/BSA/saponina 0,15% às células previamente fixadas com paraformaldeído sendo incubadas por 15 minutos e centrifugadas a 1400 rpm por 7 minutos. Após centrifugação, os sobrenadantes foram retirados e os precipitados de células foram incubados com 20 μ L de anticorpo α -FA diluído 1:80 em PBS/BSA/saponina 15% por 1h em gelo (4°C). Após incubação, foi adicionado 1 mL PBS/BSA/saponina 0,15% com posterior centrifugação a 1400 rpm (0,2 rcf) por 7 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado, foi adicionado 20 μ L de anticorpo α -camundongo conjugado a Ficoeritrina (PE) diluído 1:40 em PBS/BSA/saponina 0,15% e as células submetidas a incubação a 4°C por 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de PBS/BSA/saponina 15% às células, que foram centrifugadas a 1400 rpm (0,2 rcf) por 7 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e o pellet de células ressuspensão em 0,3 mL de paraformaldeído 2% e armazenado a 4°C até a aquisição das células no citômetro, em no máximo 2 dias. Foram adquiridos 10000 eventos de cada amostra no citrômetro de fluxo (FACS Calibur - BenctonDickinson, Califórnia, EUA) e os dados foram analisados utilizando o programa Summit v4.3 Build 2445 (Dako, Colorado, EUA). A marcação com PE foi detectada pela emissão de fluorescência no comprimento de onda 630 - 780 nm (vermelho) e a detecção da fluorescência de EGFP, no comprimento de onda 490 - 565 nm (verde).

A cinética da infecção viral e a estabilidade genética foram avaliadas calculando-se a porcentagem de células duplo-marcadas (FA^+EGFP^+) na população de células FA^+ , as

infectadas [somatória da porcentagem de células duplo-marcadas (FA⁺EGFP⁺) e simples-marcadas (FA⁺)], representando a porcentagem de células infectadas ao longo do tempo e a manutenção ou perda da inserção heteróloga, respectivamente.

$$\% \text{ Expressão Estável} = \frac{\% \text{ Células FA}^+ \text{EGFP}^+}{\% \text{ Células (FA}^+ \text{EGFP}^+) + (\text{FA}^+)} \times 100$$

3.14.6. Microscopia de fluorescência

A técnica de microscopia de fluorescência foi utilizada para a avaliação da cinética de expressão de EGFP e localização celular do vírus. Para ambos os experimentos, monocamadas de células Vero foram cultivadas em câmaras de oito cavidades (Lab-Tek Chamber Slides – Nunc) na densidade de 20000 células/cavidade em meio completo Earle 199 com 5% de NaHCO₃. Após 24 horas, o meio foi retirado e as células incubadas com suspensões de 100 µL dos vírus recombinantes a uma MOI de 0,1 por 1 hora em estufa com atmosfera de CO₂ 5% a 37°C. Como controle, foram utilizadas células infectadas com o vírus FA 17D/G1/2/T3. Após o período de incubação, foram adicionados a cada cavidade das câmaras 200 µL de meio completo Earle 199 com 5% de NaHCO₃ e estas foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C.

Para o experimento de cinética de expressão de EGFP, as câmaras foram incubadas por até 120 horas. Após os períodos de incubação de 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h o sobrenadante de meio foi retirado das células e estas foram lavadas com PBS (pH 7,4). O PBS foi retirado e as células foram fixadas com paraformaldeído 4% em tampão fosfato (0,1M, pH 7,2) por 10 minutos. As células foram lavadas com PBS (pH 7,4) e, posteriormente, as lâminas foram montadas com DAPI (Molecular Probes), seladas e estocadas a -20 °C.

Para avaliação de co-localização vírus/retículo endoplasmático (RE), as câmaras foram incubadas por 72 horas. Após este período, o meio foi igualmente retirado de sobre as células e estas foram lavadas 2 vezes com solução de HBSS (Molecular Probes). A solução de marcação do retículo endoplasmático (ER-Tracker Red: Molecular Probes) foi diluída 1:8000 em solução de HBSS e pré-aquecida a 37 °C por 10 minutos. As células foram incubadas com 100 µL desta solução por 30 minutos em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após o período de incubação, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 2 minutos a 37 °C e lavadas com solução de HBSS por 3 vezes. Após a retirada da solução, as lâminas foram montadas, seladas com esmalte e estocadas a -20 °C.

As lâminas foram observadas em microscópio confocal de fluorescência (*LSM 510 META, Zeiss*), da Plataforma multi-usuário de microscopia confocal – PDTIS-FIOCRUZ utilizando-se o programa LSM Image Browse 3.5.

3.15. Meios e soluções

Acetato de amônio 7,5 M

Acetato de amônio	28,87 g
Água tipo I q.s.p.	50 mL

Instruções: Estocar a 4°C.

Agarose 1%

Agarose (Tipo I-Sigma)	1 g
Água tipo I q.s.p.	100 mL

Instruções: Misturar, autoclavar (121°C por 20 min) e estocar a 4°C.

Na hora do uso aquecer em microondas e aguardar o uso em banho Maria a 42°C.

Bicarbonato de sódio 4,4% gaseificado (NaHCO₃)

NaHCO ₃	44 g
Vermelho de fenol 1%	1 mL
Água tipo I q.s.p.	1000 mL

Instruções: Adição de gelo seco com agitação até a solução atingir pH 7,0 – 7,2; aliquotar em 20 mL e esterilizar por autoclave 121°C 15 min.

Carboximetilcelulose (CMC) 3%

CMC	3 g
Água tipo I q.s.p.	100 mL

Instruções: homogeneização por agitação vigorosa (liquidificador); esterilização por autoclave (121°C por 20 min); armazenagem a temperatura ambiente.

Cloreto de Cálcio 100 mM

CaCl ₂	1,11 g
Água tipo I q.s.p.	100 mL

Instruções: Após o preparo autoclavar (121°C/20 min) e estocar a 4°C.

DEPC

Solução de tratamento de material contra RNase : 0,01% em água bidestilada.

Cristal Violeta**Solução Estoque (2%)**

Cristal Violeta	10 g
Metanol	100 mL
Água destilada q.s.p.	500mL

Solução de Uso (0,04%)

Cristal Violeta estoque	20 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Instruções: Preparar e estocar a temperatura ambiente.

Formaldeído 10%

Formaldeído 37%	1000 mL
Água destilada	2700 mL

Instruções: Preparar e estocar a temperatura ambiente.

Meio BHI (Brain Heart Infusion)

Meio BHI	37 g
Água tipo I q.s.p.	1000 mL

Instruções: Esterilizar por autoclavagem por 15 minutos a 121° C.

Meio LB (Luria-Bertani)

Bacto-triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	10 g
Água tipo I q.s.p.	1000 mL

Instruções: Homogeneizar e ajustar pH 7,5 com solução de NaOH 1N; esterilização por autoclave (121°C por 20 min); armazenar temperatura ambiente.

Obs.: Para meio LB sólido acrescentar 1,5g de agar bacteriológico para cada 100 mL de meio LB.

Meio 199 Earle 2X concentrado

Meio 199 com sais de Earle 10X	20 mL
NaHCO ₃ 4,4% (pH 7,0)	10 mL
SFB inativado	10 mL
Sulfato de gentamicina (4 mg/mL)	2 mL
Fungizona (500mg/mL)	0,2 mL
Água tipo I q.s.p.	100 mL

Instruções: Todo material estéril; preparo no momento do uso.

Meio 199 Earle / CMC

Meio 199 com sais de Earle 10X	10 mL
NaHCO ₃ 4,4% (pH 7,0)	5 mL
SFB inativado	5 mL
Sulfato de gentamicina (4 mg/mL)	1 mL
Fungizona (500mg/mL)	0,1 mL
CMC 3% (Sigma) q.s.p.	100 mL

Instruções: Todo material estéril; preparo no momento do uso.

Homogeneizar vigorosamente.

Meio 199 Earle completo

Meio 199 com sais de Earle 10X	10 mL
NaHCO ₃ 4,4% (pH 7,0)	2,5 mL ou 5 mL *
SFB inativado (Cutilab)	5 mL
Sulfato de gentamicina (4 mg/mL)	1 mL
Fungizona (500mg/mL)	0,1 mL
Água tipo I q.s.p.	100 mL

Instruções: Todo material estéril; preparo no momento do uso.

* Depende do tipo de sistema de cultura: 2,5 mL para sistema aberto (placas de cultura) ou sistema fechado (frascos de cultura).

Meio 199 Earle / Hepes

Meio 199 com sais de Earle 10X	10 mL
NaHCO ₃ 4,4% (pH 7,0)	0,5 mL
SFB inativado	5 mL
Sulfato de gentamicina (4 mg/mL)	1 mL
Fungizona (500mg/mL)	0,1 mL
Água tipo I q.s.p.	100 mL

Instruções: Todo material estéril; preparo no momento do uso.

Paraformaldeído 2%

Paraformaldeído	2,0 g
Água tipo I q.s.p.	50 mL
Tampão fosfato dibásico 2 mM	50 mL

Instruções: Aquecer a água tipo I até 70°C. Adicionar, aos poucos, o Paraformaldeído.

Clarificar a solução com 1 ou 2 gotas de NaOH 1N. Deixar esfriar e, em seguida, adicionar o tampão fosfato dibásico. Verificar o pH que deve estar entre 7,2-7,3.

Paraformaldeído 4%

Paraformaldeído	4,0 g
Água tipo I q.s.p.	50 mL
Tampão fosfato dibásico 2 mM	50 mL

Instruções: Aquecer a água tipo I até 70°C. Adicionar, aos poucos, o Paraformaldeído.

Clarificar a solução com 1 ou 2 gotas de NaOH 1N. Deixar esfriar e, em seguida, adicionar o tampão fosfato dibásico. Verificar o pH que deve estar entre 7,2-7,3.

PBS (salina tamponada com fosfato) – Livre de Rnase – Para transfeção

NaCl 5M	30 mL
Na ₂ HPO	32 mL
NaH ₂ PO	8 mL
Água tipo I q.s.p.	1000 mL

Instruções: Preparado com água tratada com DEPC (0,01%) e autoclavado (121°C por 20 min).

PBS/BSA 1%

BSA 1%	0,5 g
Azida Sódica	0,05 g
Saponina 0,15%	0,075 g

PBS 1X q.s.p.	500 mL
---------------	--------

PBS/BSA/Saponina 0,15%

BSA 1%	5,0 g
Azida Sódica	0,5 g
PBS 1X q.s.p.	500 mL

Soro Fetal Bovino (Cutilab)

Inativado a 56°C por 30 minutos. Aliquotado (50 mL) e armazenado à 4°C.

Sulfato de gentamicina (Garamicina)

1 ampola de Garamicina (2 mL) para 18 mL de água bidestilada estéril.

Sulfato de Magnésio (MgSO₄) 1M

MgSO ₄	12,03 g
Água tipo I q.s.p.	100 mL

Instruções : Filtrar em millipore 0,22 µm. Estocar a 4°C.

TAE (solução de estoque 50X)

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA 0,5M (pH 8,0)	100 mL
Água tipo I q.s.p.	1000 mL

Instruções: Estocar a TA.

Tampão PBS 10x pH7,4

NaCl	80,0 g
KCl	20,0 g
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O	14,4 g
Água tipo I q.s.p.	1.000 mL

Instruções: Ajustar pH 7,4; esterilização por autoclavação a 121°C por 15 min; armazenagem a TA. (Sambrook *et al.*, 1989).

Tampão de amostra para eletroforese

Glicerol	0,8 mL
SDS 10 %	1,6 mL
Beta-mercapto etanol	0,4 mL
Tris 0,5M pH 6,8	1 mL
Azul de Bromofenol 1%	0,4 mL
Água destilada q.s.p.	8 mL

Instruções: Preparar e estocar a temperatura ambiente.

TE pH 7,6

10 mM Tris	10 mL Tris 1M (pH 7,6)
1 mM de EDTA	2 mL EDTA 0,5M (pH 8,0)
Água tipo I q.s.p.	1000 mL

Instruções: Após o preparo autoclavar (121°C/20 min) e estocar a 4°C.

Tripsina/PBS

Tripsina estoque	0,5 mL
PBS 1 X	50mL

Preparar imediatamente antes do uso.

Tripsina/verseno

Tripsina estoque	0,5 mL
Verseno	50 mL

Preparar imediatamente antes do uso.

Verseno

Solução estoque 5%

EDTA	50 g
Vermelho de fenol 1%	0,1 mL
Água tipo I q.s.p.	1000 mL

Solução de trabalho

Solução estoque de verseno	20 mL
Vermelho de fenol 1%	0,1 mL
PBS pH 7,6 q.s.p.	1000 mL

Instruções: Homogeneizar, ajustar pH para 7,6 com NaOH 1N.

Aliquotar em frascos 50 mL, esterilizar por autoclave 121°C por 20 min. Estocar à temperatura ambiente.

4. Resultados

4.1. Construção dos vírus recombinantes expressando EGFP

4.1.1. Construção e clonagem das plataformas de expressão Construção I e Construção II

Nosso objetivo neste trabalho foi o de desenvolver uma estratégia para aprimorar a plataforma de expressão de EGFP descrita por Bonaldo e colaboradores (2007). Neste sentido, as plataformas de expressão de EGFP propostas aqui e denominadas Construção I e Construção II deveriam conter seqüências do domínio HA Den4 fusionadas ao extremo 3' do gene desta proteína repórter, em vez da seqüência homóloga de FA. Além disso, as Construções realizadas nesta dissertação diferiam entre si, pois na Construção I, o domínio HA Den4 consistiria da sua seqüência codante completa e, na Construção II, de uma variante truncada deste domínio, contendo parte desta seqüência, de onde foram omitidos os elementos H1 e CS.

Dessa forma, a primeira etapa realizada para o desenvolvimento dessas construções foi o alinhamento destas seqüências HA Den4 com as homólogas de FA (Figura 4.1) para uma avaliação da porcentagem de identidade entre elas. A seqüência HA Den4 apresentou 58% de identidade nucleotídica com a HA FA e era uma seqüência disponível no banco de DNA do Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, em um molde de cDNA construído para geração de um vírus quimérico FA/Dengue 4 neste laboratório. A porcentagem de identidade de aminoácidos encontrada entre as seqüências foi de 47,9 %. A porcentagem de identidade nucleotídica entre a HA Den4 truncada e a HA FA foi de 56,6 % e representou também uma menor porcentagem de identidade de aminoácidos, de 45,5 % (Tabela 5.1).

Além das seqüências da HA Den4, ambas as Construções foram planejadas para conter na sua porção 5'-terminal os 27 primeiros nucleotídeos do extremo 5' do gene NS1 do vírus FA. O processamento esperado para esta região, durante o processamento da poliproteína viral recombinante em relação ao RE, está representado na Figura 4.2

A

Majority	AAGTGTGTTXXXXXXACXXXXXAGGIGXXAACGXITGGCCXTTXXTXXGGXGAXACXGCTTGGGATTTXGXTCCGXTGGGXXITXTTCCACATCATTGG	
	10 20 30 40 50 60 70 80 90 100	
HA FA	...T...CACTCAG..CATG.A...C.TGG...CC...G.CA.G..A..C..C..C.....CA.C...C...A..GT.C...T..GG.T	100
HA Den 4	...A...TGAGTCC..ATAC.G...T.CAA...AA...A.TC.A..T..A..A..T.....TC.T...T...T..AC.G.....	100
HA Den 4 Trun	-----	10
Majority	GAAAGGCTGTGCACCCAGGTTTTTGGAAGTGTGTATACAACCATGTTTGGAGGAGTCTCATGGATGATTAGAATCCTAATTGGGTTCTTAGTGTGTGGAT	
	110 120 130 140 150 160 170 180 190 200	
HA FA	.G..A.GAA.T..TAC...G.....CTC..CC.T.CAGGGGC.A.....C..CT.GAAC.....A.CA.AGG..A.C..G...GCGG..C.CA.A...G	200
HA Den 4	200
HA Den 4 Trun	-----	110
Majority	TGGCAGGAACCTCGAGGAACACTTCAATGGCTATGACGTGCATAGCTGTTGGAGGAATCACCTCTGTTTTCTGGGCTTCACAGTTGGCGCC	
	210 220 230 240 250 260 270 280	
HA FATC...A.A..A...TGA.....T.C...GCATG..CTTG..A...TG...TGA.....T..TCTC.AGG.....	288
HA Den 4	288
HA Den 4 Trun	-----	198

B

	H1	CS	H2	TM1	TM2					
Majority	KIFXITXXGXIRX	AXIGITAWDFXSXGGX	ITSLGKAVHQVFGSVYTTMF	GGVSWMIRILIGFLVLWIGTNS	RNTSMAMTCIAVGGITLFLGFTVGA					
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
HA FA	KLFTQTMKGVRL	AVMGDTAWDFSSAGGFF	ITSVGKGIHTVFGSAFOGLE	GGLNWITKYVIMGAVLIWVGINT	RNMTMSMSMILVGYIMMFLSLGVGA					96
HA Den 4	KMFESTYRGAKRM	AILGETAWDFGSVGGLE	ITSLGKAVHQVFGSVYTTMF	GGVSWMIRILIGFLVLWIGTNS	RNTSMAMTCIAVGGITLFLGFTVGA					96
HA Den 4 Trun	-----	-----	-----	-----	-----					66

Figura 4.1: Alinhamento das regiões HA FA e HA Den4 (completa ou truncada). (A) alinhamento nucleotídico. O (•) representa nucleotídeos iguais entre as seqüências e “Majority” representa a seqüência consenso; e (B) alinhamento de aminoácidos. Estão identificadas as porções que constituem à região HA da proteína E (H1, CS, H2, TM1 e TM2).

Tabela 4.1: Identidade entre as seqüências HA FA e HA Den4 (completa ou truncada). Porcentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) das regiões HA FA e das regiões HA Den4 e HA Den4 Trun utilizadas na construção das plataformas de expressão de EGFP (Construção I e Construção II).

	% identidade (nt / aa)	
	<i>HA Den 4</i>	<i>HA Den 4 Trun</i>
<i>HA FA</i>	58,0 / 47,9	-
<i>HA FATrun</i>	-	56,6 / 45,5

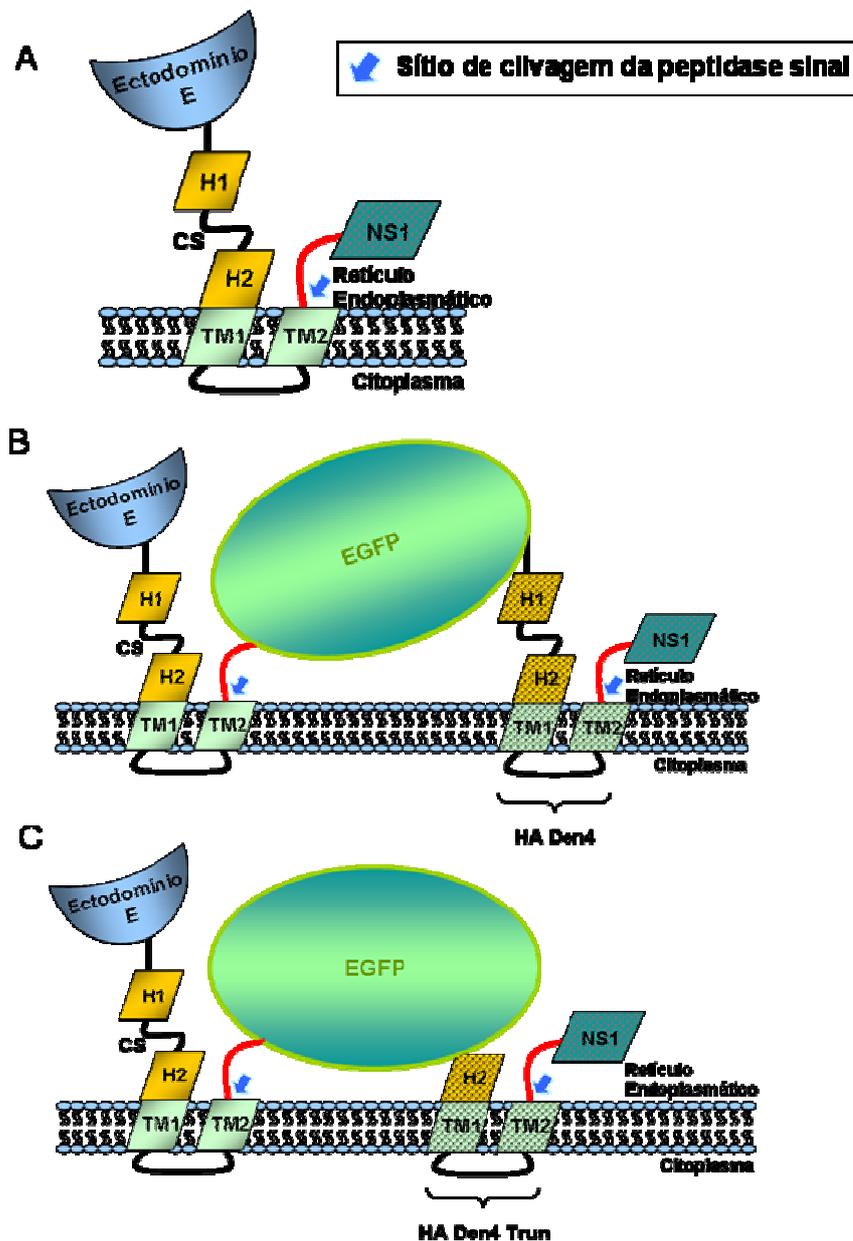


Figura 4.2: Região intergênica E/NS1 de FA e seu processamento em relação ao Reticulo Endoplasmático. (A) Porção Haste (H1 e H2) e Âncora (TM1 e TM2) da proteína E de FA; (B) Construção I inserida na região intergênica E/NS1 de FA; e (C) Construção II inserida na região intergênica E/NS1 de FA. A proteína EGFP encontra-se ancorada na membrana do RE pela região HA Den 4 à qual está fusionada na sua porção C-terminal. A presença dos 9 primeiros aminoácidos da proteína NS1 (em vermelho) fusionados na porção N-terminal da EGFP permite a translocação da proteína pela membrana do RE e mantém os sítios de clivagem da peptidase sinal (seta azul), importante no processamento desta região.

Para as reações de obtenção das plataformas de expressão de EGFP, foram testadas duas polimerases, a *Platinum Taq DNA Polimerase* e *Platinum Pfx DNA Polimerase*. A construção das plataformas foi realizada após duas etapas de reações de PCR. Após a primeira etapa, foram gerados dois fragmentos iniciais para cada construção. Para a Construção I, foram obtidos fragmentos de 782 pb e 347 pb, utilizando-se os pares de

oligonucleotídeos, RG 328 (+) e RG 397 (-) e, RG 396 (+) e RG 380 (-), respectivamente (Figuras 4.3 e 4.4). O fragmento de 782 pb continha o gene EGFP fusionado na sua porção 5'-terminal a 15 nucleotídeos da região 3'-terminal da proteína E, seguidos de 27 nucleotídeos da região 5'-terminal de gene NS1 de FA, e na sua porção 3'-terminal, o gene EGFP era seguido dos 27 primeiros nucleotídeos da região H1 da HA Den4. O fragmento de 347 pb, continha a região HA Den4 em sua versão completa e flanqueada em sua extremidade 5', por 33 nucleotídeos da porção 3'-terminal do gene EGFP, e em sua extremidade 3', pelos 27 primeiros nucleotídeos do gene NS1 de FA (Figura 4.3).

Para a Construção II, foram obtidos fragmentos iniciais de 782 pb e 251 pb, utilizando-se os pares de oligonucleotídeos, RG 328 (+) e RG 399 (-) e, RG 398 (+) e RG 380 (-), respectivamente (Figuras 4.3 e 4.4). O fragmento de 782 pb possuía o gene EGFP fusionado na sua porção 5'-terminal a 15 nucleotídeos da região 3'-terminal da proteína E, seguidos de 27 nucleotídeos da região 5'-terminal de gene NS1 de FA, e na sua porção 3'-terminal, o gene EGFP era seguido 27 nucleotídeos da região 5'-terminal da porção H2 da HA Den4. O fragmento de 251 pb, continha o gene da HA Den4 em sua versão truncada, fusionado em seu 5'-terminal a 27 nucleotídeos da porção 3'-terminal do gene da EGFP, e em seu 3'-terminal aos 27 primeiros nucleotídeos do gene NS1 de FA. (Figura 4.3).

Uma segunda etapa de PCR, que chamamos de PCRs de “Fusão”, foi realizada tendo por objetivo a fusão dos fragmentos de PCR iniciais (EGFP e HA Den4) com a finalidade de geração e amplificação das plataformas de expressão da proteína EGFP (Construções I e II). Nestas reações, foram utilizados os pares de fragmentos iniciais EGFP e HA Den4 correspondentes para cada Construção individual e o conjunto de oligonucleotídeo RG 328 (+) e RG 380 (-) de forma que, para cada plataforma, obteríamos um produto único originado da fusão dos dois fragmentos iniciais. No entanto, ocorreram problemas com a síntese final das plataformas e tivemos que introduzir uma série de modificações na sua execução. Inicialmente testamos algumas relações de molaridade entre os fragmentos iniciais, mas não obtivemos sucesso. A alternativa encontrada foi utilizar a *PCR_x Enhancer Solution* fornecida no kit da enzima e especificada pelo fabricante como uma solução indicada para realização de reações de PCR problemáticas. A amplificação dos fragmentos foi possível, mas a ideal condição de reação foi estabelecida quando alternativamente utilizamos o termociclador da marca Eppendorf, uma vez que fragmentos inespecíficos de reação foram consideravelmente diminuídos.

A fusão dos dois fragmentos iniciais correspondentes foi possível, pois cada um deles possuía uma região que era complementar e gerada graças às seqüências dos

oligonucleotídeos utilizados nas PCRs iniciais, acima descritas (Figura 4.3). Os fragmentos gerados possuíam 1071 pb (Construção I) e 981 pb (Construção II) (Figura 4.4).

As plataformas de expressão foram em seguida clonadas nos vetores *PCR-Blunt II-TOPO* e *pGEM-T Easy*, seguida de transformação nas cepas de *E. coli* DH5- α e SURE. No entanto, identificamos deleções e mutações ao longo das seqüências das plataformas clonadas, após transformações nestas cepas, o que impossibilitava sua utilização em etapas posteriores. Dessa forma, o plasmídeo *PCR-Blunt II-TOPO* contendo as plataformas de expressão foi utilizado na transformação de bactérias *E. coli* MC1061 quimiocompetentes. Em diferentes transformações nesta linhagem de bactérias, foram analisadas 44 colônias referentes à Construção I e 21 colônias referentes à Construção II, das quais a amostra que apresentava perfil eletroforético de migração mais alta em relação ao plasmídeo vazio (Figura 4.5) foi digerida com a enzima *Nar I*, apresentando 4 bandas de 248 pb, 1029 pb (inserto), 812 pb e 2155 pb (Figura 4.5) geradas a partir dos 2 sítios presentes na inserção e dos 2 sítios presentes no plasmídeo *PCR-Blunt II-TOPO*. Nenhum clone para a Construção II foi positivo.

Foi realizada uma nova transformação em bactérias *E. coli* MC1061 quimiocompetentes para a Construção II ligada em *PCR-Blunt II-TOPO* ou em *pGEM-T Easy*. (Figura 4.5) Foram selecionadas e analisadas 6 colônias transformadas com *pGEM-T Easy* e 23 colônias transformadas com *PCR-Blunt II-TOPO*, das quais a amostra que apresentava perfil eletroforético de migração mais alto em relação ao plasmídeo vazio foi digerida com a enzima *EcoR I* (Figura 5.5) e era referente à colônia transformada com *pGEM-T Easy*. O plasmídeo *pGEM-T Easy* possui um sítio para *EcoR I*, que não está presente na plataforma de expressão e, dessa forma, a digestão por esta enzima apresentou bandas de 3054 pb e 939 pb (Figura 4.5) o que representa perfil eletroforético de restrição positivo.

Após esta análise, obtivemos um clone da Construção I em *PCR-Blunt II-TOPO* (4587 pb) e um clone da Construção II em *pGEM-T Easy* (3996 pb). Estes plasmídeos foram submetidos a sequenciamento nucleotídico para averiguação da integridade gênica dos cassetes. Ambos os clones não apresentaram qualquer tipo de mutação. Estes plasmídeos foram denominados *PCR-Blunt II-TOPO/EGFP/HA Den4* e *pGEM-T Easy/EGFP/HA Den4* Trun contendo, respectivamente, as Construções I e II (Figura 4.6).

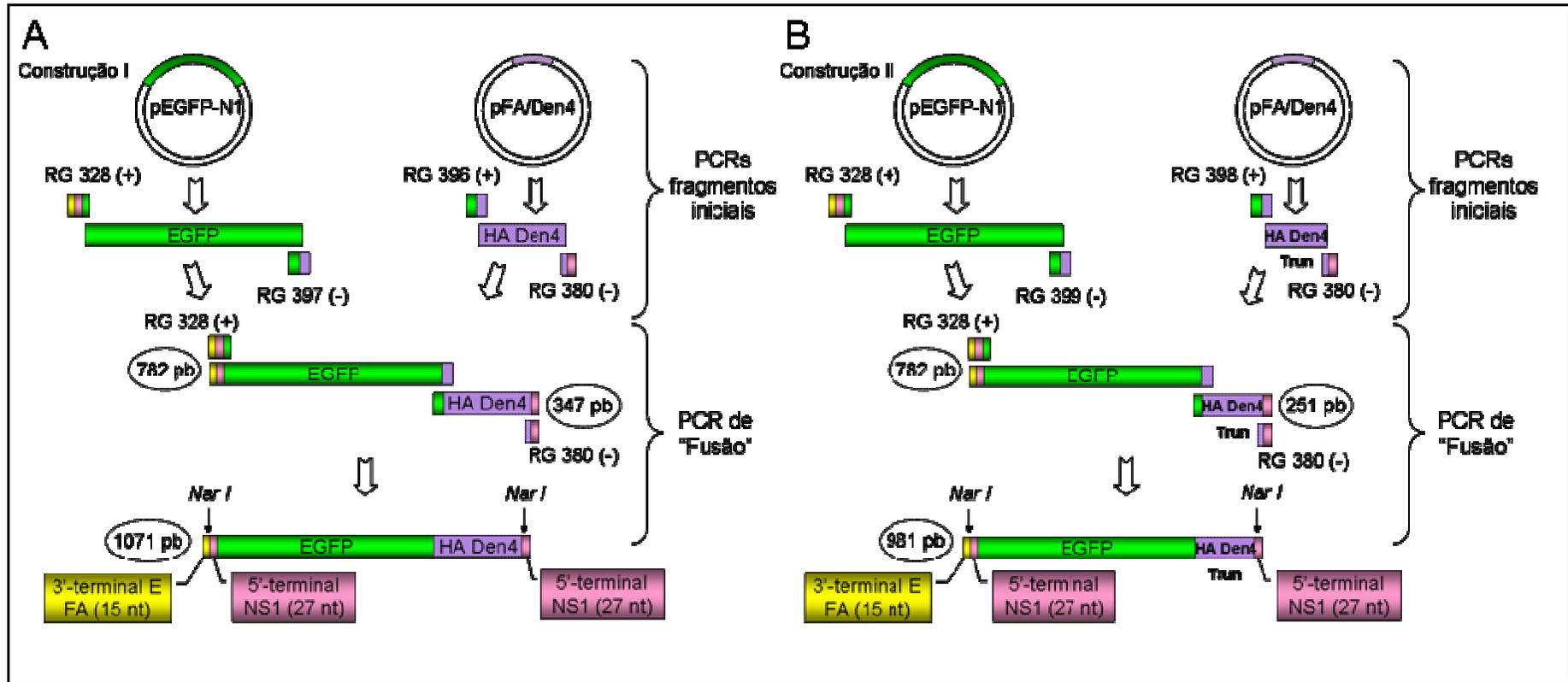


Figura 4.3: Estratégia de construção das plataformas de expressão de EGFP por PCR. (A) Construção I (plataforma de expressão de EGFP contendo a região HA Den4 na versão completa) e (B) Construção II (plataforma de expressão de EGFP contendo a região HA Den4 na versão truncada ou parcial).

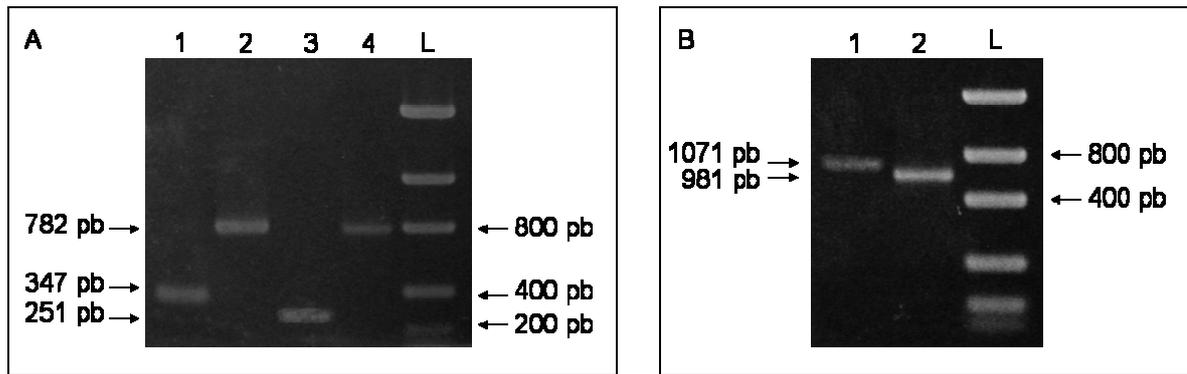


Figura 4.4: Obtenção das plataformas de expressão de EGFP por PCR. (A) Perfil eletroforético dos produtos de PCR dos fragmentos iniciais EGFP e HA Den4 em gel de agarose 0,8%. Na raia 1, o fragmento HA Den4 (versão completa); na raia 2, o fragmento EGFP para Construção I; na raia 3, o fragmento HA Den4 (versão truncada); na raia 4, o fragmento EGFP para Construção II. (B) Perfil eletroforético dos produtos de PCR de “Fusão” em gel de agarose 0,8%. Na raia 1, o fragmento da Construção I; na raia 2, o fragmento da Construção II; L- padrão de peso molecular Low Mass.

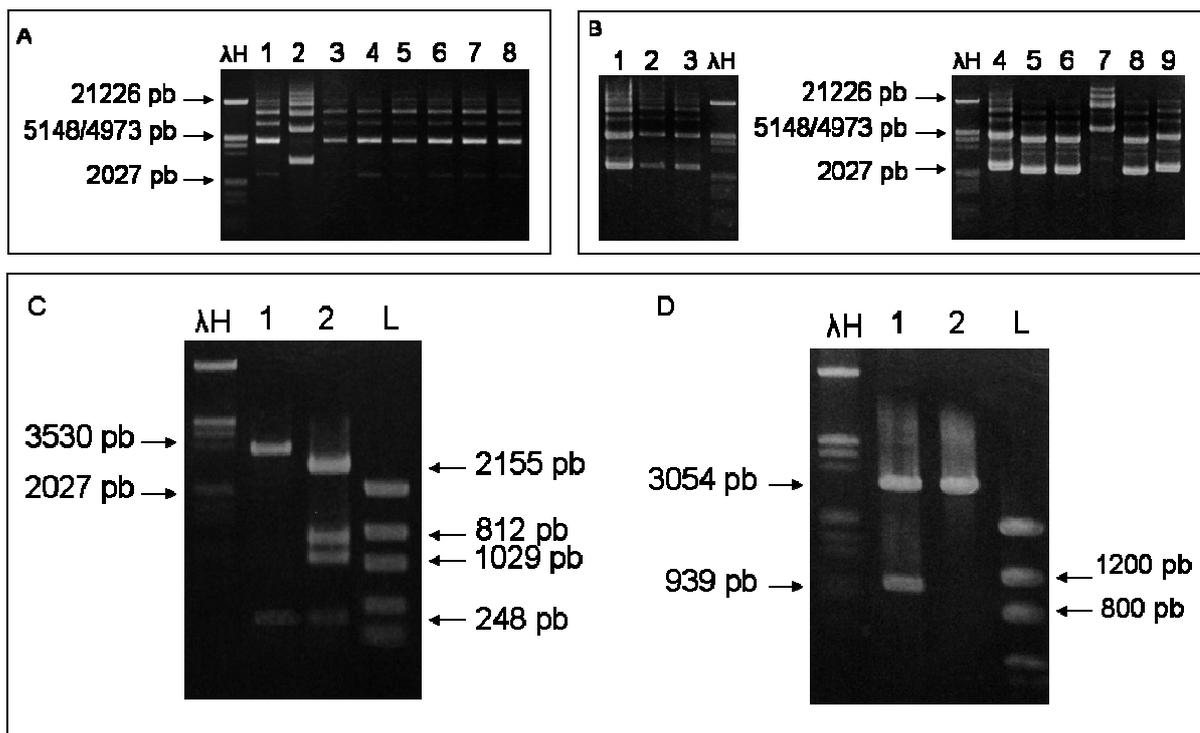


Figura 4.5: Clonagens das plataformas de expressão de EGFP (Construção I e Construção II) nos plasmídeos *PCR-Blunt II-TOPO* e *pGEM-T Easy*. (A) Perfil eletroforético de DNA plasmidial após clonagem da Construção I em *PCR-Blunt II-TOPO* em gel de agarose 0,8%. Na raia 2, amostra recombinante; nas demais raias amostras não-recombinantes. (B) Perfil eletroforético de DNA plasmidial após clonagem da Construção II em *PCR-Blunt II-TOPO* (raias 1 - 3) e *pGEM-T Easy* (raias 4 - 9). Na raia 7, amostra recombinante; nas demais raias amostras não-recombinantes. (C) Perfil eletroforético da digestão com *Nar I* em gel de agarose 0,8%, após clonagem no plasmídeo *PCR-Blunt II-TOPO*. Na raia 1, amostra com perfil de restrição negativo (plasmídeo sem o inserto) e na raia 2, amostra com perfil de restrição positivo (*PCR-Blunt II-TOPO*/EGFP/HA Den4). (D) Perfil eletroforético da digestão com *Nar I* em gel de agarose 0,8%, após clonagem no plasmídeo *pGEM-T Easy*. Na raia 1, amostras com perfil de restrição positivo (*pGEM-T Easy*/EGFP/HA Den4 Trun) e na raia 2, amostra representativa do perfil de restrição negativo (plasmídeo sem o inserto). λH: padrão de peso molecular λ/*EcoR I Hind III*; L: padrão de peso molecular Low Mass.

Posteriormente, detectamos ter negligenciado a etapa de purificação da reação de Adenilação, anterior à etapa de clonagem em *pGEM-T Easy*, de forma que, os dATPs excedentes na reação, que não fossem utilizados na geração da extremidade de Adenina, não foram eliminados antes da etapa de ligação no vetor. Dessa forma, estes dATPs em excesso poderiam estar ligando-se na sequência de Timina das extremidades do vetor *pGEM-T* bloqueando-as dificultando a ligação das seqüências de interesse no vetor, e isto pode ter proporcionado a baixa eficiência na obtenção dos clones positivos de *pGEM-T Easy*, durante este trabalho.

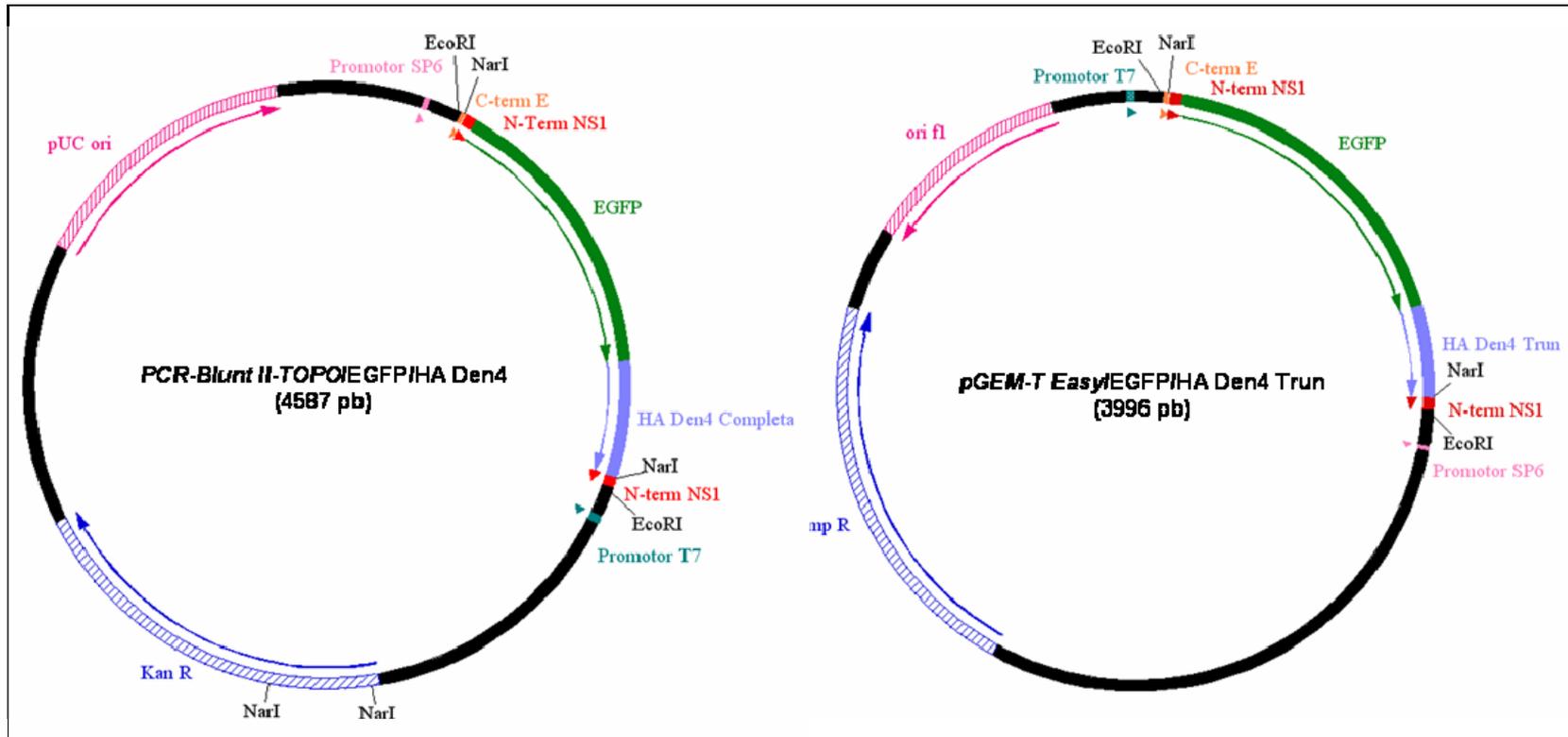


Figura 4.6: Esquema representativo dos plasmídeos *PCR-Blunt II-TOPO/EGFP/HA Den4* e *pGEM-T Easy/EGFP/HA Den4 Trun*. Estes plasmídeos foram obtidos após clonagem das plataformas de expressão de EGFP, Construção I e Construção II, nos vetores comerciais *PCR-Blunt II-TOPO* e *pGEM-T Easy*, respectivamente. Na figura estão representados ambas as plataformas, os sítios de restrição *EcoRI* e *NarI* e os genes de resistência a antibióticos.

4.1.2. Clonagem no plasmídeo pT3 e construção dos moldes de DNA que darão origem aos genomas virais recombinantes

Como já descrito, os fragmentos de DNA que albergam as plataformas de expressão (Construção I e II), originados por PCR e clonados nos vetores comerciais *PCR-Blunt II-TOPO* e *pGEM-T Easy*, continham adicionalmente no seu extremo 5', os 15 últimos nucleotídeos do extremo 3' da proteína E, e no seu extremo 3', a repetição dos 27 primeiros nucleotídeos do gene NS1. Estas seqüências flanqueiam os sítios *Nar I* que definem o segmento correspondente às plataformas de expressão de EGFP (Figura 4.3) e tornam possível a inserção delas na região entre os genes E/NS1 do genoma de FA, uma vez que esta também apresenta este sítio de restrição.

Os clones *PCR-Blunt II-TOPO/EGFP/HA Den4* e *pGEM-T Easy/EGFP/HA Den4* Trun foram, então, digeridos com *Nar I* para liberação dos fragmentos de 1.029 pb e 939 pb, correspondentes as plataformas de expressão Construções I e II, respectivamente (Figura 4.7 e 4.8). O plasmídeo de pT3 (9939 pb) também foi digerido com *Nar I* e desfosforilado com a enzima *SAP* (Figura 4.8). Este último tratamento dificulta a ligação das pontas coesivas do plasmídeo nelas mesmas, o que tornaria baixa eficiência de ligação das plataformas no vetor.

Após as reações de clonagem e a transformação de bactérias, foram selecionadas 27 colônias da Construção I e 35 colônias da Construção II. Após análise por eletroforese em gel de agarose (Figura 4.8), as amostras do DNA plasmidial foram digeridas por enzima de restrição *Pst I* e analisadas quanto ao perfil eletroforético. O plasmídeo pT3 possui 3 sítios de restrição para a enzima *Pst I*, e dessa forma, o padrão eletroforético de pT3 recombinante para a Construção I após digestão apresentou, como o esperado, 3 fragmentos de 2469 pb, 1896 pb (fragmento com inserto) e 6645 pb (Figura 4.8). A digestão de pT3 recombinante para a Construção II gerou, como o esperado, 3 fragmentos de 2469 pb, 1806 pb (fragmento com inserto) e 6645 pb (Figura 4.8). Após esta análise, foram encontrados 5 clones positivos para a Construção I e 7 clones para a Construção II.

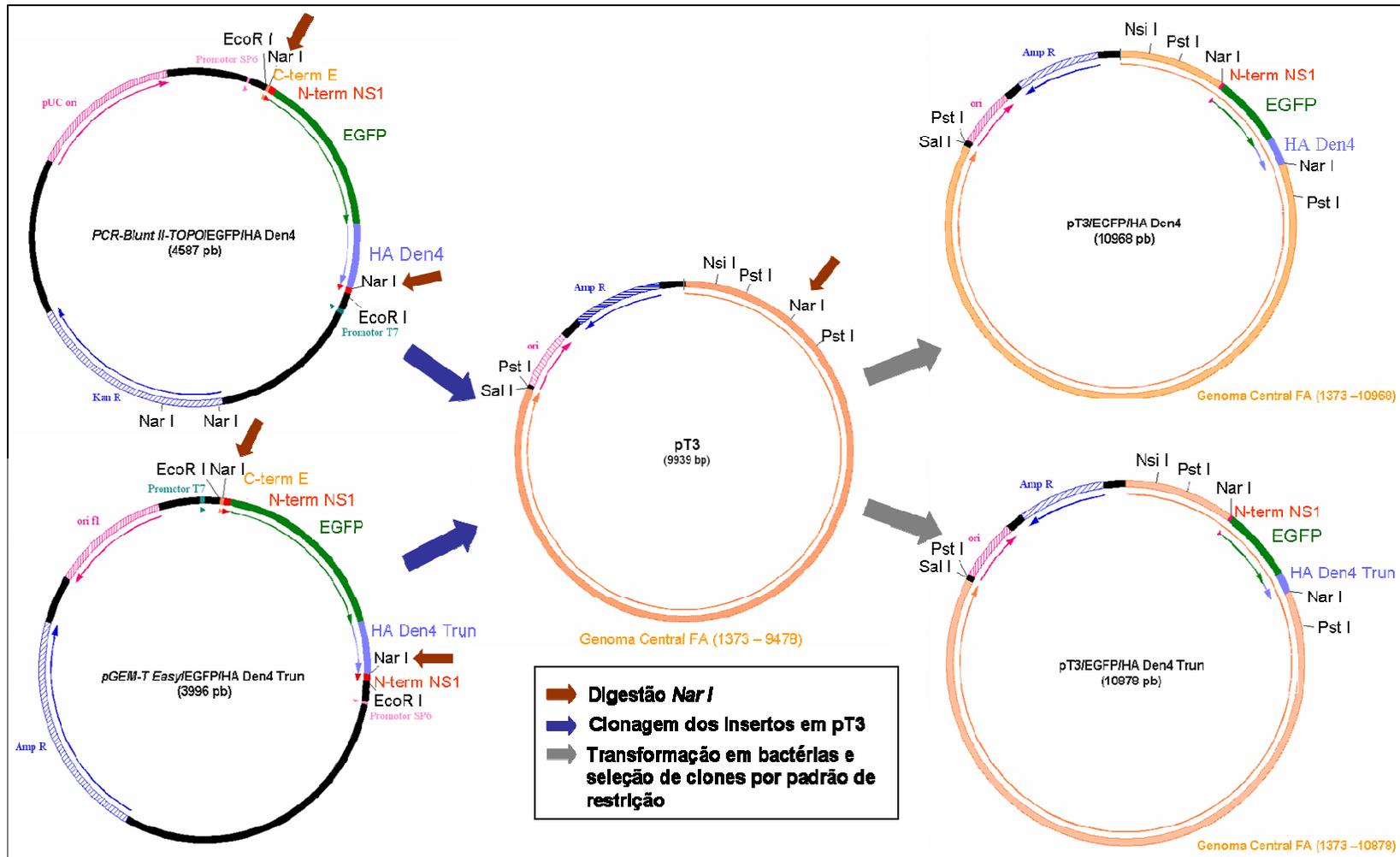


Figura 4.7: Esquema da clonagem das plataformas de expressão de EGFP no plasmídeo pT3. Os clones *PCR-Blunt II-TOPO/EGFP/HA Den4* e *pGEM-T Easy/EGFP/HA Den4 Trun* foram digeridos com a enzima *Nar I* (seta vinho) para liberação das plataformas de expressão de EGFP. As plataformas foram clonadas no plasmídeo pT3 (seta azul) e os plasmídeos resultantes foram utilizados em transformação de bactérias *E. coli* (seta cinza). Após transformação clones contendo a inserção sob orientação correta foram selecionados.

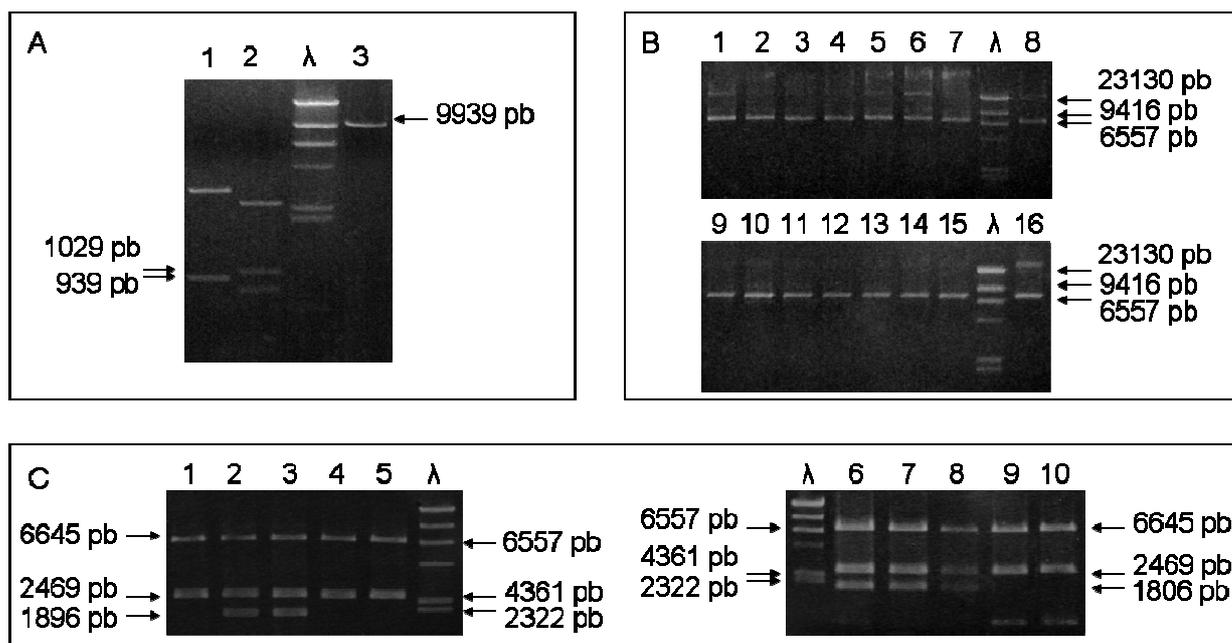


Figura 4.8: Clonagem das plataformas de expressão de EGFP em pT3. (A) Perfil eletroforético da digestão com *Nar I* dos plasmídeos *pGEM-T Easy/EGFP/HA Den4 Trun* (raia 1), *PCR-Blunt II-TOPO/EGFP/HA Den4* (raia 2) e pT3 (raia 3), em gel de agarose 0,8%. (B) Perfil eletroforético das preparações plasmidiais após clonagem das plataformas Construção I (raias 1-7) e Construção II (raias 9-15) em pT3. Na raias 8 e 16, pT3 não clonado. (C) Detecção de clones positivos por perfil de restrição com *Pst I* após clonagem das plataformas de expressão Construção I (raias 1-5) e Construção II (raias 6-10). As raias 2, 3, 6, 7 e 8 apresentam perfil eletroforético de restrição positivo, em gel de agarose 0,8%. λ : padrão de peso molecular λ *Hind III*.

As amostras de DNA plasmidial destes clones foram submetidos a reações de sequenciamento nucleotídico para averiguação da integridade do cassete de expressão e da correta orientação na fase de leitura do genoma viral. Essa preocupação é devida à ligação unidirecional dos insertos no pT3, ou seja, os insertos ligam-se no plasmídeo por dois sítios iguais *Nar I* e, por isso, podem ligar-se tanto sob a orientação desejada ou invertida. Dentre as amostras analisadas, foi possível identificar para a Construção I, 2 clones com o inserto invertido e 2 clones com o inserto na orientação correta, enquanto que para a Construção II, identificamos 4 clones com o inserto invertido e 2 clones com o inserto na orientação correta. Dos clones contendo as inserções com orientação correta no plasmídeo pT3, foram selecionados 1 clone da Construção I e 1 clone da Construção II que foram denominados pT3/EGFP/HA Den4 (10968 pb) e pT3/EGFP/HA Den4 Trun (10878 pb), respectivamente (Figura 4.8), e estes foram utilizados para etapa de montagem dos moldes de DNA que darão origem aos genomas virais recombinantes.

Os clones plasmidiais pT3/EGFP/HA Den4 e pT3/EGFP/HA Den4 Trun foram

clivados com as enzimas de restrição *Nsi I* e *Sal I*, com a finalidade de geração de extremidades coesivas para a ligação destes no plasmídeo pG1/2. A digestão de pT3/EGFP/HA Den4 gerou fragmentos de 8792 pb e 2176pb e a digestão de pT3/EGFP/HA Den4 Trun gerou fragmentos de 8702 pb e 2176 pb (Figura 4.9 e 4.10). O DNA plasmidial de pT3 (sem insertos) e de pG1/2 também foram clivados com estas enzimas gerando fragmentos de 7763 pb e 2176 pb, para pT3, e fragmentos de 5146 pb e 1759 pb, para pG1/2. (Figura 4.10)

Os plasmídeos pT3 (sem os insertos), pT3/EGFP/HA Den4 e pT3/EGFP/HA Den4 Trun foram ligados ao plasmídeo pG1/2 (Figura 5.9 e 5.10) segundo a tecnologia de clones infecciosos (Rice, et al 1989). A ligação de pT3 sem os insertos no pG1/2 foi realizada a fim da construção de um vírus parental, que foi utilizado como referência em diferentes etapas deste trabalho. Os produtos de ligação foram clivados com *XhoI*, para a linearização das seqüências gerando fragmentos do molde completo de cDNA viral de 13938 pb, 13848 pb e 12909 pb. Estes produtos que contém os moldes de cDNA viral foram denominados pG1/2-T3/EGFP/HA Den4, pG1/2-T3/EGFP/HA Den4Trun e pG1/2-T3, respectivamente (Figura 4.9).

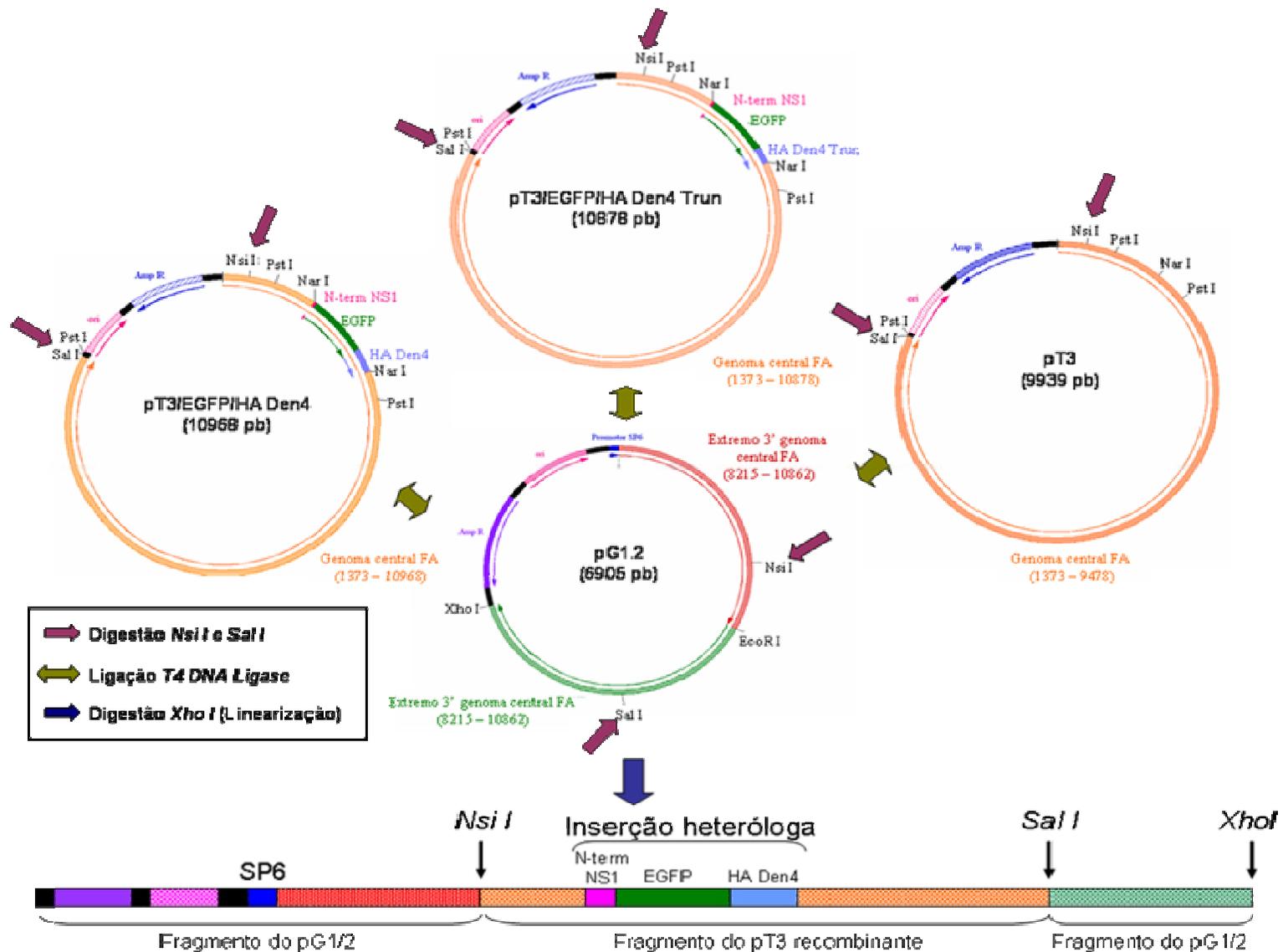


Figura 4.9: Esquema da montagem dos moldes de cDNA virais. Os plasmídeos pT3 recombinantes (com as Construções I e II) e não-recombinante e o pG1/2 foram digeridos por *Nsi I* e *Sal I* (seta vinho) e purificados. Em seguida, os produtos de pT3 foram ligados aos de pG1/2 (seta verde). Os produtos de ligação pG1/2-T3 recombinante e parental foram linearizados com *Xho I* (seta azul).

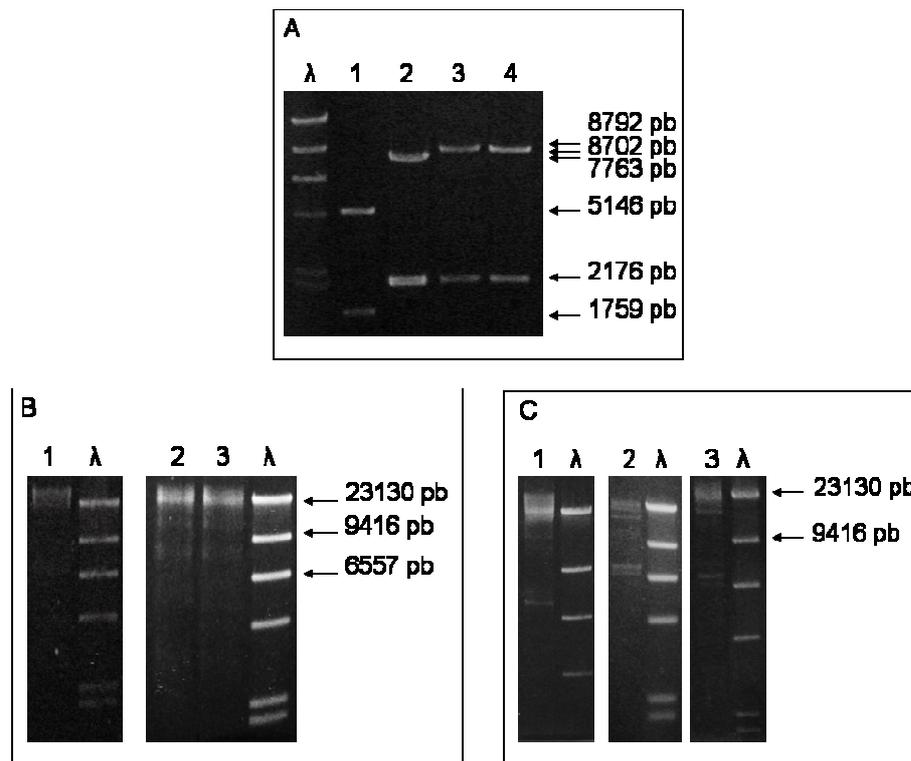


Figura 4.10: Montagem dos moldes de cDNA viral. (A) Perfil eletroforético da digestão com as enzimas *Nsi I* e *Sal I*, em gel de agarose 0,8%. Na raia 1, pG1/2; na raia 2, pT3; na raia 3, pT3/EGFP/HA Den4; e na raia 4, pT3/EGFP/HA Den4 Trun. (B) Perfil eletroforético da ligação dos plasmídeos pT3 (raia 1), pT3/EGFP/HA Den4 (raia 2) e pT3/EGFP/HA Den4 Trun (raia 3) no plasmídeo pG1/2, em gel de agarose 0,8%. (C) Perfil eletroforético da digestão com *Xho I* dos plasmídeos pG1/2-T3 (raia 1), pG1/2-T3/EGFP/HA Den4 (raia 2), pG1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun (raia3), em gel de agarose 0,8%. λ: padrão de peso molecular λ Hind III.

4.1.3. Obtenção dos vírus parental FA 17D G1/2-T3 e recombinantes

Os moldes lineares de cDNA correspondentes ao genoma de FA recombinantes (pG1/2-T3/EGFP/HA Den4 e pG1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun) e parental (pG1/2-T3) foram transcritos *in vitro*, com o objetivo de geração dos RNAs infecciosos FA, gerando os fragmentos de 11971 pb, 11881 pb e 10942 pb, respectivamente (Figura 4.11). Juntamente com estes fragmentos, foram produzidos outros com diversos pesos moleculares a partir de diferentes moldes de cDNA linearizados gerados pela ligação de fragmentos provenientes da digestão de pT3 e G1/2 por *Nsi I* e *Sal I*. Estes diferentes fragmentos podem ser detectados juntamente com nossos fragmentos de interesse que, por adotarem conformações de estrutura secundária e terciária, não podem ser identificados no gel em condições não-desnaturantes.

Assim, não podemos apontar no gel as bandas exatas correspondentes às fitas de RNA de interesse.

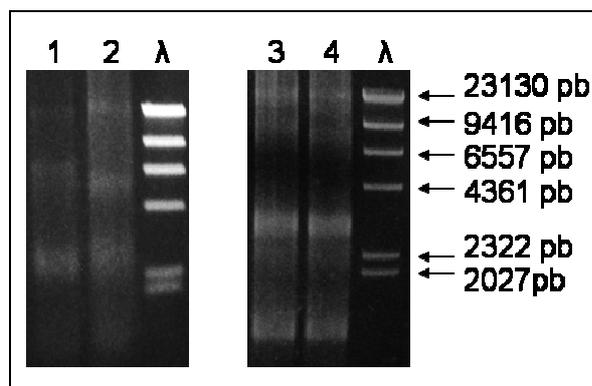


Figura 4.11: Geração dos RNAs virais infecciosos por transcrição *in vitro*. Na raia 1, G1/2-T3/EGFP/HA Den4; nas raia 2 e 4, G1/2-T3; e na raia 3, G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun, em gel de agarose 1%.

As amostras de RNA dos clones infecciosos, pG1/2-T3/EGFP/HA Den4, pG1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun e pG1/2-T3 sintetizadas *in vitro*, foram transfectadas em monocamadas de células Vero. O estabelecimento de Efeito Citopático (CPE) moderado representando a proliferação dos vírus ocorreu no 6º dia pós-transfecção para o vírus parental. O sobrenadante de cultura coletado gerou a suspensão viral de primeira passagem (1P) do vírus controle denominado FA 17D/G1/2-T3.

As células transfectadas com os RNAs FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 e FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun não apresentaram qualquer sinal de CPE até o 5º dia pós-transfecção, estando semelhantes ao controle negativo Mock, que começava a apresentar morte celular por efeito do esgotamento dos recursos do meio de cultura. Assim, neste dia foram realizados a tripsinização e o re-cultivo das monocamadas celulares transfectadas com os genomas recombinantes e das monocamadas celulares da condição controle Mock. As monocamadas celulares transfectadas com o RNA recombinante G1/2-T3/EGFP/HA Den4 apresentou CPE no segundo dia após a tripsinização, gerando a suspensão viral 1P do vírus recombinante denominado FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4.

As células transfectadas com o RNA recombinante G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun foram observadas até o 5º dia pós-tripsinização e não apresentaram CPE. Dessa forma, uma nova transfecção foi realizada com a mesma preparação de RNA transcrito e no 5º dia após a transfecção, houve aparecimento de CPE, que gerou o sobrenadante viral 1P do vírus recombinante denominado FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun.

A ocorrência de CPE foi muito mais precoce do que a do procedimento anterior, de transfecção do RNA viral. Assim, as culturas de célula infectadas com os vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 e FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun apresentaram CPE no 2º dia pós-infecção e aquela infectada com o vírus FA 17D/G1/2-T3 apresentou CPE no 3º dia. Além do vírus FA 17D/G1/2-T3, preparamos também um estoque viral do vírus vacinal FA 17DD, que corresponde a vacina FA produzida por Bio-Manguinhos, em que o aparecimento de CPE nas células infectadas ocorreu no 4º dia pós-infecção. Estas preparações de amostras de segunda passagem apresentaram títulos de $1,5 \times 10^6$ PFU/mL para o vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4, $1,8 \times 10^7$ PFU/mL para o vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun, $4,5 \times 10^7$ PFU/mL para o vírus parental FA 17D/G1/2-T3 e $3,5 \times 10^7$ PFU/mL para o vírus vacinal FA 17DD. Os títulos dos vírus recombinantes foram suficientemente elevados para a realização das etapas experimentais posteriores.

Tabela 4.2: Valores dos títulos virais dos vírus recombinantes e dos vírus de referência.

<i>Vírus</i>	<i>Título viral</i> (PFU/mL)
FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4	$1,5 \times 10^6$
FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun	$1,8 \times 10^7$
FA 17D/G1/2-T3	$4,5 \times 10^7$
FA 17DD	$3,5 \times 10^7$

O estoque dos vírus recombinantes foi avaliado por RT-PCR, onde foram gerados fragmentos de 2010 pb e 1920 pb, como os obtidos do sobrenadante de transfecção 1P, correspondentes à presença das inserções, Construção I e II, nos genomas virais, respectivamente (Figura 4.12). A integridade gênica foi confirmada por sequenciamento nucleotídico destes produtos de PCR.

Uma vez confirmadas a presença e integridade dos insertos heterólogos no estoque dos vírus recombinantes FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 e FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun, pudemos dar início a todo o trabalho de caracterização biológica destes vírus, utilizando como controles o vírus parental FA 17D/G1/2-T3 e o vacinal FA 17DD.

4.2.1. Cinética de Multiplicação Viral

A caracterização da capacidade proliferativa dos vírus FA recombinantes (FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HADen4 e FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HADen4 Trun), comparativamente aos vírus de referência (FA 17D/G1/2-T3 e FA 17DD), foi avaliada por cinética de infecção viral em células Vero em MOI de 0,02, em 3 culturas independentes, e expressa pela média e desvio padrão do título viral obtido ao longo do tempo. Os resultados encontrados estão apresentados na Figura 4.13 e na Tabela 4.3.

Podemos observar que o pico de multiplicação dos vírus recombinantes FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 e FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun e do vírus parental FA 17D/G1.2-T3 ocorreu em 48h, apresentando títulos de $6,51 \pm 0,36$, $6,15 \pm 0,29$ e $7,23 \pm 0,19$ Log₁₀ PFU/mL, respectivamente. O vírus vacinal FA 17 DD apresentou pico em 72 h p.i. apresentando título de $7,32 \pm 0,17$ Log₁₀ PFU/mL. Os títulos virais de cada grupo não apresentam diferenças significativas ao longo do tempo, de 48 até 144h, para os vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4, FA 17D/G1/2-T3 e FA 17 DD, e até 120h para o vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun (*ANOVA one-way*, pós teste Tukey; $P > 0,05$), o que significa uma manutenção da capacidade proliferativa destes vírus a partir do pico de multiplicação, até estes pontos da curva.

Os vírus recombinantes FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HADen4 e FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HADen4 Trun foram comparados quanto aos títulos virais alcançados em cada tempo e não apresentam diferenças significativas entre si ($P > 0,05$), indicando semelhança entre suas capacidades proliferativas. Quando comparados com o vírus vacinal FA 17DD, observamos que os títulos atingidos com 24h e 48h são semelhantes ($P > 0,05$), mas nos outros tempos avaliados, os títulos alcançados pelo vírus vacinal são significativamente superiores aos atingidos pelo vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HADen4 (72h, 96h e 120h) e pelo vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HADen4 Trun (72h, 96h, 120h e 144h) ($P < 0,05$).

Comparado ao vírus parental FA 17D/G1/2-T3, o vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HADen4 apresenta títulos inferiores ao parental em 72h e 96h ($P < 0,05$). O vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HADen4 Trun, também apresenta títulos virais menores que o parental FA 17D/G1/2-T3 ($P < 0,05$) que podem ser observados desde os tempos iniciais até 120h.

Ao comparar o vírus de referência FA 17D/G1/2-T3 e o vacinal FA 17DD entre si, observamos que o vírus FA 17D/G1/2-T3, além de atingir um pico de multiplicação em 48h, anteriormente ao vírus vacinal, que é em 72h, o título viral que alcança neste tempo é superior

ao do vacinal ($7,23 \pm 0,19$ e $6,33 \pm 0,07$, respectivamente, $P < 0,05$). No entanto, a partir de 72h os títulos alcançados são semelhantes para ambos os vírus ($P > 0,05$).

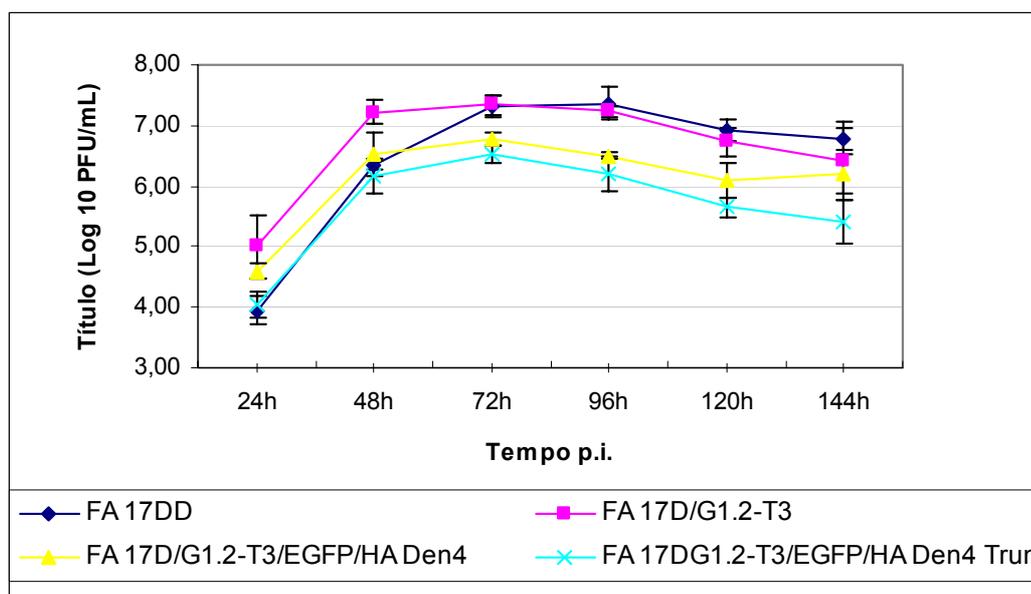


Figura 4.13: Cinética de Multiplicação dos Vírus Recombinantes FA 17D/G1.2-T3/EGFP/HA Den4 e FA 17D/G1.2-T3/EGFP/HA Den4 Trun, e dos vírus de referência FA 17DD e FA 17D/G1.2-T3 em células Vero. A cinética de multiplicação viral foi realizada por meio da infecção de monocamadas de células Vero com os vírus recombinantes e os de referência (MOI 0,02), para a realização de 3 curvas independentes. Os sobrenadantes de cultura foram coletados em intervalos de 24h até 144h e titulados por contagem de placas de lise. A cinética foi determinada por meio das médias das 3 curvas independentes

Tabela 4.3: Valores encontrados na Cinética de Multiplicação Viral em Cultura de Células Vero (Log10 PFU/mL): Valores de média e desvio padrão. Em negrito estão destacados os valores correspondentes ao pico de crescimento viral.

Vírus	Tempo p.i.	24 h	48 h	72h	96 h	120 h	144 h
FA 17DD		3,94±0,24	6,33±0,07	7,32±0,17	7,37±0,28	6,93±0,18	6,78±0,19
FA 17D/G1.2-T3		5,01±0,52	7,23±0,19	7,34±0,15	7,23±0,08	6,73±0,24	6,43±0,65
FA 17D/G1.2-T3/EGFP/HADen4		4,60±0,12	6,51±0,36	6,78±0,10	6,50±0,06	6,11±0,29	6,21±0,33
FA 17D/G1.2-T3/EGFP/HADen4Trun		4,03±0,22	6,15±0,29	6,52±0,15	6,21±0,28	5,65±0,18	5,41±0,36

4.2.2. Caracterização da cinética de expressão de EGFP pelos vírus recombinantes por citometria de fluxo

A cinética de expressão da EGFP nas células Vero infectadas pelos vírus recombinantes FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 e FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun também foi avaliada por citometria de fluxo, por meio da quantificação da expressão da proteína auto-fluorescente. A avaliação foi baseada na detecção de EGFP nas células e os dados foram expressos pela porcentagem de células EGFP positivas dentre a população total de células.

Podemos observar um pico de expressão de EGFP no tempo de 72h p.i. para ambos os vírus recombinantes FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 e FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun, representando 88,37% e 91,54% de células expressando a proteína, respectivamente (Figura 4.14). Esta cinética foi realizada até o tempo de 72h de infecção, devido à impossibilidade da coleta das células em tempos de infecção superiores a este, uma vez que o efeito citopático sobre as monocamadas celulares foi demasiadamente intenso a partir deste período de infecção.

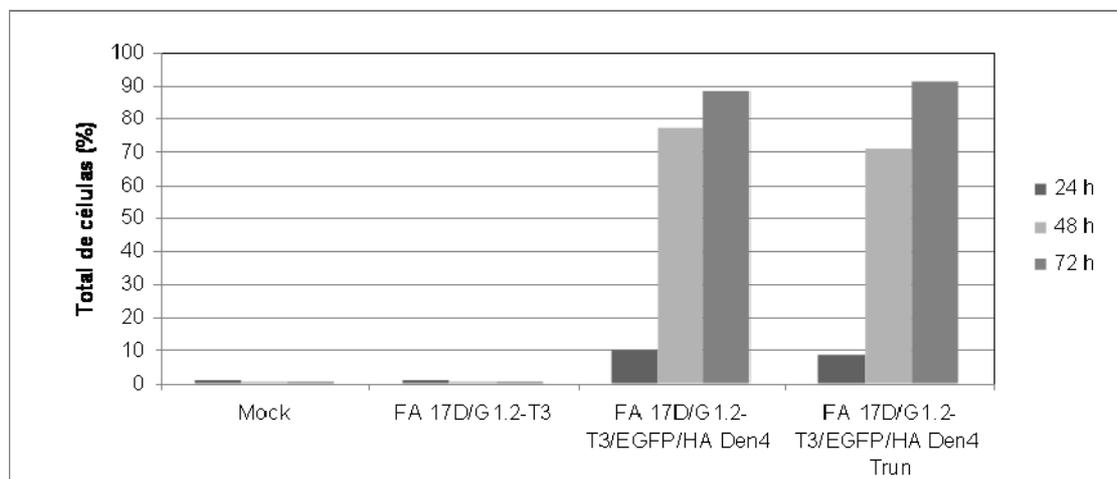
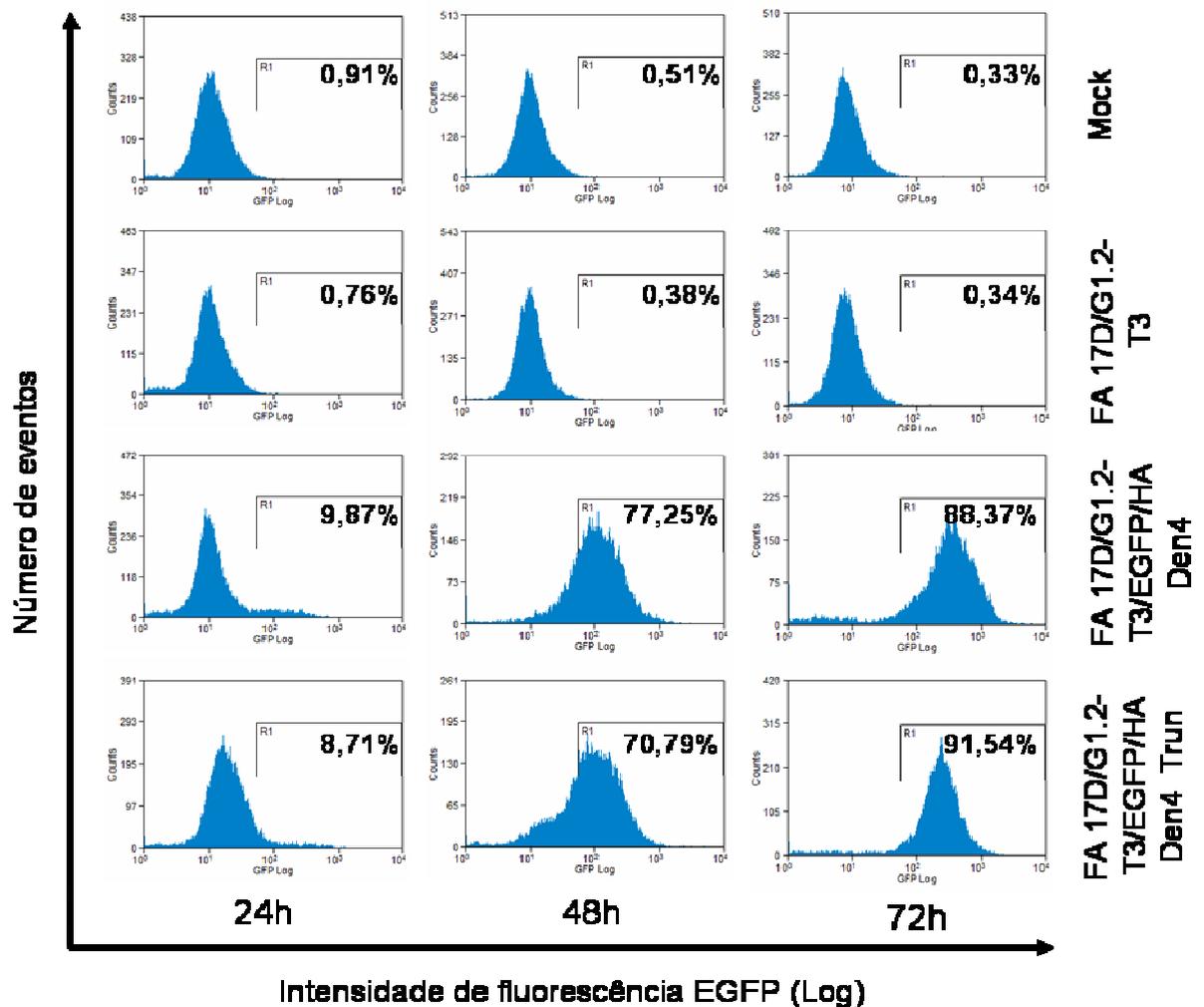


Figura 4.14: Cinética de expressão de EGFP por citometria de fluxo. Células Vero infectadas com os vírus recombinantes FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 e FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun nos tempos de 24h, 48h e 72h p.i. Como controle, foram utilizadas células Vero infectadas com o vírus parental FA 17D/G1/2-T3 e células não-infectadas (Mock). Os resultados foram expressos como a porcentagem de células expressando EGFP no total de células adquiridas.

4.2.3. Estudo da cinética de expressão de EGFP em células Vero infectadas pelos vírus recombinantes por microscopia de fluorescência

A cinética de expressão da EGFP nas células Vero infectadas pelos vírus recombinantes foi analisada por detecção da autofluorescência da proteína em microscópio de fluorescência confocal. O controle negativo utilizado neste experimento foi o vírus FA 17D/G1/2-T3 e as células infectadas por este vírus não apresentaram fluorescência em verde (Figura 4.15).

A expressão de EGFP foi considerada semelhante para células infectadas com ambos os vírus recombinantes FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 ou FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun. Somente a partir de 48 h p.i. foi possível observar fluorescência de EGFP, cujo pico de expressão ocorreu em 72 h p.i.. Em 96 h e 120 h p.i. foi possível observar uma diminuição na densidade celular provavelmente resultante do efeito citopático da infecção pelos vírus, mas ainda foi possível a detecção de fluorescência da proteína acumulada nas células infectadas por qualquer dos vírus recombinantes.

Como a cinética de multiplicação viral revelou que o pico de multiplicação foi a partir de 48h para os vírus recombinantes e o pico de expressão de EGFP observado, tanto por microscopia de fluorescência quanto por citometria de fluxo, ocorreu em 72h, determinamos o período de 72h como o tempo de infecção com os vírus recombinantes para a avaliação de outras etapas desta dissertação. Este tempo foi igualmente utilizado para infecções com os vírus controles.

O estudo de localização da EGFP nas células infectadas mostrou um acúmulo desta proteína em regiões perinucleares que co-localizam com o Retículo Endoplasmático marcado com um agente traçador específico (Figura 4.16).

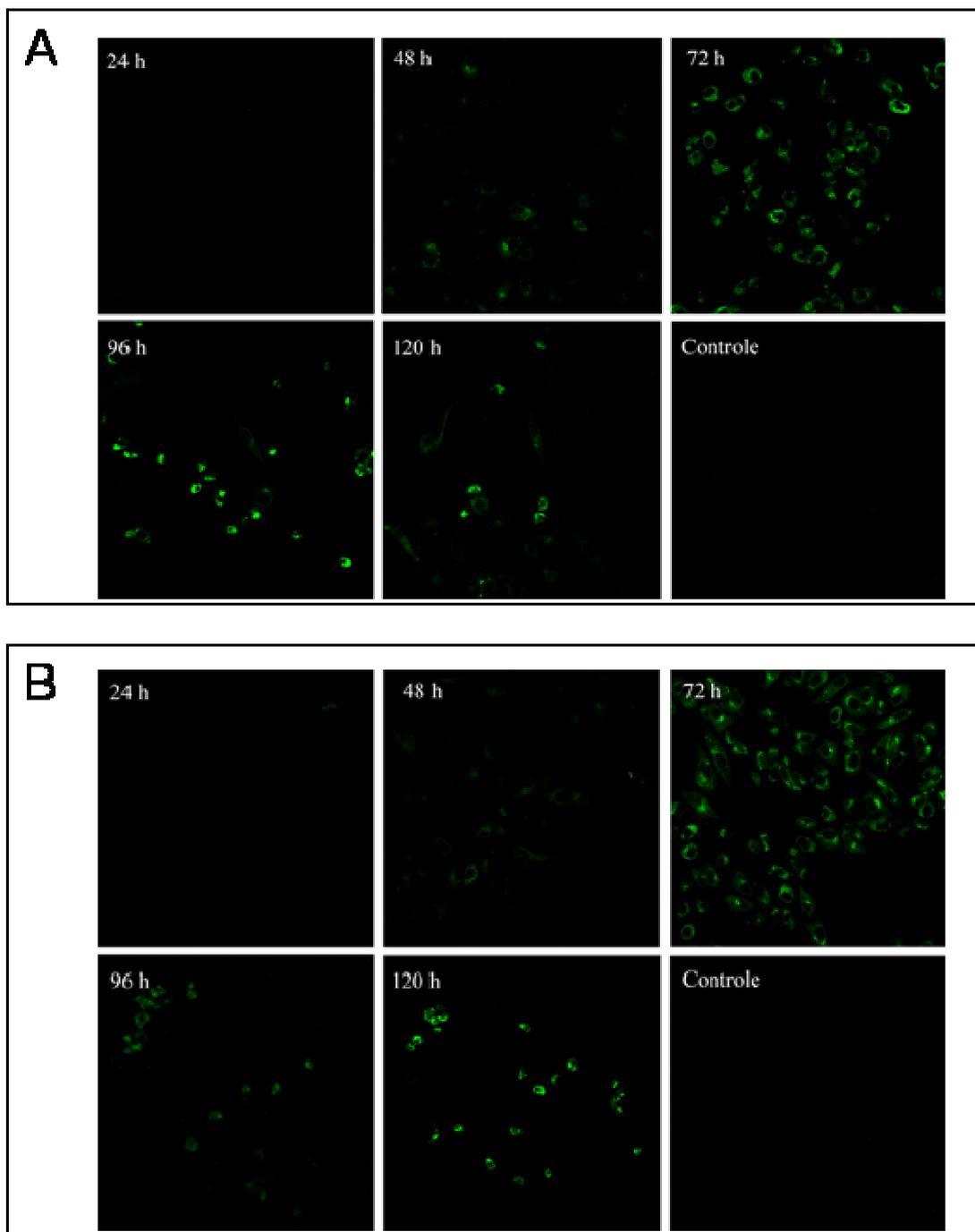


Figura 4.15: Cinética de expressão de EGFP por microscopia confocal. Células Vero foram infectadas com os vírus recombinante FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 (A) e FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun (B) e fixadas em intervalos de 24h até o tempo de 120h p.i. Como controle utilizamos o vírus FA 17D/G1/2-T3.

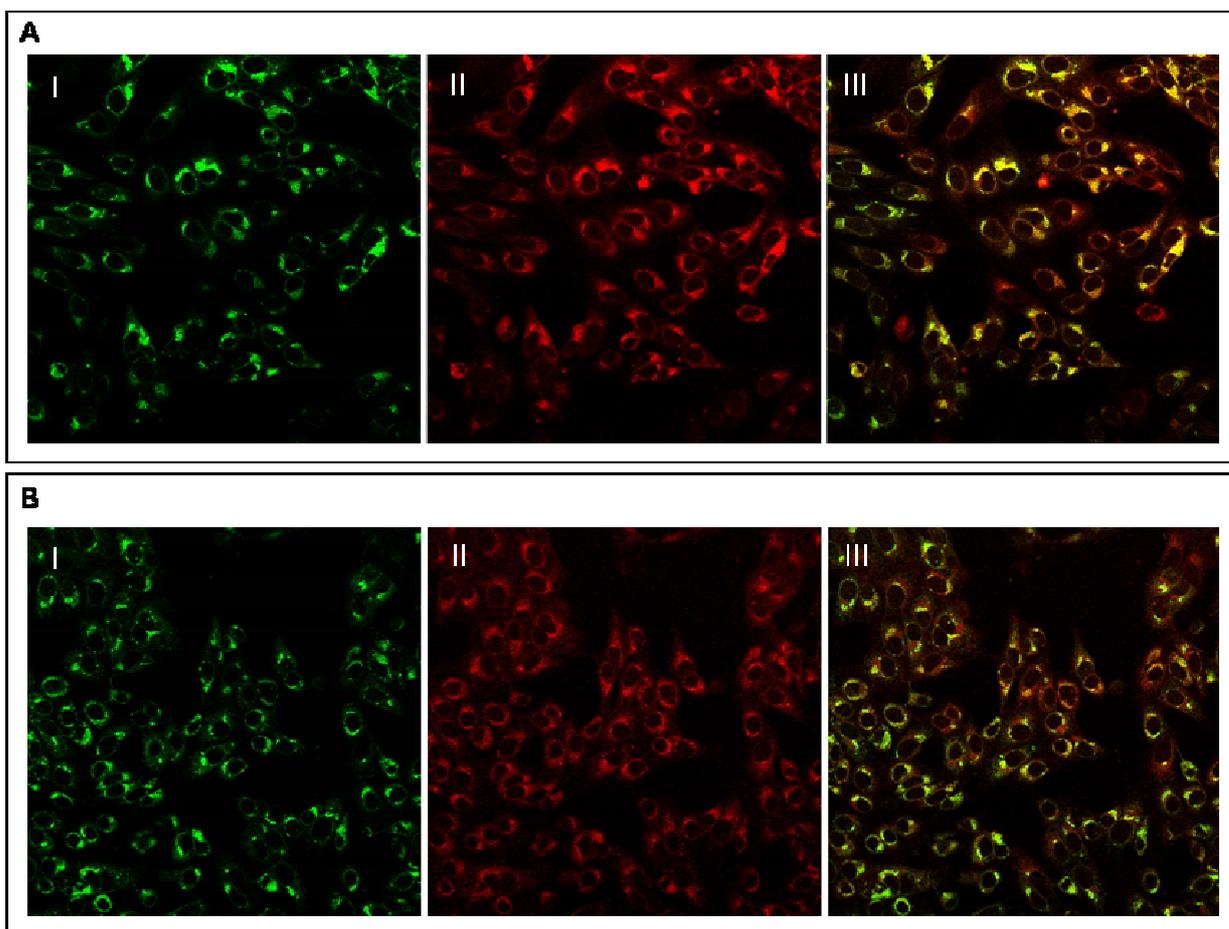


Figura 4.16: Localização da EGFP no Retículo Endoplasmático. Monocamadas de células Vero foram infectadas com os vírus recombinantes FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 (A) e FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun (B). As células foram fixadas, coradas com o marcador de Retículo Endoplasmático ER-Tracker Red. Em (I), visualização de células com acúmulo de EGFP (fluorescência verde); em (II), visualização do RE corado com ER-Tracker Red (fluorescência vermelha); em (III), co-localização EGFP/RE.

4.2.4. Estudo da estabilidade genética dos vírus recombinantes

Para avaliar a estabilidade genética dos vírus recombinantes expressando EGFP, estes foram submetidos a duas séries de passagens consecutivas independentes (P1 e P2) em monocamadas de células Vero a partir do estoque viral (2P). A coleta da suspensão viral de uma dada passagem foi realizada em 72 h p.i., quando se avaliou o título viral e valor de MOI da próxima passagem (Tabela 5.4). Os valores de M.O.I. variam entre 0,00004 e 0,07, para o vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4, e entre 0,001 e 0,045, para o vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun. Nas passagens 5P1, 5P2, 13P1 e 13P2 do vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 e nas passagens 13P1 e 13P2 do vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun, a M.O.I.

foi novamente ajustada para 0,02 em função da variação de valor de M.O.I. encontrado nas referidas passagens.

A estabilidade ao longo das diferentes passagens seriadas pôde ser estudada por meio das técnicas de RT-PCR e sequenciamento nucleotídico, com as quais avaliamos a presença e integridade gênica das inserções. A citometria de fluxo foi também empregada como uma técnica confirmatória dos resultados encontrados por meio das duas análises iniciais.

Tabela 4.4: Passagens seriadas independentes dos vírus recombinantes FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 e FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun. Valores dos títulos virais e de M.O.I. encontrados.

	FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4		FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun	
Passagem	Título (Log 10 PFU/mL)	M.O.I.	Título (Log 10 PFU/mL)	M.O.I.
2P	1,50E+06	0,02	18,1E+06	0,02
3P1	2,15E+06	0,028	1,42E+06	0,001
4P1	8,97E+06	0,11	9,00E+06	0,009
5P1	11,5E+06	0,15	1,16E+06	0,012
6P1	3,05E+06	0,0052	4,60E+06	0,0048
7P1	8,50E+06	0,014	4,17E+06	0,0044
8P1	6,40E+06	0,0108	5,37E+06	0,0056
9P1	4,20E+06	0,007	2,70E+06	0,0028
10P1	7,20E+06	0,012	4,20E+06	0,0044
11P1	16,0E+06	0,027	4,45E+06	0,0047
12P1	0,277E+06	0,0047	0,0202E+06	0,00214
13P1	6,55E+06	0,011	2,42E+06	0,00256
14P1	11,0E+06	0,031	5,95E+06	0,028
15P1	18,5E+06	0,06	3,55E+06	0,017
16P1	21,5E+06	0,07	7,92E+06	0,038
17P1	2,67E+06	0,0094	3,02E+06	0,014
18P1	18,0E+06	0,063	8,00E+06	0,038
19P1	12,7E+06	0,044	5,22E+06	0,025
20P1	16,5E+06	0,058	9,46E+06	0,045
3P2	3,12E+06	0,041	1,90E+06	0,002
4P2	9,50E+06	0,12	8,35E+06	0,008
5P2	14,2E+06	0,18	6,10E+06	0,006
6P2	3,90E+06	0,0055	4,70E+06	0,005
7P2	6,02E+06	0,0084	5,52E+06	0,0058
8P2	6,00E+06	0,0084	5,47E+06	0,0058
9P2	3,20E+06	0,0045	4,65E+06	0,0049
10P2	5,95E+06	0,008	5,70E+06	0,006
11P2	5,80E+06	0,008	5,25E+06	0,0055
12P2	0,0340E+06	0,00004	0,0537E+06	0,00568
13P2	2,22E+06	0,0076	3,27E+06	0,0034
14P2	14,0E+06	0,049	6,73E+06	0,023
15P2	3,37E+06	0,011	4,02E+06	0,014
16P2	11,0E+06	0,038	8,05E+06	0,038
17P2	1,46E+06	0,005	3,42E+06	0,012
18P2	7,60E+06	0,026	10,3E+06	0,036
19P2	6,17E+06	0,021	8,97E+06	0,031
20P2	6,92E+06	0,024	10,5E+06	0,037

4.2.4.1. Vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4

4.2.4.1.1. Análise por RT-PCR e sequenciamento

O vírus recombinante FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 foi submetido a duas séries de passagens consecutivas independentes até a 20ª passagem e foi analisado por RT-PCR nas passagens 2P (estoque viral), 5P1 e 5P2, 10P1 e 10P2, 15P1 e 15P2, 20P1 e 20P2. Conforme já descrito, a presença de um fragmento de aproximadamente 2000 pb indica a manutenção das inserções heterólogas no genoma viral enquanto que a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1000 pb indica a perda destas pelos vírus.

Pôde-se observar uma banda única de 2010 pb, correspondente a fragmentos contendo a plataforma de expressão de EGFP, nas passagens 5P1 e 5P2 deste vírus, assim como na 2P, já avaliada anteriormente. O perfil de amplificação foi homogêneo uma vez que não foram observadas bandas referentes a outros fragmentos, a presença e integridade da plataforma foram confirmadas após o sequenciamento nucleotídico. Entretanto, a passagem 10P1 apresenta majoritariamente a banda de aproximadamente 1000 pb, que indica perda da inserção nesta passagem, e isto se confirma em 15P1, uma vez que a banda de aproximadamente 1000 pb se torna única na reação (Figura 4.18). A perda de grande parte da inserção heteróloga nestas passagens foi confirmada com o sequenciamento nucleotídico, onde identificamos a manutenção de uma pequena porção que compreende o 1º códon de NS1 seguidos dos 8 últimos códons de TM2 da HA Den4 (Figura 4.17). Na passagem 10P2, podemos observar um produto de reação heterogêneo, com uma banda de 2010 pb predominante e outra de menor peso molecular de aproximadamente 1300 pb, indicando perda parcial da inserção heteróloga. O sequenciamento nucleotídico deste produto de reação apresentou a seqüência majoritária de 2010 pb onde a integridade da inserção foi visualizada. Em 15P2, o produto de reação se mantém heterogêneo, onde podemos observar um aumento de intensidade da banda de aproximadamente 1300 pb e uma diminuição da intensidade da banda de 2010 pb, quando comparadas com as da passagem 10P2, além do aparecimento de uma banda de aproximadamente 3000 pb. O perfil de bandeamento em 15P parece que se mantém até 20P (Figura 4.18). O sequenciamento nucleotídico destas passagens demonstrou uma mistura de seqüências que representa mistura de populações virais.

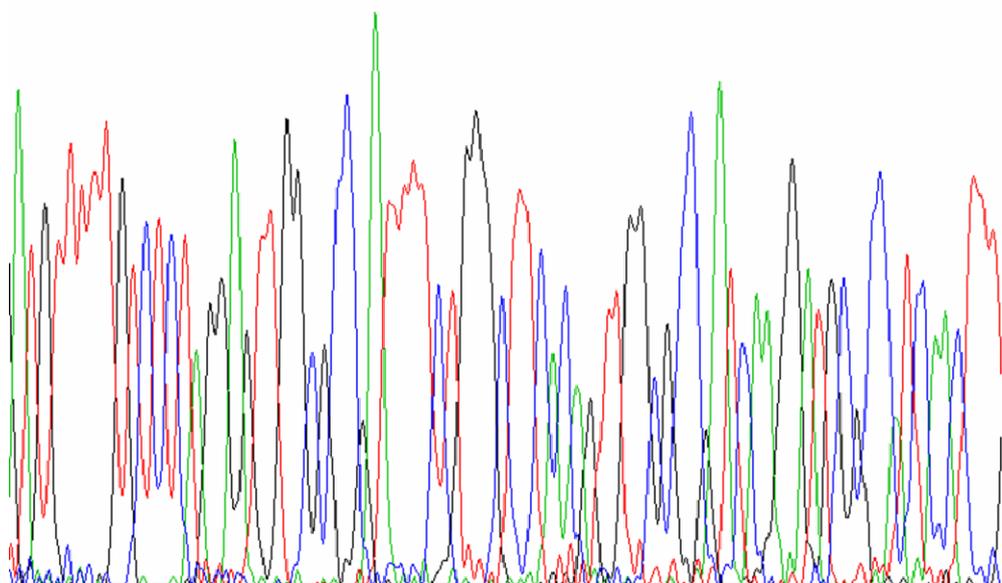
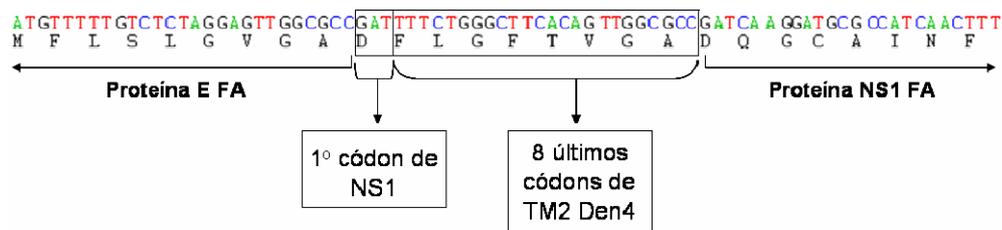


Figura 4.17: Cromatograma representativo da perda de parte da inserção heteróloga em 10P1 do vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4. Estão identificadas a região intergênica de inserção (E/NS1) e a porção da inserção heteróloga que foi mantida nesta passagem (1º códon de NS1 seguidos dos 8 últimos códons de TM2 da HA Den4).

4.2.4.1.2. Análise por citometria de fluxo

A análise de estabilidade genética do vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 por citometria de fluxo foi realizada em paralelo nas mesmas passagens seriadas, isto é 2P (estoque viral), 5P1 e 5P2, 10P1 e 10P2, 15P1 e 15P2, 20P1 e 20P2 (Figura 5.17). A estabilidade foi avaliada pela porcentagem de células com acúmulo do EGFP dentre a população total de células adquiridas.

Podemos observar que uma grande parte das células utilizadas para a realização das passagens 5P1 e 5P2 do vírus (77,59 % e 76,35 %) expressava EGFP e estes valores foram semelhantes ao do estoque viral 2P (79,53 %). No entanto, em 10P1 houve uma diminuição para 3,97 % do número de células expressando a proteína, o que indica a perda da inserção heteróloga por quase toda a população viral, nesta passagem, confirmando o perfil obtido no

experimento de RT-PCR, onde quase não se pôde mais visualizar a banda de aproximadamente 2000 pb. Por outro lado, na passagem viral 10P2, a porcentagem de células expressando a proteína apresentou uma pequena queda para 74,43 %, com relação ao estoque viral 2P, mas ainda se manteve alta, indicando que a maior parte da população viral ainda mantinha a inserção heteróloga. Em 15P2, pudemos observar uma diminuição acentuada na porcentagem de células expressando EGFP, chegando a 16,05 %, que é ainda mais acentuada na passagem 20P2 (1,05%), indicando perda da inserção heteróloga por quase toda população até 20P2. Estes resultados confirmaram aqueles obtidos por RT-PCR em que ocorreu uma visível diminuição gradativa da intensidade do fragmento de aproximadamente 2000 pb entre 10P2 e 20P2 (Figura 4.18).

4.2.4.2. FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun

4.2.4.2.1. Análise por RT-PCR e sequenciamento

O vírus recombinante FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun foi igualmente submetido até a 20ª passagem seriada e analisado por RT-PCR nas passagens 2P (estoque viral), 5P1 e 5P2, 10P1 e 10P2, 15P1 e 15P2, 20P1 e 20P2.

Pudemos observar que em ambas as passagens independentes 5P e 10P, foram amplificados fragmentos únicos de 1920 pb que indicou a manutenção da inserção no genoma do vírus até estas passagens. O perfil de reação foi igualmente homogêneo, uma vez que não pudemos observar fragmentos secundários de amplificação e, a integridade da inserção foi confirmada após o sequenciamento nucleotídico. Em 15P1 e 15P2 começamos a observar produtos de reação heterogêneos, apresentando bandas de diferentes pesos moleculares, juntamente com a banda majoritária de 1920 pb que contém a inserção. Além desta banda, em 15P1 pudemos observar duas bandas de aproximadamente 4000 pb e 1500 pb e, em 15 P2, bandas de aproximadamente 3800 pb e 1400 pb, onde as bandas de menor peso molecular seriam indicativas de perda de parte da inserção heteróloga do genoma viral. Ambas as séries independentes da 20ª passagem pareciam manter o perfil de bandeamento da 15ª passagem, apresentando a banda de 1920 pb com intensidade significativa entre os produtos de reação (Figura 4.18).

O sequenciamento nucleotídico de todas as passagens, com produto de reação heterogêneo (15P e 20P) mostrou a seqüência contendo a inserção heteróloga da qual a integridade foi confirmada.

4.2.4.2.2. Análise por citometria de fluxo

A análise de estabilidade genética do vírus FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun por citometria de fluxo foi também realizada nas passagens 2P (estoque viral), 5 P1 e 5P2, 10 P1 e 10 P2, 15 P1 e 15 P2, 20 P1 e 20 P2.

Observamos que, nas passagens 5P1 e 5P2 e 10P1 e 10P2, a porcentagem de células expressando EGFP mantém-se elevada (79,16 %, 79,88 %, 75,33 % e 77,03 %, respectivamente) e semelhante à encontrada com o estoque viral (74,49 %), indicando manutenção da inserção heteróloga na população viral até estas passagens. A partir de 15P1 e 15P2 ocorre uma pequena queda nestas porcentagens (57,86 % e 60,91 %, respectivamente), mantendo-se até as passagens 20P1 e 20P2 (55,57 % e 55,85 %, respectivamente). Isto poderia revelar a presença de uma população mista de vírus (vírus com e sem o inserto heterólogo), sendo que a inserção heteróloga se mantinha em uma grande parte da população viral (Figura 4.18).

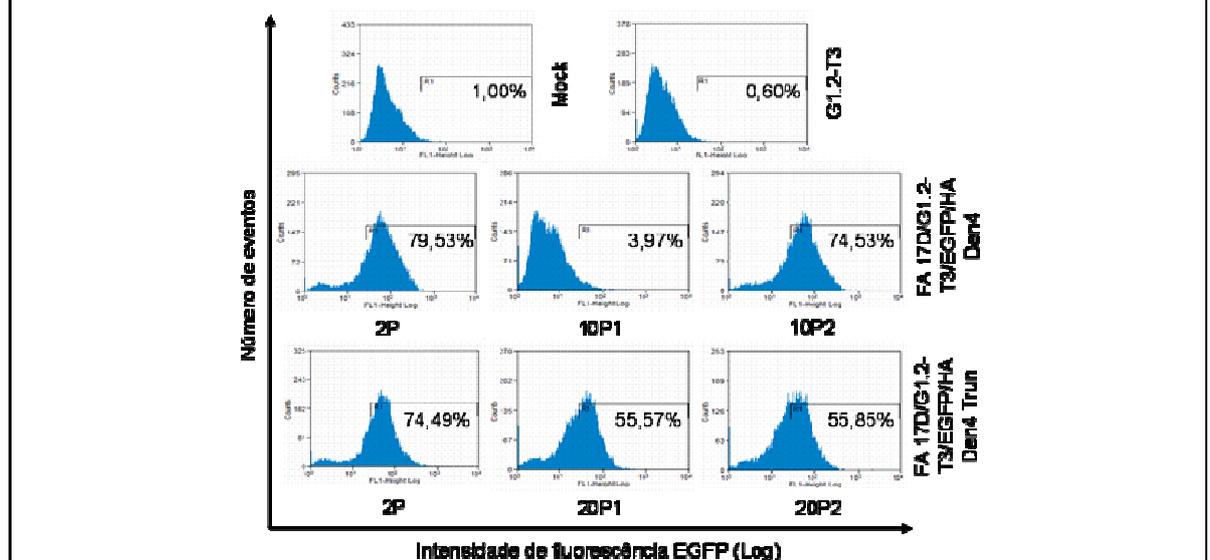
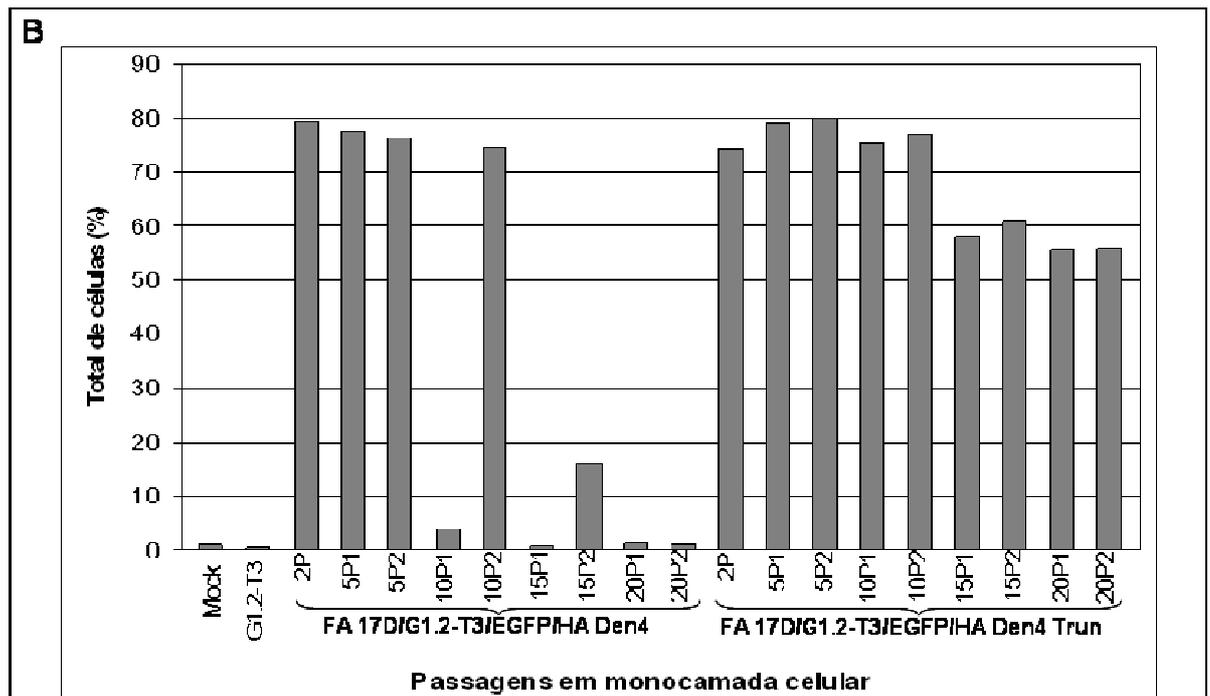
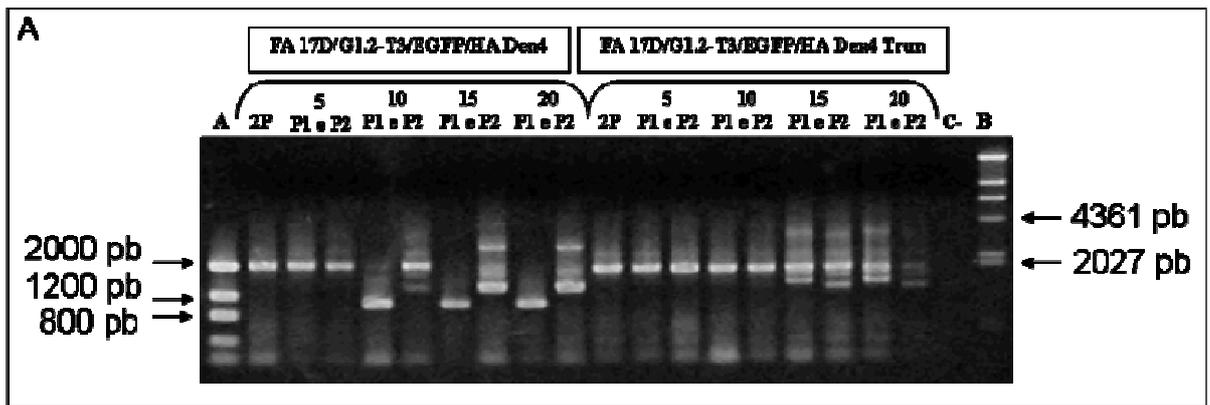


Figura 4.18: Estudo da estabilidade genética dos vírus recombinantes FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 e FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun submetidos a passagens seriadas em monocamada de células Vero. (A) Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% de RT-PCR das passagens seriadas dos vírus recombinantes em monocamadas celulares. Os marcadores de peso molecular utilizados foram Low Mass (A) e λ Hind III (B). (B) Análise da estabilidade genética por citometria de fluxo de células Vero infectadas com os vírus recombinantes em 72h p.i. quando a detecção da fluorescência de EGFP acumulada nas células foi realizada. Como controle, utilizamos células infectadas com o vírus parental FA 17D/G1/2-T3 e células não infectadas (Mock). Os resultados foram expressos como a porcentagem de células expressando EGFP no total de células adquiridas.

5. Discussão

O vírus vacinal Febre Amarela 17D, devido às suas características, tem sido utilizado com o vetor de expressão de epítomos ou proteínas exógenas para fins de desenvolvimento de novas tecnologias em vacinas. No entanto, por ser pequeno e compacto, o genoma de Flavivírus não é facilmente susceptível a tais modificações, pois estas podem ter um efeito deletério no processamento da poliproteína precursora, na função das proteínas virais, e na replicação do RNA, que levam a inviabilidade do vírus. Dessa forma, a realização de alterações no genoma dos vírus deste grupo, requer a consideração dos elementos e etapas envolvidas no seu processo de proliferação, de maneira que estas alterações exerçam a menor perturbação possível durante este processo.

Resumidamente, o processamento da poliproteína viral começa durante a tradução e ocorre em associação com a membrana do RE, atravessando-a por vários pontos. A poliproteína sofre clivagens por peptidases sinal celulares, em sítios voltados para o citoplasma celular, e pela protease viral NS2B/NS3, naqueles voltados para o lúmen do RE. Este processamento provoca a individualização/maturação das proteínas envolvidas na replicação, processamento da poliproteína e montagem das partículas virais (Chambers et al., 1990a).

A estratégia de inserção de seqüências exógenas no genoma do vírus Febre Amarela (FA), utilizada nesta dissertação, foi desenvolvida por Bonaldo *et al* (2007) e consistiu na inserção do gene que codifica EGFP de *Aequoria victoria*, na região entre os genes E/NS1 deste vírus. Esta região consiste de uma transição funcional entre genes estruturais e não-estruturais (Lindenbach et al., 2006) e, por isso, a inserção de seqüências exógenas nesta poderia provocar um menor distúrbio no ciclo proliferativo do vírus, quando comparada a outras regiões do genoma. Além disso, a inserção do gene da EGFP nesta região foi realizada respeitando os motivos importantes para o ideal processamento e secreção da poliproteína para o RE, bem como, da proteína heteróloga inserida. Dessa forma, a plataforma de inserção de EGFP foi elaborada de forma que a proteína estivesse fusionada aos 9 primeiros aminoácidos da proteína NS1, em sua porção N-terminal e, à região Haste-âncora da proteína E de FA, que contém o sinal de translocação para NS1 e o sítio para a peptidase sinal celular, em sua porção C-terminal. Com a inserção destes motivos flanqueando a proteína heteróloga, fica assegurado o processamento correto da proteína E e da NS1 do vírus vetor. Um outro vírus foi também construído por este grupo de pesquisa e difere do primeiro, na plataforma de inserção de EGFP por conter apenas parte da região HA FA, de onde foram omitidos os elementos H1 e CS (Mello, 2007). Esta construção foi realizada alternativamente, pois a

deleção destas porções da HA, poderia resultar em um efeito diferenciado sobre o ciclo de proliferação do vírus recombinante resultante, quando comparado àquele contendo a região HA completa. Estes vírus foram caracterizados quanto à capacidade de replicação e imunogenicidade em comparação ao vírus vacinal FA 17DD e quanto à expressão da inserção heteróloga e estabilidade de sua seqüência codante no genoma viral. A partir dos resultados obtidos nestes trabalhos, surgiu a necessidade de aprimoramento da estratégia, no que diz respeito à estabilidade das inserções heterólogas no genoma viral. Nestes trabalhos, foram observados fragmentos artefatuais em reações de RT-PCR, desde passagens iniciais de ambos vírus, que poderiam estar sendo provocados por um pareamento entre as seqüências complementares da HA natural do vírus FA e da seqüência HA FA fusionada no 3'-terminal do gene EGFP. Assim, estas reações, além dos fragmentos esperados de 2000 pb que continham a inserção, geraram também fragmentos de peso molecular menor ou maior que este. Esta observação sugeriu a possibilidade de ocorrência de um fenômeno parecido, durante a replicação dos vírus recombinantes devido à presença das seqüências HA FA idênticas e duplicadas no genoma dos vírus, construídos por Bonaldo e colaboradores (2007) e Mello (2007). Sabe-se que o RNA viral é sintetizado de forma semi-conservativa, utilizando um intermediário dupla-fita como forma replicativa (Chu e Westaway, 1985; Westaway et al., 1999) e, dessa forma, seria possível o pareamento das seqüências complementares HA FA duplicadas à semelhança do que ocorreu nas reações de PCR descritas acima. Dentre outras possibilidades, estariam sendo geradas variantes virais sem a inserção heteróloga que, ao longo das passagens em cultura de células, se sobreporiam às populações sem o inserto. Esta sobreposição ocorreria em função da pressão seletiva que acaba favorecendo variantes sem inserção que, por se aproximarem do fenótipo tipo vacinal, apresentariam taxas de multiplicação superiores àquelas apresentadas pelos vírus que ainda carregam a inserção.

Diante disso, propomos nesta dissertação uma variação na estratégia desenvolvida por Bonaldo e colaboradores (2007) que difere da anterior pela substituição da HA duplicada de FA pela região homóloga de outro flavivírus, tendo como objetivo o aprimoramento da estabilidade das inserções heterólogas no genoma viral. Um segundo vírus contendo parte desta HA (sem os elementos H1 e CS) foi também construído com a finalidade de diminuir a identidade entre a seqüência HA fusionada no 3'-terminal do gene EGFP e a seqüência da HA natural do vírus FA, como forma de dificultar aqueles possíveis pareamentos que levariam a perda da proteína heteróloga. Além disso, uma outra alteração realizada foi a utilização da variante plasmidial pG1/2 na construção destes vírus recombinantes em vez da variante pE200, utilizada na construção daquela primeira geração de vírus (Bonaldo et al., 2007;

Mello, 2007). Estas duas variantes plasmidiais fazem parte do sistema de clones infecciosos de FA e duas das diferenças que possuem entre si, são as modificações genéticas realizadas no pE200 que correspondem às posições 1568 e 1571 do genoma viral, levando à mudança dos aminoácidos E199D e T200I na proteína E (Bonaldo et al., 2002). Os vírus construídos com o pE200 têm um perfil menos replicativo, além de induzirem uma produção de anticorpos neutralizantes menor em relação ao vírus vacinal FA 17DD (Bonaldo et al., 2007), o que pode ter sido provocado por tais modificações. A substituição para a variante pG1/2, que não possui estas modificações, poderia proporcionar aos vírus recombinantes um caráter mais próximo ao do vacinal FA 17DD, o que seria interessante para a proposta de um protótipo vacinal.

Quando alinhamos as seqüências da HA completa e parcial de Dengue 4 com as homólogas de FA observamos que houve uma redução considerável de identidade (58%) e, dessa forma, estas seqüências foram utilizadas neste trabalho para a construção das plataformas de inserção. Os genomas de RNA recombinantes, contendo as seqüências de HA Den4 em sua versão completa ou truncada, foram criados e ambos geraram vírus viáveis, reforçando novamente a validade desta estratégia na geração de vírus recombinantes por inserção na região intergênica E/NS1. Além disso, a semelhança nas características proliferativas dos vírus recombinantes entre si indicou que o encurtamento da HA Den4 na plataforma de expressão não teve efeito sobre a proliferação viral. Apesar de terem apresentado perfis de proliferação semelhantes ao do parental, estes vírus recombinantes mostraram títulos menores em alguns pontos cinéticos em cultura celular. Isto indica que a inserção heteróloga exerce certo efeito deletério sobre a viabilidade do vírus, refletindo-se na sua menor capacidade de proliferação.

Aparentemente, a mudança para o uso de pG1/2, na construção da plataforma viral, refletiu-se nas características proliferativas dos vírus recombinantes em comparação com os vírus construídos por Bonaldo *et al* (2007) e Mello (2007). Os novos vírus recombinantes atingiram picos de proliferação com títulos semelhantes, variando entre 6,15 e 6,51 Log₁₀ PFU/mL, porém, os picos atingidos pelos novos vírus ocorreram mais precocemente (48h) quando comparados com os vírus da primeira geração (96h). No entanto, este caráter aparentemente mais proliferativo dos vírus derivados de pG1/2 seria mais bem avaliado, comparando-se os resultados de experimentos simultâneos com os vírus derivados de pE200 e pG1/2. É possível que estas diferenças de proliferação possam também se refletir em diferenças de atenuação e imunogenicidade destes vírus, e estes parâmetros deverão ser ainda avaliados.

Uma característica em comum entre todos os vírus construídos pela estratégia de Bonaldo e colaboradores (2007) é a apresentação de taxas de multiplicação menores em comparação com o vírus vacinal FA 17DD, o que, mais uma vez, indica o efeito da inserção heteróloga sobre a viabilidade do vírus. Apesar de observamos que os vírus recombinantes construídos neste trabalho atingiram picos de multiplicação em tempos mais precoces que o vacinal (48h, para os recombinantes e 72h, para o vacinal), estes apresentaram uma capacidade proliferativa inferior, com títulos menores na maior parte do tempo. No entanto, estas diferenças não foram impeditivas para a utilização destes vírus recombinantes nos demais estudos realizados neste trabalho, assim como, com relação ao seu potencial de utilização na produção em larga escala para fins de vacinação.

Os vírus construídos neste trabalho foram capazes de mediar a expressão da proteína heteróloga EGFP, cuja expressão pode ser detectada pela sua propriedade de autofluorescência. O ponto máximo de detecção da fluorescência da proteína recombinante por microscopia de fluorescência foi em 72h p.i. para todos os vírus construídos, até o momento. O emprego de um método mais quantitativo, a análise por citometria de fluxo, discriminou diferenças nos picos de expressão da EGFP, que foram 72 h para os vírus obtidos aqui e 96 h para os vírus descritos por Bonaldo et al (2007) e Mello (2007). Assim, podemos concluir que a detecção máxima de EGFP está relacionada ao momento em que ocorrem altas taxas de produção de partículas virais, refletindo um momento da infecção viral de grande síntese das proteínas codificadas pelo genoma viral.

A visualização da expressão de EGFP por citometria de fluxo só foi possível até 72h p.i., uma vez que o CPE nas células foi demasiadamente intenso em tempos posteriores de infecção pelos vírus recombinantes construídos aqui, o que impossibilitou o recolhimento destas para a realização do estudo nos tempos subseqüentes. O mesmo não ocorreu no estudo com a primeira geração de vírus (FA17D/Esa/5.1 glic e FA17D/Esa trun/4 glic), uma vez que foi possível sua realização em tempos posteriores à 72h p.i. (Bonaldo et al., 2007 e Mello, 2007), o que demonstra uma menor morte celular induzida pelos vírus derivados de pE200 do que pelos derivados do pG1/2. Estes fenômenos podem estar relacionados às diferenças replicativas entre estes vírus e apontam, novamente, para um ganho na capacidade proliferativa das novas plataformas virais.

Uma outra característica apresentada pela estratégia de inserção de Bonaldo e colaboradores (2007), foi a retenção da proteína heteróloga no interior da célula, uma vez que não foi possível sua detecção no sobrenadante de cultura celular e sim no interior do Retículo Endoplasmático. Esta característica foi também observada em relação aos vírus construídos

nesta dissertação, embora não tenham sido realizados estudos sobre a localização da proteína heteróloga em outras organelas celulares, nem estudos para detecção no sobrenadante de cultura celular. Este fenômeno de retenção já era esperado, devido às semelhanças funcionais das regiões HA de flavivírus que podem estar relacionadas com a retenção de proteínas no RE (Op de Beeck et al., 2004). Diante disso, seria interessante avaliar se este acúmulo poderia estar aumentando os níveis de apoptose nas células infectadas, uma vez que já foi demonstrado que o acúmulo de proteínas provoca um estresse do RE induzindo as células ao processo de apoptose (Ron e Walter, 2007; Yu *et al.*, 2006).

Além da expressão da proteína, a estabilidade genética nos vírus recombinantes, ou seja, a manutenção da inserção heteróloga no genoma ao longo das passagens virais, é de grande importância para o desenvolvimento de vacinas virais expressando antígenos de outros patógenos. Esta importância é devido à necessidade de manutenção da expressão do antígeno para que a resposta imune dirigida a ele seja estabelecida no organismo hospedeiro. É por este motivo que o estudo da estabilidade genética é um caráter muito importante a ser avaliado durante o desenvolvimento de vírus vetores com potencial vacinal.

Em nosso laboratório, os estudos de estabilidade genética de vírus com inserções heterólogas são usualmente realizados por meio da passagem seriada dos vírus em monocamadas celulares em baixa MOI (0,02). A utilização de um valor de MOI baixo, levaria os vírus a realizarem um maior número de replicações, facilitando assim, eventos de recombinação que poderiam levar a perda da inserção heteróloga do genoma viral. Dessa forma, uma situação de manutenção de inserções heterólogas no genoma viral, apesar da baixa MOI, representa uma boa estabilidade genética destas ao longo das passagens virais. Além disso, a utilização de uma baixa MOI está mais de acordo com a condição utilizada para a produção de lotes vacinais.

A primeira geração de vírus, construídos por Bonaldo e colaboradores (2007) e Mello (2007) apresentaram estabilidade do inserto nos genomas virais até a 10^a e 5^a passagens em cultura celular, para os vírus contendo a HA FA completa e truncada, respectivamente. No entanto, quando a plataforma de expressão de EGFP fusionada à HA FA completa foi inserida num vírus FA quimérico (obtido pela substituição das proteínas prM/E pelas proteínas homólogas do vírus Dengue 4), foi observada a manutenção da inserção até a 20^a passagem em cultura celular (Bonaldo et al., 2007). Este resultado corroborou para a hipótese de que o aumento da estabilidade da inserção no genoma recombinante poderia ser obtido com a diminuição da identidade entre as seqüências HA duplicadas, que neste caso foi de 58%. Um dos efeitos na diminuição da identidade seqüencial refletiu-se nos produtos obtidos de reações

de RT-PCR a partir de amostras do RNA viral, nos quais não foi possível observar artefatos de reação (Bonaldo *et al.*, 2007), diferentemente dos vírus FA contendo as seqüências idênticas HA FA duplicadas, como já mencionado.

Os vírus recombinantes construídos nesta dissertação foram, da mesma forma, submetidos a estudos de estabilidade genética. Utilizamos a técnica de citometria de fluxo como comprobatória para os resultados de RT-PCR, e nossa intenção era a de relacionarmos o total de células contendo EGFP em relação àquelas células infectadas que continham antígenos virais. Com este tipo de análise seria possível a determinação da estabilidade genética da inserção no genoma viral, em função da percentagem de células positivas para EGFP em relação ao total de células positivas para os antígenos virais, como realizado por Bonaldo e colaboradores (2007). Assim, uma relação constante ao longo das passagens seriadas sugere a manutenção do gene EGFP pelos vírus e, ao contrário, um aumento de células FA positivas em relação as duplo marcadas, indica a perda da inserção heteróloga, com a diminuição da expressão da EGFP. Entretanto, não foi possível a detecção dos antígenos virais devido a problemas técnicos e, dessa forma, a confirmação da estabilidade genética por citometria foi realizada, nesta dissertação, por meio da quantificação da autofluorescência de EGFP no total de células analisadas. Apesar disso, consideramos que os dados de citometria de fluxo foram satisfatórios, pois foi possível observar uma correspondência entre a detecção por RT-PCR do produto de 2000 pb, contendo o cassete de expressão, e as respectivas porcentagens de células expressando EGFP. Isto pôde ser muito bem evidenciado quando, em determinadas passagens virais, começava a ocorrer o desaparecimento da banda de 2000 pb com o aparecimento de fragmentos menores, indicativos de perda total ou parcial do gene heterólogo, paralelamente ao evento de redução no percentual de células fluorescentes.

Em algumas passagens, além de fragmentos de peso molecular menores, também puderam ser detectados fragmentos de pesos moleculares maiores que 2000 pb, e estes podem representar uma extensão da seqüência provocada por eventos de recombinação no genoma viral. A presença destes diferentes fragmentos indica que estas populações virais podem possuir ainda partes da proteína heteróloga ou mesmo duplicações destas. Estas seqüências podem ser identificadas por seqüenciamento nucleotídico, entretanto, não pudemos caracterizá-las durante esta dissertação. Além disso, seria interessante isolar espécimes virais destes tipos, para avaliação das modificações geradas nos genomas virais recombinantes. Caso os fragmentos maiores tenham sido gerados por recombinação gênica, esta avaliação

seria ainda mais interessante, uma vez que vírus viáveis estariam sendo gerados com estas inserções maiores.

Quando comparamos os vírus descritos por Bonaldo e colaboradores (2007) e Mello (2007), observamos que o vírus construído com a plataforma de expressão contendo a versão HA FA completa apresentou maior estabilidade da inserção do que aquele que continha a versão truncada desta seqüência. Esta divergência de comportamento poderia ser explicada pela diferença de aproximadamente 90 bases no tamanho entre estes segmentos associados ao gene EGFP. O fragmento truncado teria uma maior facilidade de pareamento com a sua região complementar no gene E do vírus vetor, do que o fragmento completo teria com sua região complementar no mesmo gene, devido às diferenças de extensão de pareamento. Assim, os vírus contendo a HA FA truncada estariam mais sujeitos à formação de variantes virais sem inserção, provocadas pelo pareamento das seqüências 100% complementares duplicadas no genoma recombinante.

No entanto, quando comparamos o vírus contendo a HA FA truncada (Mello, 2007), com a nova versão contendo HA truncada de Den4 (FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4 Trun), construída durante esta dissertação, observamos um incremento significativo na estabilidade genética da inserção com a HA Den4. Apesar de não termos realizado a técnica de citometria de fluxo de forma equivalente a Bonaldo e colaboradores (2007), podemos considerar que a construção viral contendo a HA Den4 truncada apresentou uma maior estabilidade genética da inserção, quando comparado com o vírus contendo a HA truncada de FA. O primeiro se mostrou relativamente estável até a 20ª passagem de ambas as séries independentes, embora houvesse uma redução na porcentagem de células expressando EGFP e a detecção de bandas secundárias por RT-PCR, indicando deleções e duplicações da seqüência exógena no genoma viral. No entanto, o segundo vírus, descrito por Mello (2007), apresentou perda total da inserção nas populações virais entre a 5ª e 10ª passagem seriada. Portanto, poderíamos dizer que a diminuição de identidade entre as seqüências duplicadas no genoma teria dificultado o pareamento da HA Den4 truncada com sua complementar homóloga, no gene E, ao contrário do que ocorreu com a primeira versão viral onde existia 100% de identidade seqüencial entre elas. Estes resultados sugerem que a diminuição de identidade entre estas seqüências duplicadas no genoma levaria a uma maior estabilidade genética das inserções heterólogas.

Da mesma forma, seria esperado um aumento na estabilidade genética do vírus construído com a plataforma de expressão que continha a HA completa de Den4 (FA 17D/G1/2-T3/EGFP/HA Den4), quando comparado ao construído por Bonaldo e colaboradores (2007), com a HA completa de FA. No entanto, o que observamos foi um

desempenho similar entre estes vírus uma vez que ambos mantiveram a inserção heteróloga até a 10^a passagem. A perda da inserção por uma das séries independentes até 10^a passagem do vírus com a HA Den4, poderia indicar até mesmo uma estabilidade menor. Este comportamento foi contrário ao que esperávamos após observarmos aqueles obtidos com o vírus recombinante quimérico FA/Den4 (Bonaldo et al, 2007), que manteve a inserção até a 20^a passagem, como já mencionado. No entanto, como este vírus parece ser menos replicativo que o construído nesta dissertação (Bonaldo, M.C., comunicação pessoal), estaria menos sujeito a perda de inserção. Então, não podemos dizer que a diminuição da identidade seqüencial gerada com a substituição da HA FA pela HA Den4 fusionada a EGFP teve efeito sobre a estabilidade da inserção heteróloga, neste caso. Além disso, o nível de identidade seqüencial das versões completa e truncada da HA Den4 ficam em torno dos mesmos valores (58% e 56,6%). Portanto, estas diferenças na estabilidade genética das inserções devem ser explicadas como sendo provocadas por um evento multifatorial, que não depende unicamente da relação de identidade entre as seqüências HA duplicadas no genoma viral.

A diferença básica entre as construções contendo HA den4 completa e truncada reside na deleção de dois elementos iniciais do domínio haste, H1 e CS, portanto, o ganho em estabilidade genética da construção viral contendo HA den4 truncada poderia estar relacionado ao papel funcional destes elementos. Ao elemento CS, ainda não foram descritas funções, mas sabe-se que representa uma região altamente conservada em flavivírus, onde 8 de 17 resíduos de aminoácidos são invariáveis, indicando um importante papel funcional (Stiasny et al., 1996). O elemento H1 atua na conversão da estrutura dimérica da proteína E para sua estrutura homotrimérica, provocada pela acidificação da vesícula endossomal durante o processo de fusão da membrana viral com membrana da vesícula (Allison et al., 1999; Zhang et al., 2003). Além disso, exerce a função de sustentação e estabilização da proteína E em relação à membrana do RE ou da membrana do envelope viral (Zhang *et al.*, 2003). Ainda não foi descrito na literatura se estes elementos poderiam ter algum papel na etapa de montagem da partícula viral dentro do RE. No entanto, é cabível imaginar que um acúmulo destas porções no ambiente luminal do RE, como ocorre no nosso sistema de expressão, poderia estar forçando interações e provocando algum efeito perturbador que dificultasse a montagem da partícula. Ao contrário, com a exclusão destes elementos da plataforma de inserção, o acúmulo destas porções não ocorre no RE e, talvez por isso, o vírus que possui a HA Den4 truncada, construído nesta dissertação, teria apresentado um desempenho melhor de estabilidade quando comparado com o vírus que possui esta região completa. Dessa maneira, o fato de o vírus FA contendo HA Den4 truncada ter sido notavelmente mais estável que a

versão truncada da HA FA, descrita por Mello (2007), aponta não somente para a vantagem da diminuição da identidade entre as seqüências duplicadas homólogas HA, mas também para a ausência dos elementos H1 e CS.

Em comparação com o material disponível na literatura científica até o momento, a estratégia desenvolvida por Bonaldo *et al.*, (2007), e aprimorada aqui, ainda representa a melhor estratégia de inserção de seqüências no genoma viral para expressão de proteínas heterólogas no que diz respeito à estabilidade. Uma estratégia parecida foi desenvolvida por Bredenbeek e colaboradores (2006), como já citado nesta dissertação, uma vez que aborda a inserção de seqüências exógenas na mesma região elegida pelo nosso grupo. No entanto, esta compreende a apenas fusão da região TM2 da HA FA na porção C-terminal da proteína heteróloga (proteína pré-GPC de Lassa vírus). No entanto, este trabalho não reporta formalmente dados sobre a estabilidade desta inserção (Bredenbeek *et al.*, 2006).

Como apontado anteriormente, a estabilidade das inserções heterólogas no genoma é um fator de muita importância quando se trata da utilização de vírus vetores em imunização e nesta dissertação trabalhamos neste sentido. Nosso trabalho, portanto, nos permitiu concluir que o aprimoramento da estabilidade genética com a diminuição da identidade entre as seqüências duplicadas no genoma recombinante foi possível no caso do vírus que continha a HA Den4 truncada na plataforma de expressão. No entanto, estudos realizados em nosso laboratório apontam que a estabilidade genética das inserções é também dependente das características particulares das proteínas que estão sendo expressas pela plataforma de inserção no genoma. Esta conclusão foi possível após observarmos que a expressão do Domínio III da proteína E de Dengue 2 e 3, fusionadas a HA Den4 truncada em seu C-terminal, foi estável somente até a 5ª passagem viral (Bonaldo M.C., comunicação pessoal).

Outro ponto importante que deverá ser avaliado ainda pelo nosso grupo é se esta estratégia mostra-se também eficaz no que diz respeito à indução de resposta imune contra a proteína heteróloga expressa. Apesar deste sistema de expressão provocar a retenção da proteína heteróloga no interior do RE, foi possível a detecção de anticorpos contra EGFP em soro de camundongos inoculados com o vírus FA17D/Esa/5.1 glic (Bonaldo *et al.*, 2007) e, o mesmo fenômeno é esperado ocorrer para os vírus construídos nesta dissertação. Dessa forma, imaginamos que a expressão de proteínas de diversos patógenos, por meio desta estratégia, seria também capaz de induzir algum nível de resposta imune contra estes agentes, no entanto, estes estudos ainda precisam ser realizados. Além disso, devemos ainda avaliar se a alteração para a variante pG1/2 durante a construção destes novos vírus os tornou mais próximos do fenótipo vacinal no que diz respeito à imunogenicidade e atenuação viral. Além destes

estudos sobre o potencial de utilização em termos de desenvolvimento de vacinas FA-recombinantes, os vírus construídos aqui, graças à presença da proteína repórter EGFP, poderão ser ainda empregados no estudo de diferentes processos relacionados ao ciclo viral, como a determinação de sinais de endereçamento e estudos de tropismo tecidual viral.

6. Conclusões

- As variações sobre a estratégia desenvolvida por Bonaldo e colaboradores (2007) e utilizadas para a construção dos genomas virais recombinantes nesta dissertação permitiram a obtenção de vírus recombinantes viáveis;
- A substituição para o plasmídeo pG1/2 na construção dos vírus recombinantes desta dissertação, aparentemente, levou a um ganho na capacidade proliferativa destes vírus;
- As taxas de multiplicação dos vírus recombinantes construídos nesta dissertação foram inferiores a apresentada pelo vírus vacinal FA 17DD, representando uma característica comum aos vírus recombinantes construídos pela estratégia de inserção desenvolvida por Bonaldo e colaboradores (2007);
- Os vírus recombinantes construídos nesta dissertação expressaram eficientemente a proteína heteróloga EGFP em monocamadas de células Vero e foi possível a visualização de um acúmulo desta proteína nos compartimentos do Retículo Endoplasmático das células, representando uma característica comum aos vírus recombinantes construídos pela estratégia de inserção desenvolvida por Bonaldo e colaboradores (2007);
- A diminuição de identidade entre as seqüências Haste e Âncora duplicadas no genoma viral recombinante levou a um aumento na estabilidade genética da inserção heteróloga somente na ausência dos elementos H1 e CS do domínio Haste de Dengue 4, indicando um efeito funcional deletério destes elementos, acumulados no Retículo Endoplasmático, sobre os vírus recombinantes.

7. Referências bibliográficas

- Absler M Hematocytometer Counting. In: *Tissue Culture Methods and applications*. Kruse PF & Patterson MK (eds), New York, Academic Press. Inc. 1973; 395 – 396.
- Ackermann M, Padmanabhan R. De novo synthesis of RNA by the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase. *J Biol Chem*. 2001; 276(43):39926 – 39937.
- Allison SL, Stiasny K, Stadler K, Mandl CW, Heinz FX. Mapping of functional elements in the stem-anchor region of tick-borne encephalitis virus envelope protein E. *J Virol*. 1999; 73(7), 5605-12.
- Allison, SL, Schalich J, Stiasny K, Mandl CV, Kunz C, Heinz FX. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J Virol*. 1995; 69, 695–700.
- Ball LA. Replication Strategies of RNA Viruses. In: *Fields Virology*, 4th ed. David M. Knipe, Peter M Houley (eds), Philadelphia, Lippincott William & Wilkins. 2001; Vol I, Capítulo 5:105-118.
- Bonaldo CM, Caufour PS, Freire MS, Galler R. The yellow fever 17D vaccine virus as a vector for the expression of foreign proteins: development of new live flavivirus vaccines. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2000; 95: Suppl. I: 215-23.
- Bonaldo MC, Garrat 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; 315:873-885.
- 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 Bioph*. 2006;44:313-324.

- 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. *Viol J.* 2007; 4:115.
- Bray M e Lai C. Construction of intertypic chimeric dengue viruses by substitution of
structural protein genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88:10342-46.
- Bredenbeek PJ, Molenkamp R, Spaan WJ, Deubel V, Marianneau P, Salvato MS, *et al.* A
recombinant Yellow Fever 17D vaccine expressing Lassa virus glycoproteins. *Virology*
2006;345(2):299-304.
- Caufour PS, Motta MC, Yamamura AM, Vasquez S, Ferreira II, Jabor AV, *et al.*
Construction, characterization and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-
dengue type 2 viruses. *Virus Res.* 2001; 79(1-2), 1-14.
- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and
replication. *Annu Rev Microbiol.* 1990a; 44:649-60.
- Chambers TJ, Nestorowicz A, Amberg SM, Rice CM. Mutagenesis of the yellow fever virus
NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and
viral replication. *J Virol.* 1993;67(11):6797-6807.
- Chambers TJ, Nestorowicz A, Mason PW, Rice CM. Yellow fever/Japanese encephalitis
chimeric viruses: construction and biological properties. *J Virol.* 1999;73(4):3095-3101.
- Chambers TJ, Weir RC, Grakoui A, McCourt DW, Bazan JF, Fletterick RJ, *et al.* Evidence
that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a
serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. *Proc Natl
Acad Sci.* 1990b; 87(22):8898-8902.
- Chomczynski P, Sacchi N.. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium
thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-159.
- Chomczynski, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and
proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* 1993;15(3):532-534/536-537.

- Chu PW, Westaway EG. Replication strategy of Kunjin virus: evidence for recycling role of explicative form RNA as template in semiconservative and asymmetric replication. *Virology* 1985;140:68–79.
- Crooks, AJ, Lee JM, Easterbrook LM, Timofeev AV, Stephenson JR. The NS1 protein of tick-borne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from the host cell. *J Gen Virol.* 1994;75:3453-3460.
- De Madri AT, Porterfield JS. The flavivirus (grup B arboviruses): a cross-neutralization study. *J Gen Virol.* 1974;23:91-96.
- Falgout B, Chanock R, Lai CJ. Proper processing of Dengue vírus nonstructural glycoprotein NS1 requires N-terminus hydrophobic signal sequence and the donstream nonstructural protein NS2A. *J Virol.* 1989;63:1852-60.
- Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol.* 1991;65(5):2467-75.
- Flamand, M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA, Deubel V. Dengue-1 non structural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol.* 1999;73:6104–6110.
- Galler R and Freire MS, 2001. Vacina recombinante para vacinação contra febre amarela. Patente US 6,171,854.
- Galler R, Marchevsky RS, Caride E, Almeida LF, Yamamura AY, Jabor AV, *et al.* Attenuation and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 for rhesus monkeys. *Brazi. J Med Biol Res.* 2005;38(12),1835-1846.
- Gorbalenya AE, Donchenko AP, Koonim EV, Blinov VM. N-terminal domains of putative helicases of flaviviruses and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Research* 1989a;17:3889-3897.

- Gorbalenya AE, Koonim EV, Donchenko AP, Blinov VM.. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Research* 1989b;17:4713-4729.
- Guirakhoo F, Pugachev K, Arroyo J, Miller C, Zhang ZX, WeltzinR, *et al.* Viremia and immunogenicity in nonhuman primates of a tetravalent yellow fever-dengue chimeric vaccine: genetic reconstructions, dose adjustment, and antibody responses against wild-type dengue virus isolates. *Virology*. 2002;298(1):146-159.
- Guyatt KJ, Westaway EG, Khromykh AA.. Expression and purification of enzymatically active recombinant RNA-dependent RNA polymerase (NS5) of the flavivirus Kunjin. *J Virol Methods*. 2001;92(1):37–44.
- Harvey TJ, Liu WJ, Wang XJ, Linedale R, Jacobs M, Davidson A, *et al.* Tetracycline-inducible packaging cell line for production of flavivirus replicon particles. *J Virol*. 2004;78(1), 531-8.
- Jabor AV. Manipulação genética do vírus amarelo vacinal 17D (Dissertação de mestrado). Rio de Janeiro, RJ; IOC – FIOCRUZ; 2001.
- Jacobs, MG, Robinson PJ, Bletchly C, Mackenzie JM, Young PR. Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosylphosphatidyl-linked form that is capable of signal transduction. *FASEB J*. 2000;14:1603–1610.
- Jan LR, Yang CS, Tren TDW, Falgout B, Lai CJ. Processing of japanese encephalitis virus non-structural proteins: NS2B-NS3 complex and heterologous proteases. *J Gen Virol*. 1995;76: 573-580.
- Jones CT, Patkar CG, Kuhn RJ. Construction and applications of yellow fever virus replicons. *Virology* 2005;331:247-59.
- Khromykh AA. Replicon-based vectors of positive strand RNA viruses. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2000;2(5), 555-69.

- Lai CJ, Monath TP. Chimeric flaviviruses: novel vaccines against dengue fever, tick-borne encephalitis, and Japanese encephalitis. *Adv Virus Res.* 2003;61:469-509.
- Lindenbach BD e Rice CM. Genetic interaction of flavivirus non-structural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol.* 1999;73:4611-4621.
- Lindenbach BD, Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, editors. *Fields, Virology.* 4th ed., Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001;991-1041.
- Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: *Fields Virology.* 5th Edition. DM Knipe, PM Howley, Eds. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2006;1101-1152.
- Lindenbach, BD e Rice CM. *trans*-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *J Virol.* 1997;71:9608-9617.
- Lindenbach, BD e Rice, CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res.* 2003;59, 23–61.
- Lorenz, IC, Allison, SL, Heinz, FX, Helenius, A. Folding and dimerization of tick- borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 2002;76, 5480–5491.
- Mackenzie JM e Westaway EG. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J Virol* 2001;75:10787-99.
- Mackenzie, JM, Jones MK, Young PR. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology* 1996;220:232–240.
- Mandal CW, Heinz FX, Stockl E, Kunz C. Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses. *Virology.* 1989;173:291-301.

- Mandl CW, Allison SL, Holzmann H, *et al.* Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structures-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site. *J Virol.* 2000; 74:9601-09.
- 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;74(19), 9197-205.
- Mello SM. Clonagem e expressão da proteína EGFP na região intergênica E/NS1 da cepa vacinal 17D do vírus da Febre Amarela. (Dissertação de mestrado). Rio de Janeiro, RJ; IOC - FIOCRUZ; 2007.
- Monath TP, Guirakhoo F, Nichols R, Yoksan S, Schrader R, Murphy C, *et al.* Chimeric live, attenuated vaccine against Japanese encephalitis (ChimeriVax-JE): phase 2 clinical trials for safety and immunogenicity, effect of vaccine dose and schedule, and memory response to challenge with inactivated Japanese encephalitis antigen. *J Infect Dis.* 2003;188(8):1213-1230.
- Monath TP, McCarthy K, Bedford P, Johnson CT, Nichols R, Yoksan S, *et al.* Clinical proof of principle for ChimeriVax: recombinant live, attenuated vaccines against flavivirus infections. *Vaccine* 2002;20(7-8):1004-1018.
- Monath TP. Yellow Fever. In: Plotkin AS, Orenstein WD, *Vaccines* (eds), 4th Edition. Philadelphia: WB Saunders; 2004.
- Monath TP. In: *The arboviruses: ecology and epidemiology. Yellow fever*, vol. V. Boca Raton (FL); CRC Press; 1988;139-231.
- Monath TP. Yellow fever: an update. *The Lancet Infectious Diseases.* 2001;1:11-20.
- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the *Flavivirus* life cycle. *Nature.* 2005;3:13-25.
- Murray JM, Aaskov JG, Wright PJ. Processing of the dengue virus type 2 proteins prM and C-prM. *J. Gen. Virol.* 1993;74:175-182.

- Muylaert, IR, Galler R, Rice CM.. Genetic analysis of yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. *J. Virol.* 1997;71:291–298.
- Nowak T, Fäber PM, Wengler G, Wengler G. Analysis of the terminal sequences of West Nile virus structural proteins and of the *in vitro* translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. *Virology* 1989;169:365-76.
- O'Reilly EK, Kao CC. Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure. *Virology* 1998;252:287-303.
- Op De Beeck A, Rouille Y, Caron M, Duvet S, Dubuisson J. The transmembrane domains of the prM and E proteins of yellow fever virus are endoplasmic reticulum localization signals. *J Virol.* 2004;78:12591-602.
- Pierson TC, Diamond MS, Ahmed AA, Valentine LE, Davis CW, Samuel MA, *et al.* An infectious West Nile virus that expresses a GFP reporter gene. *Virology* 2005; 334(1),28-40.
- Post PR, Carvalho, R, Freire, MS, Galler R. The early use of yellow fever virus strain 17D for vaccine production in Brazil - a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2001; 96:849-857.
- Santos CND, Post PR, Carvalho R, Ferreira II, Rice CM, Galler R. Complete nucleotide sequence of yellow fever virus vaccine strains 17DD and 17D-213. *Virus Res.* 1995;35:35-41.
- Pugachev KV, Guirankhoo F, Guirakhoo F, Monath TP. Traditional and novel approaches to flavivirus vaccines. *Int J Parasitol.* 2003; 33:567-82.
- Pugachev KV, Guirankhoo F, Monath TP. New developments in flaviviruses vaccines with special attention to yellow fever. *Curr Opin Infect Dis.* 2005;18:387-94.

- Racaniello VR, Baltimore D. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science*. 1981;214(4523):916-9
- Reed W, Carrol J, Agramonte A. The etiology of yellow fever. *JAMA* 1901; 86:431-40.
- Rey F, Heinz FX, Mandl C, *et al.* Crystal structure of the envelope glycoprotein E from tick borne encephalitis virus. *Nature*. 1995;375:291-298.
- Rice CM, Grakoui A, Galler R, Chambers JT. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by *in vitro* ligation. *The new biologist*. 1989;1(3):285-296.
- Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, *et al.* Nucleotide sequence of yellow fever virus: Implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science*. 1985;229:726-733.
- Rice, CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 1985;229:726-33.
- Rice, CM. Flaviviridae: the viruses and their replication.. In Fields BN, Knipe DN, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (ed.), *Virology*, 3rd ed. Lippincott- Raven, Philadelphia, Pa. 1996;931–959.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, NY. 1989.
- Schalich J, Allison SL, Stiasny K, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. Recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus are fusogenic and provide a model system for studying flavivirus envelope glycoprotein functions. *J Virol*. 1996;70:4549-4557.
- Soper FL. Yellow fever. In: Taylor BZ, editor. *Clinical tropical medicine*. New York City: Paul B. Hoeber, 1944;391-420.

- Stadler, K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX.. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol.* 1997;71:8475-8481.
- Stefano I, Sato HK, Pannuti CS, Omoto TM, Mann G, Freire MS, *et al.* Recent immunization against measles does not interfere with the sero-response to yellow fever vaccine. *Vaccine.* 1999;17:(9-10):1042-1046.
- Steffens S, Thiel HJ, Behrens SE. The RNA-dependent RNA polymerases of different members of the family Flaviviridae exhibit similar properties *in vitro*. *J Gen Virol* 1999;80:2583-2590.
- Stiasny, K, Allison, SL, Marchler-Bauer, A, Kunz, C, Heinz, FX. Structural requirements for low-pH-induced rearrangements in the envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus. *J. Virol.* 1996; 70:8142-8147.
- Stocks CE, Lobigs M.. Signal peptidase cleavage at the flavivirus C-prM junction: dependence on the viral NS2B-3 protease for efficient processing requires determinants in C, the signal peptide, and prM. *J Virol.* 1998;72(3):2141-9.
- Stokes A, Bauer JH, Hudson NP. Experimental transmission of yellow fever to laboratory animals. *Am. J. Trop. Med.* 1928; Vol.III, No 2:103-164.
- Tannis LL, Gauthier A, Eveleigh C, Parsons R, Nyholt D, Khromykh A, *et al.* Semliki forest virus and kunjin virus RNA replicons elicit comparable cellular immunity but distinct humoral immunity. *Vaccine* 2005; 23(33), 4189-94.
- Tão D, Barba-Spaeth G, Rai U, Nussenzweig V, Rice CM, Nussenzweig RS. Yellow fever 17D as a vaccine vector for microbial CTL epitopes: protection in a rodent malaria model. *J. Exp. Med.* 2005; 201(2),201-9.
- Theiler M e Smith HH. The use of yellow fever virus modified by *in vitro* cultivation for immunization. *J. Exp. Med.* 1937; 65:787-800.

- Tilgner, M, Deas TS, Shi PY. The flavivirus-conserved penta-nucleotide in the 3' stem-loop of the West Nile virus genome requires a specific sequence and structure for RNA synthesis, but not for viral translation. *Virology* 2005; 331:375-86.
- Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J. Gen. Virol.* 2006; 87:2605-2614.
- Wengler G e Wengler G.. The NS3 non-structural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. *Virology* 1993;197:265-273.
- Westaway EG, Khromykh AA, Mackenzie JM.. Nascent Flavivirus RNA Colocalized in Situ with Double-Stranded RNA in Stable Replication Complexes. *Virology.* 1999;258 (1):108-117.
- Westaway EG, Mackenzie JM, Khromykh AA. Kunjin RNA replication and applications of Kunjin replicons. *Adv Virus Res.* 2003; 59, 99-140.
- Westaway, E.G. Flavivirus replication strategy. *Adv Virus Res.* 1987; 33:45-90
- Yamshchikov VF, Compans RW. Formation of the flavivirus envelope: role of the viral NS2B-NS3 protease. *J Virol.* 1995;69(4):1995-2003.
- Yamshchikov VF, Trent DW, Compans RW. Upregulation of signalase processing and induction of prM-E secretion by the flavivirus NS2B-NS3 protease: roles of protease components. *J Virol.* 1997;71(6):4364-4371.
- You, S, Falgout B, Markoff L, Padmanabhan R. In vitro RNA synthesis from exogenous dengue viral RNA templates requires long range interactions between 5'- and 3'-terminal regions that influence RNA structure. *J Biol Chem.* 2001;276:15581-91.
- Yu, L e L. Markoff. The topology of bulges in the long stem of the flavivirus 3' stem-loop is a major determinant of RNA replication competence. *J Virol.* 2005;79:2309-24.

Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, *et al.*
Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue
virus. *Nat Struct Biol.* 2003; 10:907-912.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)