

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANA PAULA MONTENEGRO GENERINO

Expressão do domínio III da proteína do envelope de dengue 3 na região intergênica E/NS1 do vírus vacinal de febre amarela 17D: construção e caracterização de vírus recombinante

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

Orientadores: Prof. Dr. Ricardo Galler
Prof. Dr^a. Myrna Bonaldo

RIO DE JANEIRO

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

G326

Generino, Ana Paula Montenegro

Expressão do domínio III da proteína do envelope de dengue 3 na região intergênica E/NS1 do vírus vacinal de febre amarela 17D: construção e caracterização de vírus recombinante / Ana Paula Montenegro Generino. – Rio de Janeiro, 2008.

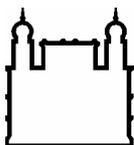
xiv, 103 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2008.

Bibliografia: f. 84-99

1. Flavivírus. 2. Recombinante FA 17D. 3. Dengue - vacina. 4. Febre amarela - vacina. I. Título.

CDD 616.921



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANA PAULA MONTENEGRO GENERINO:

**EXPRESSÃO DO DOMÍNIO III DA PROTEÍNA DO ENVELOPE DE DENGUE 3 NA
REGIÃO INTERGÊNICA E/NS1 DO VÍRUS VACINAL DE FEBRE AMARELA 17D:
CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE VÍRUS RECOMBINANTE.**

ORIENTADORES: Prof. Dr. Ricardo Galler
Prof. Dr^a. Myrna Bonaldo

Aprovada em: 23/06/2008

EXAMINADORES:

Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite (Presidente)
Prof. Dr. Bergmann Moraes Ribeiro
Prof. Dr^a. Flávia Barreto dos Santos

Rio de Janeiro, 23 de Junho de 2008.

Dedico esta dissertação àqueles que me ensinaram o que é amor em família: meus pais, Paulo e Regina, e minha irmã, Paulinha.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus pela minha Vida e por todas as formas de Vida. Se a Vida não fosse tão bela jamais seria uma Bióloga! Obrigada pelo seu Amor incondicional, por me guiar sempre pelos Seus caminhos e me dar força e coragem para lutar diariamente pelo que acredito.

Aos meus orientadores Dr. Ricardo Galler e Dr^a Myrna Bonaldo pela oportunidade do trabalho, paciência, orientação e ótimas idéias de como aperfeiçoar a dissertação. Agradeço por todo o empenho dedicado em fazer desta dissertação a melhor possível.

Ao Dr. Richard Garret e Dr. João Renato Carvalho Muniz do Instituto de Física da USP de São Carlos-SP pelo ensino, paciência e auxílio na parte de Modelagem Molecular. Aos demais estudantes de São Carlos pela calorosa acolhida e ajuda em todos os momentos nesse “novo mundo”, especialmente Lucas Bleicher, Nayara Cavalcante e Nathália.

Ao Dr. Marcos Freire por ter cedido instalações e estrutura do Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV/Bio-Manguinhos/FIOCRUZ), onde foram realizados parte dos experimentos.

À Dr^a Claire Kubelka do Laboratório de Imunologia Viral (IOC/FIOCRUZ) por ter cedido o vírus DENV-3 16562 utilizado nesta dissertação.

Ao Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais (LATAM/Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) por ter cedido os anticorpos monoclonais anti-domínio III de DENV-3 e anti-proteína E de FA 2D12 utilizados em vários experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus e do LATEV pela convivência e auxílio sempre que precisei. Meu muito obrigada a Raquel Tayar pelo seu jeito calmo e prestativo; a Gisela Freitas pelo auxílio com os ensaios de imunofluorescência e pelas ótimas dicas e conversas; a Patrícia Carvalho pelo bom humor e auxílio; a Alfredo Jabor por ser tão prestativo; a Armindo Caldeira por prontamente me ajudar sempre, a Marlon Gilsepp pelas ótimas conversas científicas e pelas perguntas sempre eloqüentes lembrando-me dos tempos de faculdade; a Paula Barbosa; a Adriana Vallochi pela ajuda com as estatísticas e ensino de como utilizar o EndNote. Agradecimentos especiais ao “Trio Parada Dura” pelo companheirismo e árduas horas de trabalho/bancada: Michelli Faria Oliveira com seu alto-astrol e Ana Luiza Chaves Valadão com sua dedicação. Sem vocês esse tempo de mestrado não teria sido tão proveitoso cientificamente e muito menos tão divertido. Vocês são verdadeiras guerreiras. Obrigada por me deixar fazer parte disso. Obrigada ainda pela companhia em congressos, viagens, saídas e outros eventos divertidíssimos!!!

Aos amigos que conheci no LABMF, mas que agora encontram-se em outros lugares: Ingrid Horbach (agora na versão Hannah!!), Samanta Mattei, Aymara Rangel e Daniele de

Paula, a eficiência em pessoa! Agradecimentos especiais a Adriana Duarte pelo excelente convívio e suporte técnico sempre que necessário.

Às plataformas PDTIS de microscopia confocal e seqüenciamento e seus representantes, Bernardo e Aline. Muito obrigada!

Aos meus pais maravilhosos, Paulo e Regina, pela minha formação e educação. A minha irmã, Paulinha, por ser uma grande companheira. Nosso convívio me ensinou a ser uma pessoa menos egoísta e mais prestativa. Obrigada por me ensinarem o que é amor em família, respeito e dignidade e por apoiarem sempre as minhas decisões. Amo vocês!!!!

A toda a minha família espalhada pelo Brasil e pelo mundo afora: tios e tias, primos e primas, avôs e avós. As minhas madrinhas do coração, Domiciana e Lorena, minhas tias-mães, tia Têca e tia Dida, e minha vó-mãe, vovó Dorinha (*in memoriam*). Sei que sempre posso contar com vocês. Obrigada!!!

Ao meu querido Guto pelo seu amor, apoio e ensinamentos. Você me ajuda a ser uma pessoa melhor a cada dia, espero que eu faça o mesmo por você. Te amo muito!!! Agradeço também a sua família por me receber sempre de braços abertos e com muita alegria.

Ao Professor Dr. Bergmann Morais Ribeiro por ter me introduzido ao maravilhoso mundo da ciência e ter sempre apoiado e respeitado as minhas decisões. Obrigada pela torcida, pelo carinho, pela preocupação com a minha formação e por ver a todos como seres humanos à procura da felicidade, sem julgar jamais. Esses são ensinamentos que ficam para toda a vida. Obrigada!

Aos amigos que conheci no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia da UnB e na EMBRAPA/Cenargen, não esqueço nunca de vocês!!!! Obrigada pela torcida mesmo à distância. Susane, Maria, Tati, Thiago, Naya, Aline, Anabelle, Marcelo, Gláucia, Juliana, Greice, Érica, Raimundo, Mariana Hallwass, Danielle, Pinedo, Cláudia, Virgínia, Vítor, Bruno, Shélida. Nossa amizade não acaba e é isso que importa!

Aos amigos da graduação Isabella, Luana, Susane, Michelle, Luíza, Diana, Henrique, Rodrigo, Raquel Guimarães, Raquel Sado, Hernani, Nayara. Vocês foram fundamentais na minha formação, tornaram e tornam meus dias mais coloridos. Obrigada por tudo!!!

Aos amigos da vida: Gustavo, Leila, Arícia, Pedrão, André Duboc, Rachas, Raquel Sado, Rui, Lorenilda, Rafael Americano, Priscilla, Jana, Lígia, Adelianna, Nathy. Aos novos amigos Kamille, Vivi, Aninha, André Venício, Adriana, Alessandra, Gisele, Felipe Coelho... Enfim, são muitas pessoas, se esqueci alguém isso não quer dizer que você não tem um lugar reservado no meu coração. Obrigada!!!!

A todos os professores que muito mais do que apenas ensinar foram verdadeiros mestres. Obrigada!!!

Aos membros da banca por terem aceito o convite, especialmente ao Dr. José Paulo Leite pela excelente revisão da dissertação.

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

À Coordenação e Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do IOC pelo auxílio constante durante o mestrado. Agradecimentos especiais a Daniele, a secretária do PGBCM.

Ao CNPq pela bolsa que permitiu que eu me sustentasse durante o mestrado.

A todos, enfim, que de alguma forma, direta ou indireta, me ajudaram a chegar até aqui. Obrigada! Sua contribuição, esteja certo, foi fundamental.

“Para ser grande, sê inteiro; nada teu exagera ou exclui; sê todo em cada coisa; põe quanto és no mínimo que fazes (...)”

Fernando Pessoa

"Sou uma filha da natureza: quero pegar, sentir, tocar, ser. E tudo isso já faz parte de um todo, de um mistério. Sou uma só... Sou um ser. E deixo que você seja."

Clarice Lispector

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

Galileu Galilei

ABREVIATURAS E SIGLAS

α -E FA	Anticorpo anti-proteína E de febre amarela
α -E DENV3	Anticorpo anti-proteína E de dengue 3
aa	Aminoácido
ADE	Exacerbação da resposta imune cruzada dependente de anticorpo. Do Inglês, <i>Antibody Dependent Enhancement</i>
ATCC	Coleção Americana de Culturas e Depósitos. Do Inglês, <i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	Do Inglês, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BHI	Meio com infusão de cérebro de bezerro e coração de boi. Do Inglês, <i>Brain Heart Infusion</i>
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BSA	Albumina sérica bovina. Do Inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i>
BSC-1	Células de rim de macaco verde africano susceptíveis a SV40
BrEt	Brometo de etídeo
C	Capsídeo ou proteína do capsídeo
C6/36	Células de mosquito <i>Aedes albopictus</i> clone C6/36
<i>cap</i>	Resíduo G metilado (7-metil G) na extremidade 5' do RNAm
CCL	Linhagem Celular Certificada. Do Inglês, <i>Certified Cell Line</i>
CDC	Centro de controle e prevenção de doenças dos Estados Unidos da América. Do Inglês, <i>Centers for Diseases Control and Prevention</i>
cDNA	DNA complementar
CHO	Células derivadas de ovário de hamster chinês. Do Inglês, <i>Chinese Hamster Ovarian Cell</i>
CMC	Carboximetilcelulose
CPE	Efeito citopático. Do Inglês, <i>Cytopathic effect</i>
CS	Segmento Conector entre as duas hastes da proteína E de <i>Flavivírus</i> . Do Inglês, <i>Connecting Segment</i>
C-term	Carboxi-terminal
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DI/DII/DIII	Domínios I, II e III da proteína E de <i>Flavivírus</i> , respectivamente
DAPI	4,6 diamidino-2-fenilindoli
DENV	Vírus dengue
DEPC	Dietil pirocarbonato

DHF	Febre hemorrágica por dengue. Do Inglês, <i>Dengue Hemorrhagic Fever</i>
DNA	Ácido desoxiribonucleotídico
dNTP	deoxirribonucleotídeos
DTT	1,4-ditiotreitol
DSS	Síndrome do choque por dengue. Do Inglês, <i>Dengue Shock Syndrome</i>
E	Envelope ou proteína do envelope de <i>Flavivírus</i>
EDTA	Etileno-diamino tetra acetato de sódio
FA	Vírus febre amarela ou doença febre amarela
GFP	Proteína fluorescente verde. Do Inglês, <i>Green Fluorescent Protein</i>
H1/H2	Hastes 1 e 2 da proteína E de <i>Flavivírus</i>
HA	Haste-âncora da proteína E de <i>Flavivírus</i>
HS	Heparan sulfato
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
JE	Vírus da encefalite japonesa. Do Inglês, <i>Japanese Encephalitis virus</i>
LB	Meio Luria-Bertani
LLC- MK2	Células de rim de macaco rhesus
M	Proteína de Membrana
MOI	Multiplicidade de infecção. Do Inglês, <i>multiplicity of infection</i>
MVE	Vírus da encefalite do vale Murray. Do Inglês, <i>Murray Valley Encephalitis Virus</i>
NIH	Instituto nacional de saúde dos Estados Unidos da América. Do Inglês, <i>National Institute of Health</i>
NS	Proteína não estrutural de <i>Flavivírus</i> . Do Inglês, <i>non-structural protein</i>
nt	Nucleotídeo
N-term	Amino-terminal
NTP	Ribonucleotídeo
OGM	Organismo Geneticamente Modificado
OMS	Organização Mundial da Saúde (WHO – <i>World Health Organization</i>)
ORF	Fase aberta de leitura. Do inglês, <i>Open Reading Frame</i>

PBS	Solução salina fosfato tamponada. Do Inglês, <i>Phosphate Buffered Saline solution</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase. Do Inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	Banco de dados de proteínas. Do Inglês, <i>Protein Data Bank</i>
PDK	Células primárias de rim de cachorro. Do Inglês, <i>Primary Dog Kidney</i>
PDVI	Iniciativa para uma vacina pediátrica contra dengue. Do Inglês, <i>Pediatric Dengue Vaccine Initiative</i>
PFU	Unidade formadora de placa. Do Inglês, <i>Plaque Forming Unit</i>
PGMK	Células primárias de rim de macaco verde
p.i.	Pós-infecção
Poly-A	Estrutura poliadenilada da extremidade 3' do RNAm
POP	Protocolo Operacional Padrão
PrM	Precursor da proteína de membrana de <i>Flavivírus</i>
PRNT	Teste de redução de placas por neutralização. Do Inglês, <i>Plaque Reduction Neutralization Test</i>
p.t.	Pós-transfecção
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotação por minuto
RT-PCR	Transcrição Reversa seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase. Do Inglês, <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio. Do Inglês, <i>Sodium Dodecil Sulfate</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SOC	Meio SOC. Do Inglês, <i>Super Optimal Catabolite</i>
SURE	Células <i>Escherichia coli</i> competentes. Do Inglês, <i>Stop Unwanted Rearrangement Events</i>
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TBE	Vírus da encefalite transmitido por carrapato. Do Inglês, <i>Tick-Borne Encephalitis Virus</i>

TE	Tampão Tris-EDTA
TM1/TM2	Transmembranas 1 e 2 da proteína E de <i>Flavivírus</i>
UTR	Região não traduzida. Do Inglês, <i>Untranslated Region</i>
Vero	Células de rim de macaco verde africano
VLP	Partículas vírus-like. Do Inglês, <i>Virus Like Particle</i>
WNV	Vírus do Oeste do Nilo. Do Inglês, <i>West Nile Virus</i>
WRAIR	Instituto de pesquisa Walter Reed do exército americano. Do Inglês, <i>Walter Reed Army Institute of Research</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema da tradução e processamento da poliproteína viral de <i>Flavivirus</i>	02
Figura 1.2. Partículas virais de <i>Flavivirus</i>	03
Figura 1.3. Esquema do ciclo de replicação dos <i>Flavivirus</i>	05
Figura 1.4. Distribuição atual do <i>Ae. Aegypti</i> e da dengue no mundo	08
Figura 1.5. Número de casos de febre hemorrágica (DHF) e mortes por dengue notificados no Brasil de 1990 a 2006	09
Figura 1.6. Distribuição do <i>Ae. aegypti</i> nas Américas em 1930, 1970 e 2001	10
Figura 1.7. Estrutura do dímero da proteína E de DENV-3 na partícula viral madura	15
Figura 1.8. Diagrama esquemático da proteína E com seu ectodomínio e sua região HA no envelope viral	17
Figura 1.9. Duas vistas ortogonais de um diagrama da estrutura do DIII de DENV-4	18
Figura 1.10. Mutantes de escape de neutralização em DENV	20
Figura 1.11. Histórico de passagem dos genótipos vacinais de febre amarela desde o vírus selvagem <i>Asibi</i>	21
Figura 2.1. Topologia na membrana do RER da célula hospedeira dos elementos envolvidos na inserção da proteína GFP entre E/NS1	24
Figura 4.1. Esquema de amplificação do cassete de expressão heterólogo	35
Figura 4.2. Mapa do plasmídeo pCR–Blunt II–TOPO [®]	37
Figura 4.3. Esquema de clonagem do cassete de expressão no pCR-Blunt II-TOPO [®]	38
Figura 4.4. Mapa do plasmídeo bacteriano pT3 de 9939 pb contendo a região central do genoma do vírus FA (nucleotídeos 1373 a 9428)	39
Figura 4.5. Esquema da subclonagem do cassete heterólogo no plasmídeo pT3	41
Figura 4.6. Mapa do plasmídeo pG1/2 com 6905 pb contém as regiões 5' (nucleotídeos 1 a 2271) e 3' (nucleotídeos 8215 a 10862) do genoma do vírus FA	42
Figura 4.7. Obtenção de vírus recombinante por meio do sistema de dois plasmídeos do clone infeccioso de FA	43
Figura 5.1. Alinhamento do DIII dos quatro sorotipos de dengue destacando as três folhas β organizadas em nove fitas	50
Figura 5.2. Alinhamento entre os diversos genótipos de DENV-3 destacando as nove fitas β formando as três folhas β que compõem o barril característico do DIII	50
Figura 5.3. Análise seqüencial dos componentes do cassete de expressão DIII DENV-3 HA truncada DENV-4	52
Figura 5.4. Alinhamento do molde DIII de DENV-3 CH53489 e do DIII de DENV-3 16562 a ser modelado	53

Figura 5.5. Gráfico de Ramachandran obtido para o modelo do DIII de DENV-3 16562	54
Figura 5.6. Modelo do DIII da proteína E de DENV-3 16562 mostrando sítios capazes de induzir formação de anticorpos neutralizantes	55
Figura 5.7. Modelo do DIII DENV-3 16562 destacando sítios de ligação a receptores celulares	56
Figura 5.8. Modelo do DIII de DENV-3 16562 destacando diferenças de aminoácidos encontradas no alinhamento entre os quatro genótipos de DENV-3	57
Figura 5.9. Superfície eletrostática do modelo de DENV-3 16562 em diversos ângulos	58
Figura 5.10. Análise dos fragmentos de amplificação do cassete de expressão e clonagem do cassete no pCR-Blunt II-TOPO®	60
Figura 5.11. Clonagem do cassete heterólogo no plasmídeo pT3	61
Figura 5.12. Etapas para obtenção do molde de cDNA analisadas em géis de agarose 0,8 %/TAE corados com BrEt	62
Figura 5.13. Estabilidade genética do vírus recombinante nas primeira e segunda passagens em células Vero	63
Figura 5.14. Cinética de replicação do vírus recombinante e dos controles vacinal e parental	64
Figura 5.15. Microscopia em contraste de fase dos vírus controles FA17DD e FA17D/G1.2/T3 e do recombinante FA17D/D3 infectando ou não (<i>Mock</i>) células Vero	66
Figura 5.16. Estabilidade genética do vírus recombinante nas passagens 2P, 5P e 10P	68
Figura 5.17. Modificações ocorridas no cassete de expressão das populações virais de 10P1 e 10P2	69
Figura 5.18. Ensaios de imunofluorescência com o vírus recombinante para detecção da expressão de DIII de DENV-3	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1 - Principais candidatos vacinais contra DENV	13
Quadro 4.1 - Marcadores genotípicos das células competentes utilizadas nas clonagens	31
Quadro 4.2 – Oligonucleotídeos utilizados para obtenção do cassete de expressão	33
Quadro 4.3 – Oligonucleotídeos utilizados nos seqüenciamentos nucleotídicos	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 – Composição, extensão e posição das nove fitas β do modelo do DIII DENV-3 16562.	54
Tabela 5.2 – Diferenças encontradas entre o DIII dos genótipos de DENV-3 e sua localização	57
Tabela 5.3 – Valores e seus desvios-padrão em \log_{10} PFU/mL da cinética de replicação em monocamada de células Vero	64
Tabela 5.4 – MOI e título em \log_{10} PFU/mL do vírus recombinante FA17D/D3 da terceira até a décima passagem em células Vero	67

RESUMO

A dengue é um problema de saúde mundial cujo agente são os vírus dengue, um *Flavivirus* composto de quatro sorotipos distintos (DENV-1 a 4). A doença possui um amplo espectro de manifestações clínicas que podem variar de febre clássica a febre hemorrágica e síndrome do choque por dengue. Não existe nenhuma vacina disponível contra DENV, embora várias abordagens estejam sendo testadas. Este estudo apresenta uma estratégia que explora as características vacinais do vírus vacinal de febre amarela (FA) 17D e utiliza-o como vetor para expressar o domínio III (DIII) da proteína do Envelope (E) do vírus DENV-3 entre as proteínas E e não estrutural 1 (NS1) do vírus FA 17D. Esse domínio está envolvido em aspectos importantes da patogênese do vírus e anticorpos dirigidos a ele são os mais eficientes para neutralização da infecção celular. A análise da seqüência de aminoácidos e da estrutura tridimensional do domínio III de DENV-3 16562 utilizado nesta construção e sua comparação com outros genótipos do mesmo sorotipo revelaram e localizaram tridimensionalmente diferenças que estavam relacionadas à características importantes do vírus como escape de neutralização, ligação a receptores e virulência/atenuação. O DIII foi amplificado a partir de RNA extraído do sobrenadante de células de *Aedes albopictus* clone C6/36 infectadas com DENV-3 16562 e clonado no plasmídeo pCR-Blunt II-TOPO[®]. Após confirmação da seqüência, o plasmídeo foi digerido com a endonuclease *Nar* I e o cassete de expressão foi subclonado no plasmídeo bacteriano pT3, que possui a parte central do DNA complementar (cDNA) viral de FA. O molde de cDNA viral recombinante foi obtido utilizando-se esse plasmídeo juntamente com o pG1/2, que contém o resto do genoma de FA. O molde de cDNA foi transcrito *in vitro* e o RNA viral transfectado em células Vero. Um vírus recombinante viável foi regenerado do sobrenadante da cultura celular após visualização de efeito citopático e a inserção correta do DIII foi confirmada por RT-PCR e seqüenciamento. O vírus recombinante apresentou título de $6,0 \log_{10}$ PFU/mL, expressa o inserto heterólogo nas células infectadas em uma região perinuclear que corresponde, muito provavelmente, ao retículo endoplasmático rugoso (RER) das células hospedeiras e teve uma cinética de replicação bem diferente dos vírus controles (FA 17DD e FA17D/G1.2/T3) com um pico de replicação entre 48-72 h p.i. seguido por declínio nos níveis de replicação. O vírus construído era absolutamente estável na sua 2^a passagem em células Vero, porém, a partir da 5^a passagem apresentou populações virais que não possuíam mais a inserção. Na 10^a passagem celular, não havia mais população viral contendo a inserção heteróloga. Entretanto, este fato não limita o uso do vírus recombinante como modelo para verificar a dosagem de anticorpos neutralizantes em modelos experimentais por meio de ensaios de redução de placas por neutralização (PRNT) com soro de animais imunizados. Espera-se que essa metodologia auxilie no desenvolvimento de uma vacina combinada dirigida a esses diferentes *Flavivirus* (DENV e FA), os quais compartilham uma ampla área de transmissão.

ABSTRACT

Dengue is a worldwide health problem whose agent are *Flavivirus* with four distinct serotypes (DENV 1 to 4). The disease has a wide spectrum of clinical manifestations varying from classic fever to hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. There are many approaches with regard to vaccine development, yet none proved successful. This study presents a methodology that exploits the characteristics of yellow fever (YF) vaccine virus 17D, in which this virus is used as an expression vector for the envelope (E) protein domain III (DIII) of DENV-3, between proteins E and non-structural 1 (NS1) of YF 17D. This domain is involved in many important aspects of virus life cycle, and antibodies against it are the most efficient in neutralizing cell infection. Analysis of the amino acid sequence and 3D structure of DENV-3 subtype 16562 DIII used in this construction, and its comparison with other genotypes within the same serotype revealed and localized differences in the tridimensional structure related to important virus features such as neutralization escape, receptor binding, virulence/attenuation. DIII was amplified from RNA extracted from *Aedes albopictus* cells clone C6/36 supernatant infected with DENV-3 16562 and cloned in the pCR-Blunt II-TOPO[®] plasmid. After sequence confirmation, the plasmid was digested with endonuclease *Nar* I, the resulting fragment being subcloned in a bacterial plasmid (pT3), which bears the central part of the YF viral complementar DNA (cDNA). The recombinant viral cDNA template was obtained with this plasmid along with the pG1/2 plasmid, containing the remaining YF viral genome. The cDNA template was transcribed *in vitro*, and the viral RNA was transfected in Vero cells. A viable recombinant virus was regenerated from culture supernatant after visualization of the cytopathic effect and correct insertion of DIII was confirmed by RT-PCR and sequencing. The recombinant virus had a titre of 6,0 log₁₀ PFU/mL, expresses the heterologous antigen in the perinuclear region, which probably corresponds to the endoplasmic reticulum of infected cells and has a different replication kinetics when compared to control viruses (FA 17DD and FA17D/G1.2/T3) with a replication peak at 48-72 h p.i. followed by decline in replication. The virus was absolutely stable in its 2nd Vero cell culture passage, although from its 5th passage on it presented populations that did not bear the insert. In the 10th cell passage, no population bearing the insert was detected. This fact does not limit the use of this construction as a model to verify neutralizing antibodies titres in animal models through plaque reduction neutralization test (PRNT) assays with the sera of immunized animals. Prospectively, this strategy will help the development of a combined vaccine against these two *Flaviviruses*, which share a wide transmission area.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 <i>Flavivirus</i>	01
1.1.1 Características gerais, genoma e ciclo de replicação	01
1.2 Os vírus dengue	06
1.2.1 Os vírus dengue no Brasil	08
1.2.2 Patologia da dengue: desafios para o desenvolvimento de uma vacina	10
1.2.3 Vacinas em desenvolvimento contra os vírus da dengue	11
1.2.4 Proteína do Envelope de dengue	13
1.2.4.1 O domínio III da proteína E	17
1.3 Vacina de febre amarela FA 17D	20
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVOS	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Cultura de células	27
4.2 Vírus utilizados	28
4.2.1 Vírus FA 17DD	28
4.2.2 Vírus FA 17D/G1.2/T3	28
4.2.3 Vírus Dengue 3 derivado de H87	29
4.2.4 Vírus dengue 3 16562	29
4.3 Modelagem molecular por homologia	29
4.4 Extração de RNA total com TRIzol LS [®]	30
4.5 Bactérias competentes	30
4.6 Preparações plasmidiais	31
4.7 Seqüenciamento de ácidos nucleicos	32
4.8 Construção do vírus recombinante	32
4.8.1 Estratégia de clonagem	32
4.8.2 Obtenção do cassete de expressão	33
4.8.3 Clonagem no pCR-Blunt II-TOPO [®]	36
4.8.4 Subclonagem no plasmídeo pT3	39
4.8.5 Obtenção do molde de cDNA	41
4.9 Obtenção do vírus recombinante	44
4.9.1 Transcrição e transfecção do RNA viral	44

4.9.2 Regeneração do vírus e estoque viral	44
4.10 Caracterização viral	45
4.10.1 Titulação	45
4.10.2 Cinética de replicação	46
4.10.3 Estabilidade genética do vírus recombinante	47
4.10.4 Ensaio de imunofluorescência	47
4.10.5 Microscopia em contraste de fase	48
5. RESULTADOS	49
5.1 Estudos preliminares sobre a estrutura e seqüência do DIII de DENV-3	49
5.1.1 Alinhamentos	49
5.1.2 Modelagem molecular	53
5.2 Construção do vírus recombinante	59
5.2.1 Obtenção do cassete de expressão e clonagem no pCR-Blunt II-TOPO®	59
5.2.2 Subclonagem do cassete no plasmídeo pT3	60
5.2.3 Obtenção do molde de cDNA	61
5.3 Regeneração dos vírus e estoque viral	62
5.4 Caracterização viral	63
5.4.1 Titulação e cinética de replicação em células Vero	63
5.4.2 Estabilidade genética do vírus recombinante	67
5.4.3 Ensaio de imunofluorescência	69
6. DISCUSSÃO	71
7. CONCLUSÕES	82
8. PERSPECTIVAS	83
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
10. ANEXOS	100
10.1 Soluções e reagentes	100
10.2 Lista de aminoácidos	103

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Flavivírus*

1.1.1 Características gerais, genoma e ciclo de replicação.

A família *Flaviviridae* é formada por três gêneros: *Flavivírus*, *Hepacivírus* e *Pestivírus* que compartilham semelhanças quanto à morfologia do vírion, organização do genoma e, possivelmente, estratégia de replicação (Westaway *et al.*, 1985). O gênero *Flavivírus* é composto por cerca de 80 diferentes vírus, entre eles, Dengue (DENV), Febre Amarela (FA), Encefalite Transmitida por Carrapato (TBE, do Inglês *Tick Borne Encephalitis*) e Encefalite Japonesa (JE, do Inglês *Japanese Encephalitis*). Estes vírus destacam-se como os arbovírus de maior importância em saúde pública no mundo (Lindenbach & Rice, 2001).

De acordo com o vetor transmissor, essa família pode ser dividida em três grupos: vírus transmitidos por mosquitos, por carrapatos e os quais até o momento não possuem vetor definido (Lindenbach & Rice, 2001). *Flavivírus* são zoonoses que dependem de outra espécie animal além do Homem para serem mantidas na natureza. O Homem, em geral, é o hospedeiro incidental que não contribui para o ciclo natural de transmissão. Uma exceção são os DENV que se adaptaram completamente ao Homem: embora o ciclo mosquito-macaco-mosquito ainda seja observado em algumas regiões da África e da Ásia, os DENV se mantêm em grandes áreas urbanas nos trópicos em ciclos de transmissão homem-mosquito-homem, sem a necessidade de um reservatório animal (Gubler, 1998; 2002).

Os *Flavivírus* são vírus pequenos (40-60 nm de diâmetro), envelopados, esféricos, com capsídeo icosaédrico e genoma de RNA fita simples positiva. Seu genoma de aproximadamente 11 kb origina uma única fase aberta de leitura (ORF, do Inglês *Open Reading Frame*) flanqueada por regiões não traduzidas nas extremidades 5' e 3' (5' UTR e 3' UTR, respectivamente) do RNA (Burke & Monath, 2001). Essas regiões não traduzidas são altamente conservadas e responsáveis pela iniciação da replicação do vírus e pela tradução da poliproteína precursora viral (Chambers *et al.*, 1990; Holden & Harris, 2004).

O RNA possui *cap* tipo I na sua extremidade 5' (m7GpppAmp), não possui cauda polyA na extremidade 3' e codifica uma única poliproteína que é clivada em três proteínas estruturais e sete não estruturais (NS) por meio de processamento proteolítico co e pós-traducional (Brinton, 1986). O genoma codifica na sua extremidade 5', no primeiro quarto, as proteínas estruturais do capsídeo (C, 12-14 kDa), membrana (M, 8 kDa; ou seu precursor prM, 18-26 kDa) e envelope (E, 53-54 kDa); enquanto os outros três quartos do genoma

codificam as proteínas NS, envolvidas na replicação viral e processamento da poliproteína (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Rice *et al.*, 1985).

O processamento da poliproteína ocorre em associação com o retículo endoplasmático rugoso (RER) da célula hospedeira e requer a participação de proteases viral (NS2B/NS3) e do hospedeiro (furina e peptidase sinal) na porção citoplasmática e no lúmen do RER, respectivamente (Lindenbach & Rice, 2001). A topologia da poliproteína na membrana do RER de células infectadas pode ser observada na figura 1.1.

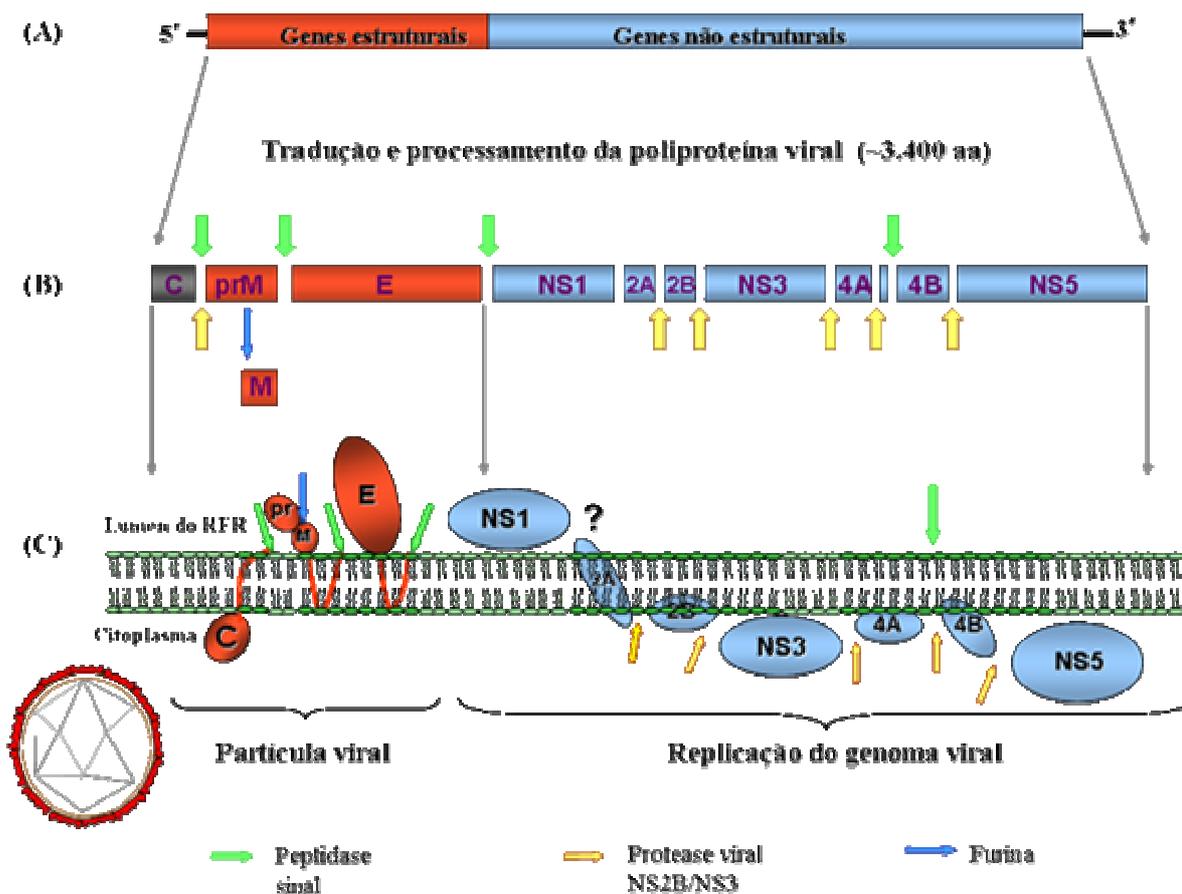


Figura 1.1. Esquema da tradução e processamento da poliproteína viral de *Flavivirus*. (A) Genoma viral formado por RNA fita simples positiva que codifica as proteínas estruturais (em vermelho) e NS (em azul). (B) Esse RNA é traduzido em uma única poliproteína viral de aproximadamente 3400 aminoácidos (aa) que é traduzida e processada em associação com o RER da célula hospedeira onde sofre a ação da protease viral NS2B/NS3 no lado citoplasmático e das proteases celulares peptidase sinal e furina no lúmen (C). A ação das proteases na poliproteína origina: três proteínas estruturais C, prM/M e E que formarão a partícula viral; e as proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 que estão envolvidas na replicação do genoma viral. Fonte: Laboratório de Biologia Molecular de Flavivirus. IOC/FIOCRUZ.

Durante a tradução da poliproteína, as proteínas são translocadas e ancoradas no RER por várias seqüências sinais e domínios de ancoragem à membrana (Mukhopadhyay *et al.*, 2005). Como pode ser observado na figura 1.1, as proteínas estruturais são clivadas no seu C-terminal pela peptidase sinal presente no lúmen do RER, enquanto as proteínas C e NS são clivadas na face citoplasmática desta organela pela protease viral NS2B/NS3. Apenas as proteínas NS4A e NS4B são clivadas pela peptidase sinal e não se conhece qual a protease responsável pela clivagem entre NS1 e NS2A (Chambers *et al.*, 1990). A clivagem de prM em M pela furina ocorre em pH ácido na rede *trans* do complexo de Golgi onde a acidificação induz rearranjos globais que resultam na exposição do sítio de clivagem de prM (Yu *et al.*, 2008).

Após serem clivadas, as moléculas pr permanecem associadas à partícula viral cobrindo o peptídeo de fusão presente na E até que o vírion seja liberado no meio extracelular onde o pH neutro diminui a afinidade de pr por E (Li *et al.*, 2008), permitindo que pr se desligue do vírion. Isso impede que partículas virais fusionem com a própria membrana das vesículas da via secretora celular (Yu *et al.*, 2008). Ao sair da célula, o envelope viral formado por M/E assume sua forma matura, com a formação de partículas infecciosas (Stadler *et al.*, 1997). Um esquema com as diferenças entre um vírion imaturo e maturo, bem como uma partícula viral matura coberta por 90 dímeros da proteína E, a principal proteína do envelope dos *Flavivírus*, pode ser observado na figura 1.2.

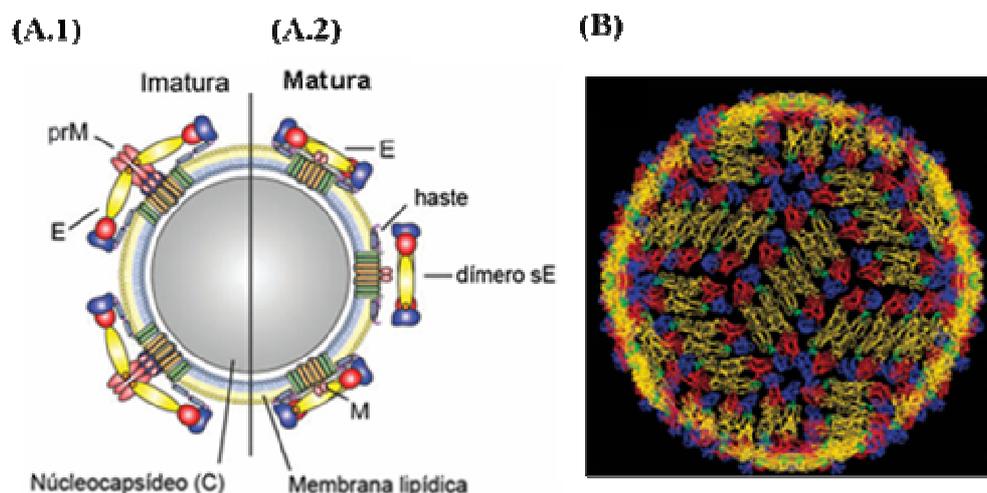


Figura 1.2. Partículas virais de *Flavivirus*. Esquema representando a partícula viral em sua forma intracelular imatura e não infectiva com prM/E (A.1) e extracelular matura e infectiva com M/E (A.2). Em (B) observa-se partícula matura de um *Flavivirus* mostrando sua superfície icosaédrica coberta por 90 dímeros da proteína E. As cores ilustram os diferentes domínios dessa proteína: em vermelho tem-se o domínio I (DI), em amarelo o domínio II (DII) e em azul o domínio III (DIII). Estas proteínas

encontram-se associadas à membrana lipídica do envelope pelos seus domínios transmembranares. Adaptado de Stiasny & Heinz, 2006 (A) e Kuhn *et al.*, 2002 (B).

O ciclo de replicação dos *Flavivírus* inicia-se com a adsorção e penetração do vírus na célula hospedeira por meio de endocitose mediada por receptor. O pH ácido do endossomo leva a uma trimerização irreversível da proteína E presente na sua superfície que resulta na fusão da membrana viral com a do endossomo (Alisson *et al.*, 1995a; Modis *et al.*, 2004). Uma vez ocorrida a fusão, o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma, a proteína C dissocia-se do RNA e a replicação do genoma e montagem de novas partículas inicia-se (Lindenbach & Rice, 2001).

Partículas imaturas são formadas no lúmen do RER, elas contêm as proteínas prM e E formando o envelope viral que envolve o nucleocapsídeo, mas não são infecciosas uma vez que não conseguem induzir a fusão com a célula hospedeira (Guirakhoo *et al.*, 1991). A proteína C contêm um sinal hidrofóbico no seu C-terminal levando a translocação de prM para dentro do lúmen do RER; prM e E contêm dois domínios transmembrana no seu C-terminal. Isso permite que, após clivagem da poliproteína, C permaneça no citoplasma associado à membrana do RER e interaja com o RNA genômico para formar o nucleocapsídeo do vírion, enquanto prM/E formam um heterodímero estável no lúmen dessa organela (Lindenbach & Rice, 2001; Lorenz *et al.*, 2002).

A morfogênese das partículas virais de *Flavivírus* envolve uma coordenação espacial e temporal entre a montagem do nucleocapsídeo e sua junção ao envelope viral por meio de clivagens reguladas das proteínas estruturais do vírus ancoradas na membrana do RER da célula hospedeira (Lobigs & Lee, 2004). Uma vez montada, a partícula imatura segue pela via secretora da célula e apenas a clivagem de prM em M pela furina na rede *trans* do complexo de Golgi leva à formação de partículas infecciosas (Stadler *et al.*, 1997), que deixam a célula por exocitose. A figura 1.3 mostra o ciclo de replicação dos *Flavivírus*.

Uma característica comum durante a replicação de *Flavivírus* é a formação de partículas subvirais que são menores e sedimentam mais lentamente que vírions maduros (Lindenbach & Rice, 2001). A co-expressão, mesmo *in trans*, das proteínas prM e E na ausência de C é o suficiente para gerar partículas vírus-*like* recombinantes VLPs (do Inglês, *Virus Like Particles*) (Allison *et al.*, 1995b). Essas partículas são similares ao vírion infeccioso nas suas características estruturais e físico-químicas (Konishi & Fujii, 2002) e a incorporação de prM e E nas VLPs ocorre na membrana do RER, sem que outros elementos virais sejam necessários, seguida por rápido transporte pelos compartimentos da via secretora celular e brotamento (Lorenz *et al.*, 2003).

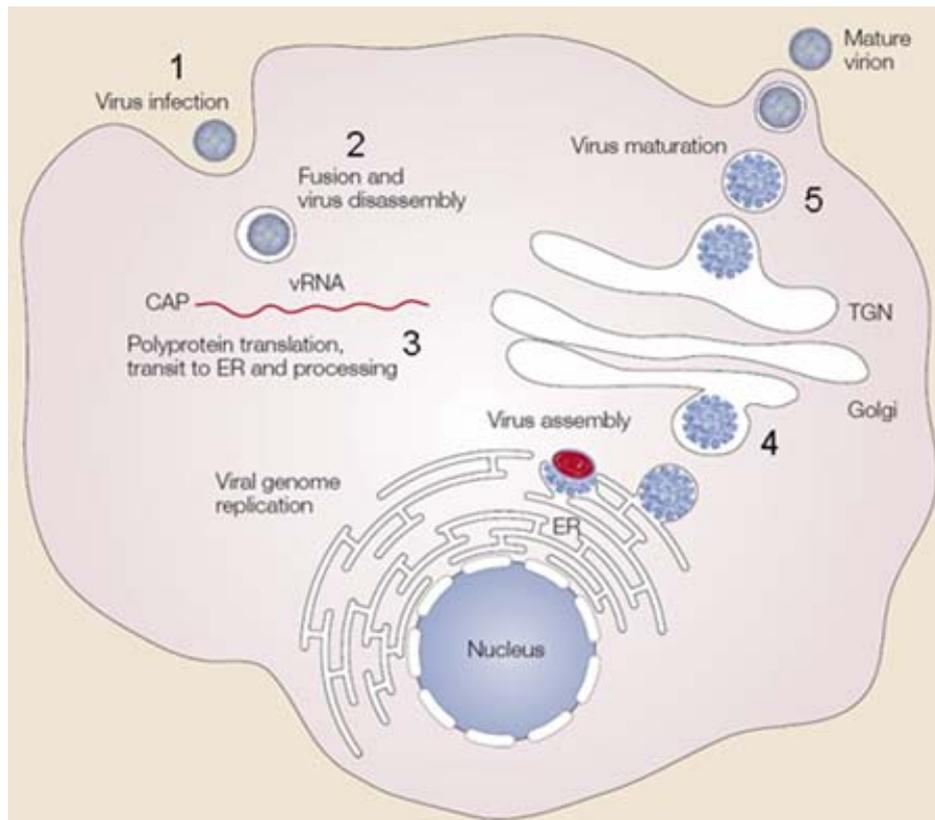


Figura 1.3. Esquema do ciclo de replicação dos *Flavivírus*. O vírus adsorve e penetra na célula por endocitose mediada por receptor (1). Em seguida, a acidificação do endossomo leva à trimerização da proteína E presente no envelope do vírion, cuja mudança conformacional permite a fusão entre as membranas do vírus e do endossomo, liberando o nucleocapsídeo no citoplasma da célula (2). O RNA dissocia-se do capsídeo e começa a ser replicado e traduzido em associação com o RER da célula hospedeira (3). Partículas imaturas são formadas no lúmen do RER pela associação entre nucleocapsídeo e prM/E (4). Ao passar pela rede *trans* do complexo de Golgi, prM é clivada em M originando partículas maduras que saem da célula por brotamento (5). Adaptado de Mukhopadhyay *et al*, 2005.

As proteínas estruturais estão envolvidas na montagem da partícula viral, enquanto as proteínas NS estão, de uma maneira geral, envolvidas na replicação do vírus, embora possuam também um papel na patogênese que ainda não está bem definido (Lindenbach & Rice, 2001). A glicoproteína NS1 (46 kDa) é encontrada nas formas extracelular oligomérica e como homodímero associado à membrana das células infectadas (Fan & Mason, 1990). Ela leva à produção de anticorpos com atividade fixadora do complemento e é capaz de induzir resposta imune protetora (Schlesinger *et al.*, 1987; Costa *et al.*, 2007). Algumas evidências ainda sugerem que ela esteja envolvida no processo de replicação do RNA (Mackenzie *et al.*, 1996).

A proteína NS2A (22 kDa) é a primeira de quatro proteínas hidrofóbicas e relativamente pequenas (NS2A, NS2B, NS4A, NS4B) que associam-se à membrana

(Chambers et al., 1990). NS2A foi localizada em sítios de replicação do RNA e estudos *in vitro* sugerem que a proteína se liga a NS3, NS5 e ao 3' UTR dos transcritos de RNA, funcionando no recrutamento de RNA para sítios de replicação associados à membrana (Mackenzie et al., 1998). Além disso, NS2A suprime a transcrição de interferon β (IFN- β) (Liu et al., 2004) e está relacionada com a montagem do vírion (Leung et al., 2008).

NS2B (14 kDa) forma um complexo com NS3 e funciona como co-fator para a atividade de serino-protease de NS3, além de permitir que NS3 associe-se à membrana (Falgout et al., 1993). NS3 (70 kDa) é uma proteína citoplasmática que participa do processamento da poliproteína viral por meio da atividade de serino-protease da sua porção N-terminal (em associação com NS2B) (Li et al., 1999); participa da replicação do vírus por conter na extremidade C-terminal as atividades enzimáticas de helicase, NTPase e 5' trifosfatase (RTPase). Essa proteína também está envolvida com a montagem do vírion (Patkar & Kuhn, 2008).

A proteína NS4A (16 kDa) participa da inibição da transcrição de IFN β (Munoz-Jordan et al., 2003), além de colaborar com a replicação do RNA (Lindenbach & Rice, 2001). NS4B (27 kDa) interage com o domínio helicase de NS3 aumentando a sua atividade e modulando a replicação viral (Umareddy et al., 2006). A maior e mais conservada proteína entre os *Flavivírus* é a NS5 (103 kDa), que possui atividade de RNA polimerase dependente de RNA e de metiltransferase para metilação do *cap* presente na extremidade 5' do RNA viral (Koonin, 1993; Tan et al., 1996).

1.2 Os vírus dengue

A dengue é a arbovirose de maior importância mundial para a saúde humana desde a década de 80, afetando cerca de 2,5 bilhões de pessoas que vivem em áreas endêmicas em todo o mundo (Gubler & Clark, 1995). A doença é causada pelos vírus dengue, um *Flavivírus* composto de quatro sorotipos geneticamente e sorologicamente distintos: DENV-1 a 4 (Russel & Nisalak, 1967; Calisher et al., 1989).

As manifestações clínicas variam de infecções inaparentes a febres brandas, e da febre clássica da dengue a quadros mais graves como febre hemorrágica (DHF, do Inglês *Dengue Hemorrhagic Fever*) e síndrome do choque (DSS, do Inglês, *Dengue Shock Syndrome*) (Gubler, 1998). A maioria das infecções sintomáticas apresenta-se como febre da dengue clássica com um período de incubação que pode variar de 3 a 14 dias, mas que geralmente é de 4 a 7 dias (Sabin, 1952).

A febre da dengue é caracterizada por um início abrupto de febre acompanhada por cefaléia, dor retro-orbital, náusea, mialgia, artralgia, prostração, astenia, congestão conjuntival

e exantema (Siler *et al.*, 1926; Sabin, 1952). As formas graves da doença (DHF/DSS) são síndromes de permeabilidade vascular ocasionadas por uma cascata imunológica que começa com a infecção de células da linhagem monocítica (Kurane & Ennis, 1997) caracterizadas por febre, trombocitopenia, manifestações hemorrágicas e evidência de aumento da permeabilidade com vazamento do fluido intravascular para os espaços intersticiais (Gubler, 1998).

Nos últimos 25 anos houve um forte ressurgimento global da dengue, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais do globo. As epidemias tornaram-se mais frequentes e maiores, além de estarem associadas a casos mais graves da doença (Gubler, 1998). As razões para essa pandemia global estão nas mudanças demográficas e sociais sofridas pelo mundo desde a 2ª Guerra Mundial, associadas a um controle de mosquitos deficiente: crescimento populacional sem precedentes e desordenado, especialmente em centros urbanos de países tropicais; meios de transporte modernos que permitem movimento mais rápido e em grande volume de pessoas infectadas pelo vírus (Gubler, 2002).

Estima-se que haja 100 milhões de casos de febre de dengue e 250 mil casos de DHF anualmente, em todo o mundo (Burke & Monath, 2001). Os vírus são endêmicos em mais de cem países incluindo a maior parte do Sudeste Asiático, América do Sul e Central, o Caribe e o Pacífico Sul, com casos de DHF reportados em mais de 60 países (OMS, 1997).

Embora não se saiba onde e como esses vírus evoluíram, evidências sugerem que eles derivaram de progenitores primitivos introduzidos na Ásia a partir da África. Acredita-se que o ancestral de DENV tenha surgido há mil anos e que a mudança dos vírus dengue da transmissão silvática em macacos para uma transmissão humano-mosquito-humano sustentável tenha surgido entre 125 e 320 anos atrás (Twiddy *et al.*, 2003). Os quatro sorotipos do vírus teriam evoluído nas florestas tropicais do Sudeste Asiático (Holmes & Twiddy, 2003).

Os vírus são transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes* que os albergam. O *Aedes aegypti* é o vetor urbano mais importante, seguido pelo *Aedes albopictus* que foi introduzido da Ásia para os Estados Unidos da América e para o Brasil em 1985 (Gubler & Trent, 1994). O *Ae. aegypti* possui hábitos diurnos e é altamente domesticado, preferindo alimentar-se de humanos e depositar seus ovos em containeres artificiais dentro e próximos de habitações (Mackenzie *et al.*, 2004). A figura 1.4 ilustra as áreas do mundo infestadas pelo *Ae. aegypti* e com atividade epidêmica da dengue.

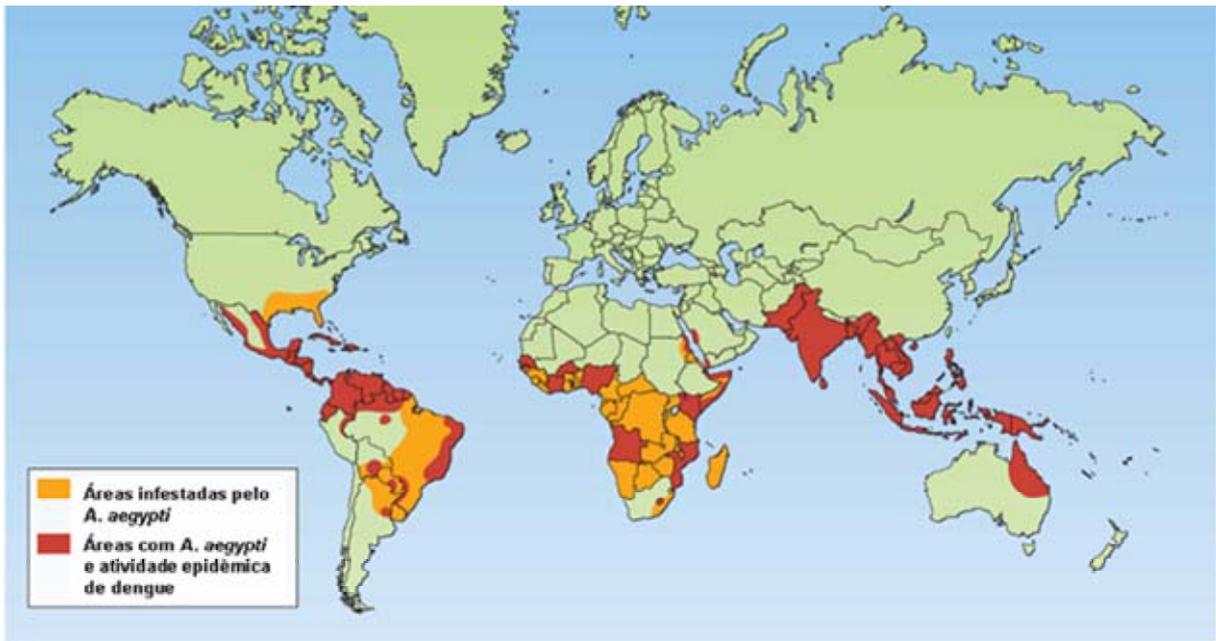


Figura 1.4. Distribuição atual do *Ae. Aegypti* e da dengue no mundo. As áreas infestadas pelo mosquito vetor *Ae. aegypti* e que podem ter surtos de dengue no futuro estão na cor laranja. Áreas com o mosquito vetor e atividade epidêmica da dengue estão na cor vermelha. Adaptado de Mackenzie *et al.*, 2004.

A transmissão do vírus envolve a ingestão de sangue humano contaminado pelo mosquito-fêmea. Após a ingestão de sangue, é necessária uma incubação de 8-10 dias para que o vírus se replique e dissemine no intestino, epitélio, corpos gordurosos e glândulas salivares do mosquito até o seu aparecimento na saliva, o que permite sua passagem para um hospedeiro humano susceptível por meio de nova picada (Rosen & Gubler, 1974). A transmissão vertical do vírus no mosquito é possível e é uma das explicações para a manutenção do vírus entre os períodos epidêmicos em populações urbanas onde ocorre apenas o ciclo mosquito-homem-mosquito (Rosen, 1987; Burke & Monath, 2001).

1.2.1 Os vírus dengue no Brasil

No Brasil, os vírus dengue também são os *Flavivírus* mais importante em termos de saúde pública (Figueiredo, 1998). Existem relatos de doenças parecidas com dengue desde o século XIX: em 1846, na cidade do Rio de Janeiro (Rego, 1872); em 1917, em Curitiba e Rio Grande do Sul (Figueiredo, 1998); e um grande surto na cidade do Rio de Janeiro e em cidades vizinhas entre 1922-1923 (Pedro, 1923).

Uma grande campanha de erradicação do *Ae. aegypti* que visava combater a febre amarela urbana foi iniciada em 1904 por Oswaldo Cruz (Franco, 1976). A campanha teve a

ajuda da Fundação Rockefeller e foi bem-sucedida com a certificação, em 1955, de que o Brasil estava livre do *Ae. aegypt* (Franco, 1961).

De 1923 a 1981 não foram registrados casos de dengue no país (Figueiredo, 2000). Entretanto, o alto nível de atividade de dengue no continente Americano e a reinfestação do Brasil pelo *Ae. aegypti* em 1977 contribuíram para o retorno da doença em Julho de 1981 (Pinheiro & Corber, 1997). Casos foram registrados em Boa Vista, Roraima, com o isolamento dos sorotipos 1 e 4 (Osani *et al.*, 1993).

Em 1986, o DENV-1 foi reintroduzido no estado do Rio de Janeiro (Schatzmayr *et al.*, 1986) e, desde então, infecções por dengue tornaram-se um problema nacional de saúde pública. A dificuldade de implementar programas efetivos de controle do vetor nas grandes cidades brasileiras resultou em uma rápida disseminação do vírus pelo país e o surgimento de epidemias em diversos estados (Nogueira *et al.*, 2007), com destaque para um surto no Ceará em 1986 (Vasconcelos *et al.*, 1995).

A situação ficou mais grave em 1990 com a introdução de DENV- 2 no estado do Rio de Janeiro (Nogueira *et al.*, 1993). A co-circulação de DENV-1 e 2 no país deu origem aos primeiros casos fatais devido à infecção secundária (Nogueira *et al.*, 2007). DENV-3 foi reintroduzido no continente americano em 1994 (CDC, 1995) e em 2000 no Brasil, sendo o responsável por uma grave epidemia de dengue no Rio de Janeiro durante o verão de 2001-2002 (Nogueira *et al.*, 2001).

Em 2008, o estado do Rio de Janeiro passou por uma epidemia de dengue com 131.238 casos e 106 óbitos confirmados até 07/05/2008, com os sorotipos 2 (principalmente) e 3 sendo responsabilizados pelos casos (CIVES, UFRJ). A figura 1.5 mostra o número de casos de DHF e mortes por dengue no Brasil de 1990 a 2006.

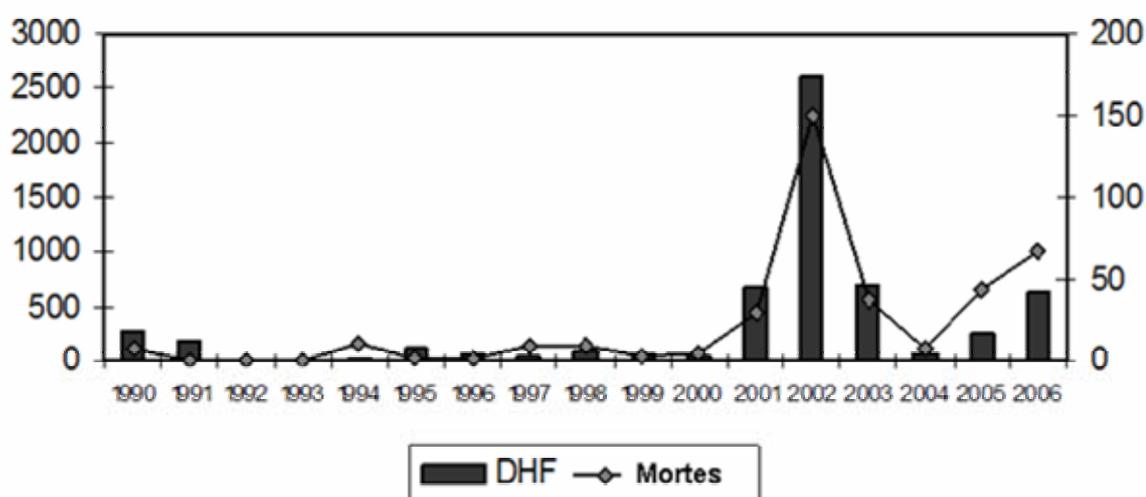


Figura 1.5. Número de casos de febre hemorrágica (DHF) e mortes por dengue notificados no Brasil de 1990 a 2006. Adaptado de Nogueira *et al.*, 2007.

1.2.2 Patologia da dengue: desafios para o desenvolvimento de uma vacina.

Atualmente, a única forma de prevenir a transmissão da dengue é controlar o principal mosquito vetor, o *Ae. aegypti* (OMS, 2000a). Embora programas de controle do vetor implementados no passado nas Américas tenham sido bem-sucedidos, esses programas foram abandonados com o fim da atividade epidêmica e, nas décadas de 70 e 80, o *Ae. aegypti* reinfestou os países de onde tinha sido eliminado (Gubler, 1989). Novos programas nunca foram implementados com sucesso. A figura 1.6 mostra a distribuição do *Ae. aegypti* nas Américas em 1930, 1970 e 2001: antes do programa de controle do vetor, quando o mosquito havia sido erradicado de muitos países e quando o mosquito já tinha reinfestado as Américas, respectivamente.

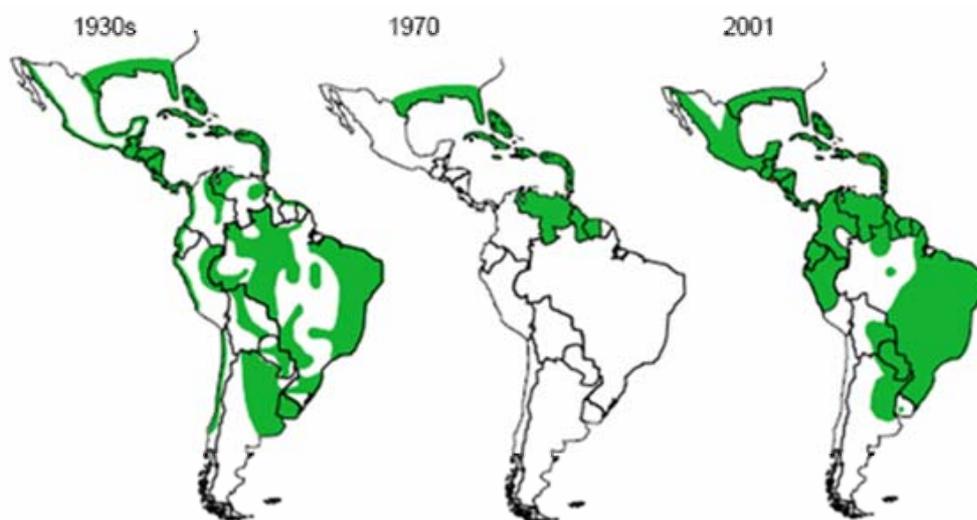


Figura 1.6. Distribuição do *Ae. aegypti* nas Américas em 1930, 1970 e 2001. Em verde estão as áreas infestadas pelo mosquito antes das campanhas de erradicação (1930), quando o mosquito já havia sido eliminado de vários países (1970) e a reinfestação desses países pelo mosquito (2001).
Fonte: Gubler, 2002.

O crescente número de casos da dengue em todo o mundo, aliado à dificuldade de implementar programas de controle de mosquitos eficientes nas grandes cidades das regiões tropicais e subtropicais fez a Organização Mundial de Saúde (OMS) colocar o desenvolvimento de uma vacina contra a dengue como uma de suas prioridades (OMS, 2000b). O desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra a dengue é prioridade da OMS, de Ministérios da Saúde em alguns países atingidos pela doença, dos militares norte-americanos e de pelo menos uma grande indústria farmacêutica, mas até o momento não há uma vacina disponível (Chambers *et al.*, 1997; Cardosa, 1998; Halstead & Deen, 2002).

A resposta imune à dengue não apenas protege contra a doença, mas também parece ser um fator importante nas manifestações graves (DHF/DSS) (Whitehead *et al.*, 2007), embora outros fatores como virulência do genótipo infectante e fatores genéticos do hospedeiro também influenciem (Gubler *et al.*, 1978; Sakuntabhai *et al.*, 2005). A infecção por um sorotipo promove proteção duradoura homotípica e uma proteção cruzada parcial heterotípica (Sabin, 1952), existindo uma forte associação entre gravidade da doença e infecção secundária (Guzmán *et al.*, 1987; Vaughn *et al.*, 2000).

Acredita-se que a infecção por um segundo sorotipo aumente as chances de uma manifestação clínica grave, devido à exacerbação da resposta imune cruzada dependente de anticorpo conhecida como ADE (do Inglês, *Antibody Dependent Enhancement*) (Halstead *et al.*, 1970). Isso ocorre quando anticorpos não neutralizantes adquiridos na primeira infecção, ou transmitidos passivamente pela mãe a recém-nascidos (Kliks *et al.*, 1988), ligam-se ao novo sorotipo infectante sem conseguir neutralizá-lo, permitindo a ligação do complexo anticorpo-vírião às células da linhagem mononuclear fagocitária que possuem receptores do tipo Fc γ , facilitando sua infecção (Rothman, 2004). Essas células são infectadas de forma eficiente apenas na presença desses anticorpos, o que aumenta os níveis de replicação geral do vírus, a viremia do paciente e o potencial para a manifestação de uma doença mais grave (Vaughn *et al.*, 2000; Whitehead *et al.*, 2007).

Logo, o desenvolvimento de uma vacina contra a dengue deve levar em consideração tanto a imunidade protetora como o papel patológico que os anticorpos de infecções anteriores têm em manifestações mais graves (Whitehead *et al.*, 2007). A vacina teria que estimular uma resposta imune protetora homogênea contra os quatro sorotipos (Stephenson, 2005). Apenas uma vacina capaz de induzir uma resposta sustentável de anticorpos neutralizantes contra cada sorotipo da dengue prevenirá a doença de forma efetiva e não irá contribuir para uma manifestação grave (Whitehead *et al.*, 2007).

1.2.3 Vacinas em desenvolvimento contra os vírus da dengue

Uma vacina ideal contra DENV deve ser inócua e eficiente, induzindo um nível de proteção semelhante ao observado após uma infecção natural para todos os sorotipos com o mínimo de imunizações possível (Whitehead *et al.*, 2007). Além disso, deve possuir um baixo custo, ser segura para uso em crianças de 9-12 meses de áreas endêmicas e prover imunidade duradoura (Mackenzie *et al.*, 2004). Não existe um modelo animal adequado onde a vacina possa ser testada. Macacos que são susceptíveis aos vírus e representam os hospedeiros silváticos naturais apenas desenvolvem uma viremia moderada e nenhuma doença significativa, mesmo após infecção secundária (Halstead *et al.*, 1973).

Esforços para desenvolver uma vacina começaram em 1920 com o uso de extratos inativados de mosquitos *Aedes* infectados com os vírus e continuaram durante a 2ª Guerra Mundial usando vírus atenuados por passagem em cultura de células (Hombach, 2007). Recentemente, a Fundação Bill e Melinda Gates criou a Iniciativa para uma Vacina Pediátrica contra Dengue (PDVI) que está investindo milhões de dólares para acelerar o processo de geração e testes clínicos de vacinas (OMS, 2006; Edelman, 2007). O sucesso de vacinas atenuadas, como a da febre amarela, aliada ao fato dessas vacinas promoverem imunidade completa e duradoura, fez com que duas candidatas a vacinas tetravalentes fossem desenvolvidas com base nas técnicas da virologia clássica.

A primeira delas foi desenvolvida pela Universidade Mahidol em Bangkok na Tailândia, juntamente com a Sanofi Pasteur, por meio de passagens sucessivas de DENV-1, 2 e 4 virulentos em células primárias de rim de cachorro (PDK) e DENV-3 em células primárias de rim de macaco verde (PGMK) (Hombach, 2007). Estudos revelaram que o componente DENV-3 era pouco atenuado, induzindo reações moderadas ou sistêmicas e mesmo esforços de rederivar molecularmente esse sorotipo não foram bem-sucedidos (Sanchez *et al.*, 2006). A companhia Sanofi Pasteur decidiu parar com os testes para essa vacina.

O exército americano, por meio do *Walter Reed Army Institute of Research* (WRAIR), desenvolveu uma candidata à vacina contra a dengue utilizando uma estratégia similar à empregada pela Universidade de Mahidol. Genótipos virulentos de DENV foram passados em células PDK para atenuação e diferentes passagens foram escolhidas para analisar o nível de atenuação, imunogenicidade e capacidade protetora em modelos animais (Whitehead *et al.*, 2007). Embora os candidatos monovalentes tenham sido bem-sucedidos em testes em humanos, foi observada interferência entre os sorotipos em formulações tetravalentes testadas, com DENV-1 apresentando-se pouco atenuado em relação aos outros sorotipos (Sun *et al.*, 2003).

Os testes clínicos são conduzidos pelo WRAIR e pela GlaxoSmithKline e 16 diferentes formulações tetravalentes foram analisadas em humanos (Edelman *et al.*, 2003). Formulações tetravalentes estão em teste de Fase II na América do Norte e no Sudeste Asiático (Whitehead *et al.*, 2007) e os fabricantes ainda tentam aperfeiçoar a formulação da vacina (Hombach, 2007).

O Instituto Nacional de Saúde (NIH) dos Estados Unidos da América também está desenvolvendo uma vacina atenuada contra o vírus. Porém, diferentemente das candidatas anteriores, técnicas de biologia molecular foram utilizadas para atenuar o vírus por meio de uma deleção de 30 nucleotídeos na sua região 3' não traduzida (3'UTR) (Whitehead *et al.*, 2003). Outra estratégia do mesmo instituto é o desenvolvimento de vacinas quiméricas

contendo os genes prM/E de DENV-1, 2 e 3 no vírus atenuado de DENV-4 que contém a deleção e 30 nts no 3' UTR (Blaney *et al.*, 2006).

Seguindo a mesma estratégia dos vírus quiméricos, as empresas farmacêuticas Acambis e Sanofi Pasteur criaram a ChimeriVax, uma vacina quimérica onde os genes prM/E dos quatro sorotipos da dengue são inseridos no vírus vacinal da febre amarela FA 17D (Guirakhoo *et al.*, 2001). A formulação tetravalente foi administrada em voluntários com um esquema de duas doses e os dados após a primeira dose mostraram boa imunogenicidade, mas uma soroconversão parcial (OMS, 2006). A vacina também foi testada em voluntários com imunidade prévia a febre amarela e nenhuma interferência no nível da resposta imune foi detectada (Guirakhoo *et al.*, 2006).

Vacinas quiméricas dengue/dengue estão sendo desenvolvidas pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América (CDC), mas ainda se encontram em ensaios pré-clínicos (Huang *et al.*, 2003). A companhia Hawaii Biotech está investindo em vacinas recombinantes onde as proteínas E/NS1 são expressas em células S2 de *Drosophila melanogaster* (Putnak *et al.*, 2005) e testes clínicos de Fase I devem começar em breve. Existem ainda vacinas de DNA sendo desenvolvidas pelo Centro de Pesquisas Médicas da Marinha Americana (Raviprakash *et al.*, 2003). O quadro 1.1 sumariza as principais iniciativas de desenvolvimento de vacinas no mundo.

Quadro 1.1 - Principais candidatos vacinais contra DENV.

Estratégia	Responsável pelo projeto	Antígenos ou genes de DENV	Fase clínica
Vírus atenuado por passagem em cultura de células	Universidade do Mahidol / Sanofi Pasteur	Todo o vírus; tetravalente	Fase I e II, sem teste atual
Vírus atenuado por passagem em cultura de células	WRAIR / GlaxoSmithKline	Todo o vírus; tetravalente	Fase II
Vírus atenuado por deleção no 3'UTR / vírus quimérico	NIH	Todo o vírus; tetravalente	Fase I/II
Quimera prM/E de dengue no FA17D	Acambis / Sanofi Pasteur	prM/E; tetravalente	Fase I/II
Subunidade: E/NS1 e adjuvantes DNA	Hawaii Biotch Marinha Americana	E/NS1; tetravalente pM/E; monovalente (DENV-1)	Pré-clínico Fase I

Adaptado de Hombach *et al.*, 2007; Whitehead *et al.*, 2007.

1.2.4 Proteína do Envelope de dengue

A proteína do envelope (E) possui entre 53-54 kDa sendo a maior proteína estrutural do vírus e com conservação de 40 % entre os *Flavivirus* (Chambers *et al.*, 1990). Ela é o principal imunógeno do vírus uma vez que 180 monômeros ou 90 dímeros dessa proteína recobrem a superfície do vírion (Kuhn *et al.*, 2002). Entretanto, a baixo pH, especialmente

dentro do endossomo, os dímeros da proteína E sofrem uma reorganização conformacional irreversível que origina trímeros (Allison *et al.*, 1995a; Kuhn *et al.*, 2002) permitindo a fusão da membrana viral com a membrana do endossomo e a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular (Modis *et al.*, 2004).

Proteínas na superfície do vírus geralmente são os maiores determinantes do espectro de hospedeiros, do tropismo celular e da virulência/atenuação (Rey *et al.*, 1995). Isso é corroborado pelo fato da proteína E possuir um papel fundamental na montagem do vírion (Allison *et al.*, 1995b), na ligação com o receptor da célula hospedeira (Chen *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Hung *et al.*, 2004), na fusão de membranas (Allison *et al.*, 2001), além de induzir anticorpos neutralizantes (Heinz, 1986; Rey *et al.*, 1995; Modis *et al.*, 2005).

Essa proteína é composta por um ectodomínio formado por 395 aa do N-terminal (Heinz *et al.*, 1991) e uma região conhecida como haste-âncora que engloba os 100 aa da extremidade C-terminal e ancora a proteína na membrana viral (Rey *et al.*, 1995). Por ter sido o primeiro artigo a determinar a estrutura da proteína E de um *Flavivírus* (nesse caso, TBE) com boa resolução e pelo fato de E ser bastante conservada, as informações contidas em Rey *et al.* (1995) serão utilizadas na descrição da estrutura da proteína E que se segue, a menos quando indicado.

O ectodomínio da proteína possui seis pontes dissulfeto bastante conservadas e organiza-se em três diferentes domínios. A figura 1.7 ilustra a estrutura do ectodomínio com seus três domínios. O domínio I (DI), em vermelho na figura 1.7, possui duas pontes dissulfeto e um sítio de glicosilação no aminoácido 153 (Modis *et al.*, 2005). É o domínio central do monômero sendo formado por aproximadamente 120 aa. Sua conformação é de barril β composto por duas folhas contendo 8 fitas β .

O domínio II (DII), em amarelo na figura 1.7, é formado por dois segmentos que intercalam a seqüência do DI totalizando cerca de 160 aa, possui três pontes dissulfeto além de um sítio para glicosilação no aminoácido 67 (Modis *et al.*, 2005). Ele é conhecido como domínio de dimerização por ser responsável pela maior parte dos contatos existentes entre os monômeros do dímero. É uma estrutura estendida formada por 13 fitas β e duas α -hélices que se dividem em uma base e uma parte alongada formada por um sanduíche de folhas β . Este domínio está relacionado com a indução de anticorpos não específicos, que possuem reação cruzada com outros *Flavivírus* (Heinz, 1986).

Os resíduos 98 a 113 são altamente conservados entre os *Flavivírus* e constituem o peptídeo ou alça de fusão responsável pela fusão do vírus com a membrana do endossomo durante a acidificação deste compartimento (Roehrig *et al.*, 1989; Allison *et al.*, 2001; Modis *et al.*, 2004). Estes resíduos são hidrofóbicos e ficam enterrados no dímero nativo, interagindo

com resíduos de DI/DIII. As fitas k e l do DII formam um bolso hidrofóbico que funciona como uma dobradiça nas mudanças conformacionais que ocorrem durante a trimerização de E em pH ácido (Modis *et al.*, 2003; 2004).

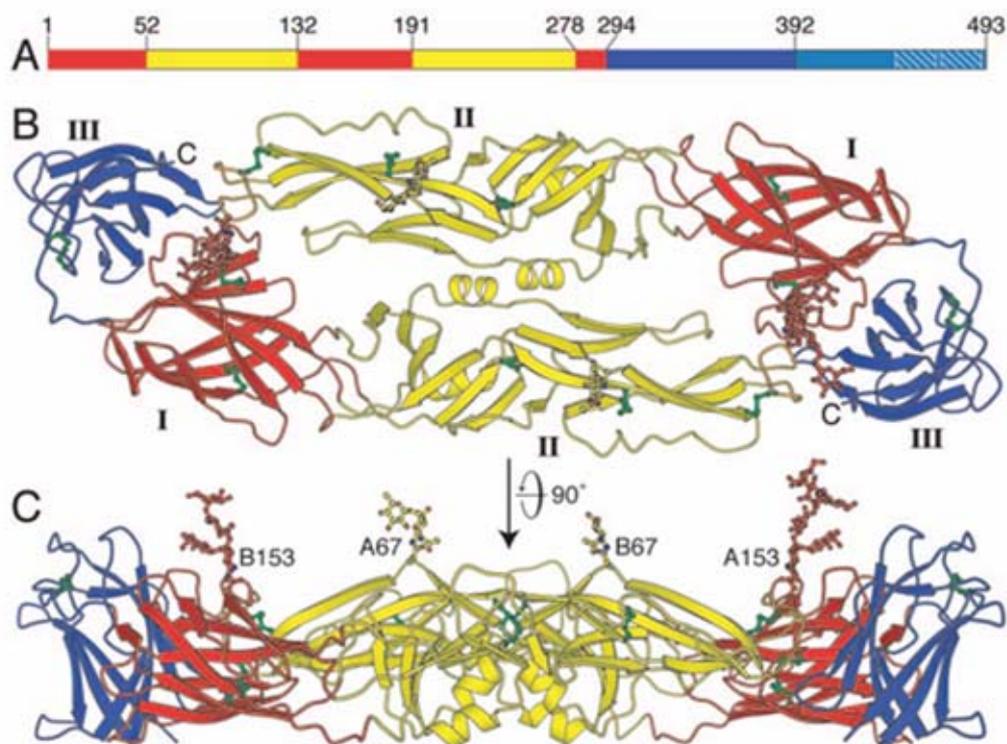


Figura 1.7. Estrutura do dímero da proteína E de DENV-3 na partícula viral madura. (A) Representação linear da sequência da proteína E com seu ectodomínio (aminoácidos 1 a 392) e sua região haste-âncora (aminoácidos 392-493). O ectodomínio é composto por três domínios: domínio I em vermelho, domínio II em amarelo e domínio III em azul. Dímero de E com visão da superfície do vírion, ao longo do eixo de simetria (B) ou lateral, perpendicular ao eixo de simetria (C). Os dois glicanos nos aminoácidos 67 e 153 estão representados e as pontes dissulfeto estão em verde. Fonte: Modis *et al.*, 2005.

O domínio III (DIII), representado em azul na figura 1.7, é o domínio C-terminal formado pelos aa 294-392 (Modis *et al.*, 2005), contém uma ponte dissulfeto e é conhecido como *imunoglobulina-like* devido à sua conformação. Ele é formado por nove fitas β que se organizam em um barril cujo eixo é perpendicular à superfície do vírion. Como resultado, a ponta do DIII projeta-se na superfície do vírus sendo mais exposta do que qualquer outra estrutura do dímero. As fitas β de DIII foram nomeadas seguindo o descrito por Volk *et al.* (2007). Esse domínio conecta-se ao DI por meio da alça $I_0\beta_1$ e sua folha β composta pelas fitas β_1 , β_2 , β_5 e β_7 tem contato com a alça de fusão presente no DII do monômero adjacente. A folha β formada pelas fitas β_4 , β_7 , β_8 forma a superfície lateral externa do dímero. Esse

domínio será descrito com mais detalhes posteriormente (item 1.2.3.1), uma vez que se constitui na proteína alvo a ser expressa entre E/NS1 do vírus FA 17D.

Os últimos 100 aa de E delimitam uma região conhecida como haste-âncora (HA) e que não faz parte do ectodomínio cuja estrutura foi descrita (Rey *et al.*, 1995; Modis *et al.*, 2005). A região da haste é composta por duas α -hélices (H1 e H2), um segmento conector (CS) e faz contato com o lado do ectodomínio de E mais próximo aos lipídeos do envelope viral, possivelmente neutralizando repulsões eletrostáticas entre esse lado do ectodomínio e a camada externa de fosfolipídeos (Zhang *et al.*, 2004). A primeira hélice, H1, forma um ângulo com a camada externa da membrana lipídica, enquanto a segunda hélice, H2, fica sobre essa membrana com o seu lado hidrofóbico estabelecendo contatos com a mesma (Zhang *et al.*, 2003; Mukhopadhyay *et al.*, 2005). A região da âncora permanece associada à membrana por meio de dois domínios hidrofóbicos presentes nas suas duas α -hélices anti-paralelas transmembranas (TM1 e TM2) (Zhang *et al.*, 2003).

Elementos funcionais na região HA foram mapeados por Allison *et al.*, (1999): H1 está envolvido com o processo de trimerização da proteína E que ocorre em pH ácido; H2 e TM1 são importantes na estabilização das interações que ocorrem no heterodímero prM/E durante a formação do envelope viral. Já o elemento CS, embora seja a parte da haste mais conservada entre os *Flavivírus* (Stiasny *et al.*, 1996), não foi relacionado à função específica alguma (Allison *et al.*, 1999).

TM1 serve como uma âncora para E sendo necessária para a incorporação dessa proteína nas partículas virais; TM2 funciona como uma seqüência sinal para NS1 e interações entre essas duas âncoras são fundamentais na formação do envelope viral (Allison *et al.*, 1999; Op De Beeck *et al.*, 2003). Esses dois domínios transmembrana também funcionam como sinais de retenção no RER da célula hospedeira, embora apenas TM1 já contenha informação suficiente para essa localização de E (Op De Beeck *et al.*, 2004). A figura 1.8 ilustra os diferentes elementos de HA e sua disposição em relação ao dímero de E e à membrana.

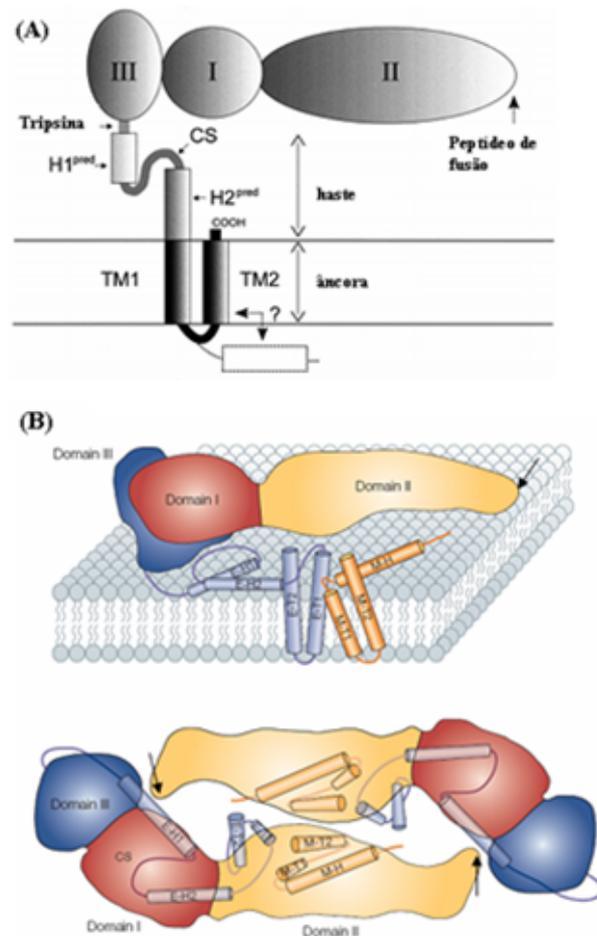


Figura 1.8. Diagrama esquemático da proteína E com seu ectodomínio e sua região HA no envelope viral. (A) Esquema de um monômero da proteína E com os domínios (I, II, III) e a região HA (H1, H2, CS, TM1, TM2). O peptídeo de fusão na extremidade do DII e o sítio de clivagem pela tripsina no final de DIII estão indicados. O envelope do vírus é representado por linhas paralelas e as porções de HA correspondentes à haste e à âncora estão indicadas. (B) Diagrama do ectodomínio e do domínio transmembrana da proteína E em vista lateral (superior) e da superfície do vírion (inferior). As HAS de E e M estão em azul e laranja, respectivamente. As cores do ectodomínio são as mesmas da figura 1.7. O peptídeo de fusão na extremidade de DII está indicado por setas pretas. Modificado de Allison *et al.*, 1999 (A); Zhang *et al.*, 2003 (B).

1.2.4.1 O domínio III da proteína E

A estrutura tridimensional do DIII já foi determinada por cristalografia de raios X para DENV-2 (Modis *et al.*, 2003) e DENV-3 (Modis *et al.*, 2005) e por ressonância magnética nuclear (RMN) para DENV-4 (Volk *et al.*, 2007). Esse domínio tem a estrutura de um barril formado por nove fitas β organizadas em três folhas. A figura 1.9 ilustra a estrutura do DIII mostrando a disposição das fitas β organizadas em três folhas com a nomenclatura utilizada neste trabalho.

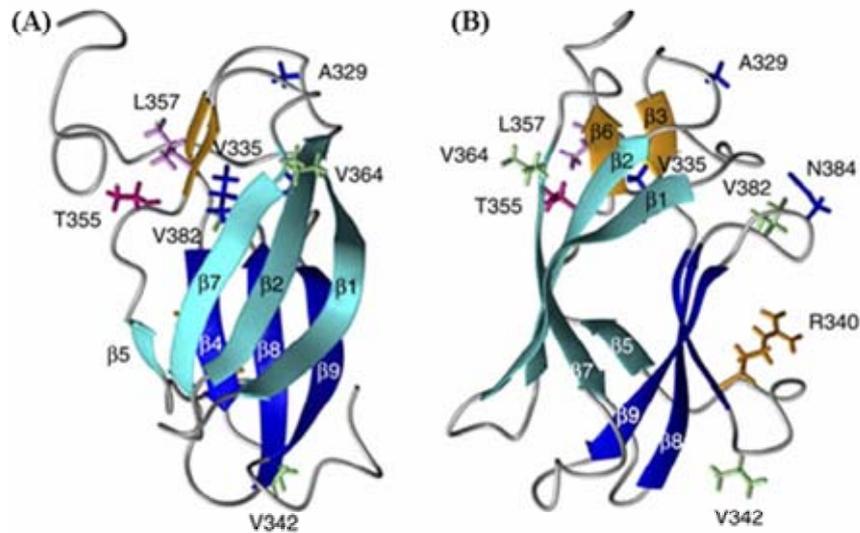


Figura 1.9. Duas vistas ortogonais de um diagrama da estrutura do DIII de DENV-4. A estrutura de barril desse domínio é formada por nove fitas β (β 1- β 9) organizadas em três folhas (azul claro, azul escuro e marrom claro) nas vistas externa (A) e lateral (B). As cadeias laterais dos resíduos que diferem entre as duas linhagens mais divergentes de DENV-4 estão representadas por bastões. Fonte: Volk *et al.*, 2007.

Embora a estrutura tridimensional desse domínio seja bastante conservada entre os *Flavivírus*, cada vírus possui uma superfície eletrostática única que é responsável pelas diferenças de antigenicidade e de outras propriedades biológicas (Volk *et al.*, 2007). Esse domínio participa da maioria dos eventos biológicos relevantes relacionados à patogenicidade do vírus como ligação ao receptor do hospedeiro (Chen *et al.*, 1996), virulência, neurovirulência e atenuação (Sanchez & Ruiz, 1996; Leitmeyer *et al.*, 1999). Além disso, anticorpos dirigidos a ele são sorotipo-específicos e os mais eficientes na neutralização da infecção celular (Roehrig, 2003).

O DIII possui conformação de *imunoglobulina-like* e, nos *Flavivírus* transmitidos por mosquitos, a alça entre as fitas β 8- β 9 é quatro resíduos maior do que nos demais *Flavivírus* (Chu *et al.*, 2005), o que fez com que se especulasse sobre a função desse domínio na ligação a receptores da célula hospedeira (Rey *et al.*, 1995). Entre os vírus transmitidos por mosquitos, febre amarela, ecefalite Japonesa e encefalite do vale Murray possuem nessa alça o motivo RGD (uma lista com todos os aminoácidos encontra-se na seção de anexos) que, supostamente, estaria relacionado com a ligação a integrinas. Outro *Flavivírus*, o vírus do Oeste do Nilo (WNV, do Inglês *West Nile Virus*), liga-se a receptores celulares do tipo integrina α V β 3 por meio de seu DIII (Chu & Ng, 2004; Lee *et al.*, 2006).

Até o presente, não há descrição na literatura que indique a utilização desse receptor celular pelos DENV. Contudo, os vírus ligam-se a heparan sulfato (HS) em células de mamíferos como Vero (células de rim de macaco verde africano), CHO (células de ovário de hamster chinês) e células de hepatoma humano (Chen *et al.*, 1997; Hilgard & Stokert 2000; Germi *et al.*, 2002).

Essa ligação seria mediada por resíduos com cargas positivas presentes no DIII que se ligariam a HS, altamente negativos (Chen *et al.*, 1997; Hung *et al.*, 2004). Entretanto, como heparan sulfato é expresso de forma ubíqua em muitos tipos celulares e é comumente utilizado por outros patógenos para entrar na célula, um co-receptor adicional deve ser utilizado pelo vírus, o que explicaria o tropismo celular limitado dos DENV (Hung *et al.*, 2004).

Para a ligação em células de insetos, foi mapeada uma alça lateral do DIII entre as fitas $\beta 8$ - $\beta 9$ que teria um papel importante na ligação à células de *Ae. albopictus* clone C6/36 (Hung *et al.*, 2004). Recentemente, foi sugerido que dois receptores (R67 e R80) presentes em células do clone C6/36 e em células do intestino de *Ae. aegypti* funcionem como receptores para os quatro sorotipos de dengue (Mercado-Curiel *et al.*, 2006).

Como descrito anteriormente, anticorpos contra o DIII são sorotipo-específicos e são os mais eficientes na neutralização da infecção celular (Roehrig, 2003). Anticorpos monoclonais que se ligam a esse domínio são os mais eficientes em bloquear a adsorção do vírus às células Vero (Crill & Roehrig, 2001) e praticamente todas as mutações que levam ao escape de neutralização por anticorpos sorotipo-específicos agrupam-se no DIII da proteína E (Modis *et al.*, 2005). Vários estudos com anticorpos monoclonais já mapearam epítomos presentes no DIII de diversos *Flavivírus* (Lin *et al.*, 1994; Hiramatsu *et al.*, 1996; Nybakken *et al.*, 2005; Lisova *et al.*, 2007). A figura 1.10 está representando epítomos envolvidos com o escape de neutralização de DENV que já foram relatados na literatura.

O resíduo 388 de DENV-3 (em rosa na figura 1.10) está relacionado com virulência/neurovirulência e atenuação do genótipo. Sánchez & Ruiz (1996) descrevem que substituições nessa posição alteraram a neurovirulência de DENV em camundongos, enquanto outro trabalho que analisou genomas virais procedentes diretamente do sangue de pacientes mostrou que uma asparagina nessa posição está relacionada com maior incidência de DHF, ao passo que um ácido aspártico está mais relacionado a casos de dengue clássica (Leitmeyer *et al.*, 1999).

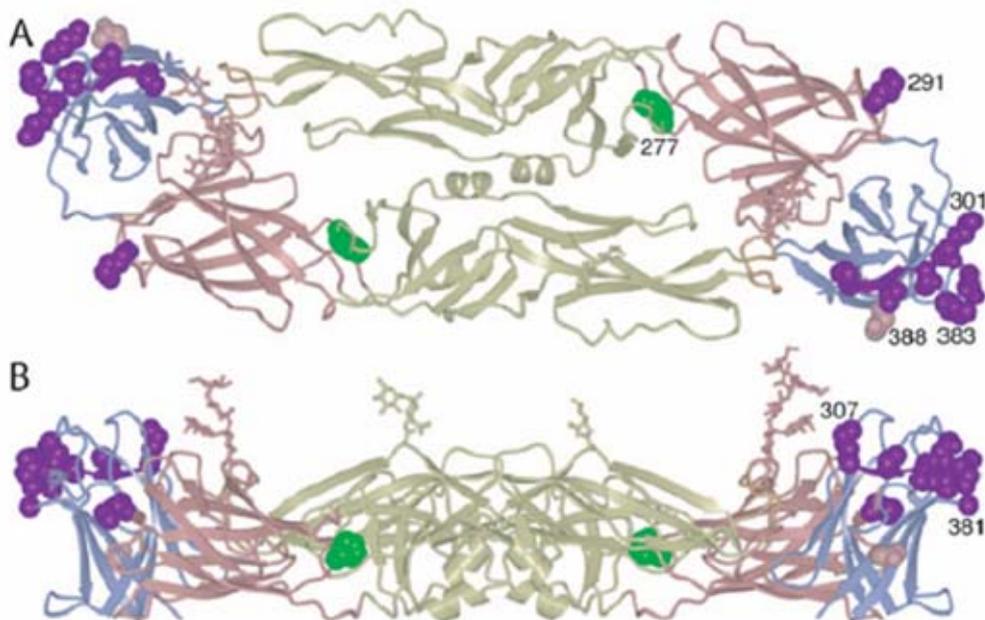


Figura 1.10. Mutantes de escape de neutralização em DENV. O dímero da proteína E é mostrado em visão frontal (A) ou lateral (B) com os epítomos sorotipo-específicos mapeados representados por esferas roxas. Apenas o epítopo 291 não está presente no DIII de E. O resíduo 388 (mostrado em rosa) está relacionado com maior ou menor virulência do genótipo. Três epítomos sorotipo-específicos foram mapeados: resíduo 291 no DII, resíduos 301-307 (Lin *et al.*, 1994) e resíduos 381-383 (Hiramatsu *et al.*, 1996; Hung *et al.*, 2004), ambos no DIII. Em verde está mapeada Phe-277 conservada em todos os sorotipos de dengue. Fonte: Modis *et al.*, 2005.

1.3 Vacina de febre amarela FA 17D

O vírus FA é o protótipo da família *Flaviviridae* (Burke & Monath, 2001) tendo sido isolado pela primeira vez em 1927 pelos americanos (genótipo *Asibi*) por meio da inoculação de sangue de um paciente sintomático em macacos rhesus (Stokes *et al.*, 1928). A vacina contra a febre amarela foi desenvolvida por Theiler & Smith (1937) que reportaram atenuação do genótipo *Asibi* após sucessivas passagens em embrião de galinha e demonstraram o uso desse novo vírus atenuado, denominado 17D, para a imunização humana.

A vacina FA 17D é utilizada em todo o mundo há 70 anos com mais de 400 milhões de doses administradas e relatos de indução eficaz de anticorpos neutralizantes: níveis protetores de anticorpos neutralizantes são encontrados em 90 % dos vacinados dez dias após a imunização e em 99 % dos vacinados dentro de 30 dias (Monath, 2001). Além disso, esta vacina é segura e de baixo custo com uma boa relação de custo-benefício mesmo para países em desenvolvimento endêmicos (Monath & Nasidi, 1993).

Apenas uma dose de FA 17D promove proteção duradoura por um período de 10 anos, com alguns indivíduos apresentando anticorpos neutralizantes mesmo 35 anos após a

vacinação (Poland *et al.*, 1981). A imunização com o vírus FA 17D é capaz de promover resposta imune mediada por linfócitos T (Co *et al.*, 2002), sendo a infecção de células dendríticas humanas imaturas e maduras e a posterior ativação de linfócitos T um dos possíveis mecanismos (Barba-Spaeth *et al.*, 2005).

Bio-Manguinhos produz a vacina de FA genótipo 17DD, derivado do genótipo selvagem *Asibi*. O vírus selvagem foi isolado em macaco e cultivado em tecido embrionário de camundongo e em embriões de galinha levando à obtenção do genótipo parental 17D na passagem de número 180 (Theiler & Smith, 1937). Esse vírus parental originou os genótipos 17DD na passagem 195 e 17D-204 na passagem 204 (Galler *et al.*, 1998). O genótipo 17DD foi novamente passado em cultura de células até a sua passagem atual de número 287 que é a utilizada para produção de vacinas por Bio-Manguinhos (Freire, 2004). Atualmente, existem dois genótipos utilizados na vacinação mundial: 17DD e 17D-204 que diferem em 10 resíduos de aminoácidos, sendo que o genótipo 17DD é o mais estável geneticamente (Galler *et al.*, 1998). A figura 1.11 ilustra o histórico de passagens de vírus vacinais de FA, desde o vírus selvagem *Asibi*.

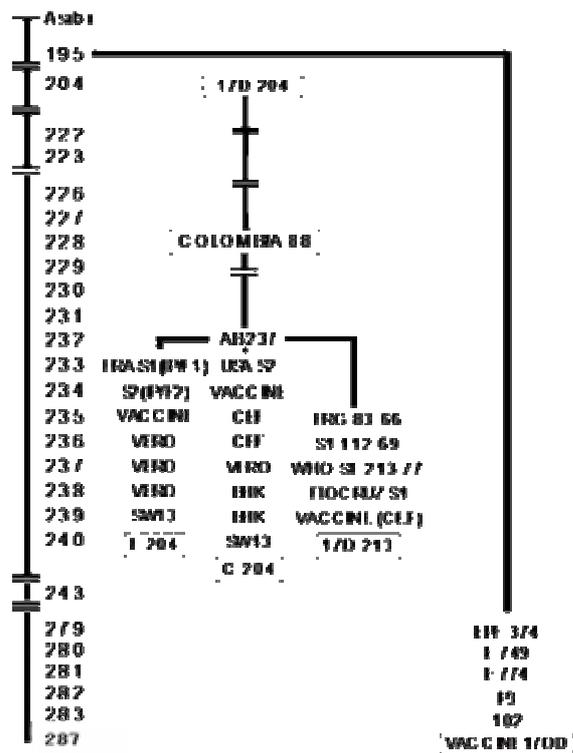


Figura 1.11. Histórico de passagem dos genótipos vacinais de febre amarela desde o vírus selvagem *Asibi*. O vírus *Asibi* foi cultivado em tecido embrionário de camundongo e em embriões de galinha levando à obtenção do genótipo parental 17D na passagem de número 180. O 17D originou os genótipos 17DD na passagem 195 e 17D-204 na passagem 204. O genótipo 17DD foi novamente passado em cultura de células até a sua passagem atual de número 287 que é a utilizada para produção de vacinas por Bio-Manguinhos. Adaptado de Galler *et al.*, 1998.

2. JUSTIFICATIVA

A manipulação do genoma do vírus vacinal de febre amarela só é possível devido à tecnologia do clone infeccioso desenvolvida por Rice *et al.* (1989). Essa tecnologia consiste em acondicionar o genoma do vírus sob a forma de cDNA em dois plasmídeos bacterianos, um contendo a região central do genoma (pYFM5.2) e outro as regiões 5' e 3' do vírus além de um promotor do fago SP6 (pYF5'3'IV).

O genoma do vírus vacinal de FA acondicionado nos plasmídeos pode ser modificado pelas técnicas de manipulação genética molecular e o molde de cDNA do genoma viral é obtido após clivagens com endonucleases específicas e união dos dois plasmídeos por meio de uma reação de ligação com a T4 DNA ligase. O molde é linearizado com uma nova digestão por uma endonuclease específica, transcrito *in vitro* por meio do promotor SP6 e o RNA sintetizado é utilizado para transfectar células. O vírus obtido por meio dessa tecnologia é idêntico ao do genótipo parental utilizado para a clonagem do cDNA nos plasmídeos (Rice *et al.*, 1989).

Os plasmídeos originais que derivam do 17D-204 foram modificados por Jabor (2001) por meio de mutações sítio-dirigidas nas proteínas E e NS5, de modo a obter uma versão do clone infeccioso mais próxima do 17DD, para originar vírus amarílico com fenótipo vacinal, demonstrado por teste de neurovirulência em macaco.

No Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), onde foi desenvolvido este trabalho, a tecnologia do clone infeccioso é utilizada rotineiramente na construção de vírus recombinantes utilizando o vírus FA 17D como plataforma de expressão de proteínas heterólogas ou como plataforma de substituição de genes estruturais para a construção de vírus quiméricos. (Bonaldo *et al.*, 2000; 2002; 2005; 2006; 2007; Galler *et al.*, 2005; Mateu *et al.*, 2007). A construção de vírus quiméricos substituindo os genes estruturais prM/E de FA 17D pelos de outros *Flavivírus* têm tido bastante sucesso (Guikharoo *et al.*, 2001; Caufour *et al.*, 2001; Galler *et al.*, 2005; Mateu *et al.*, 2007), mas limita o uso de FA 17D para expressão de proteínas de *Flavivírus*.

A inserção de epítomos em diversas regiões do genoma de FA 17D já foi testada em nosso grupo, assim como por outros grupos de pesquisa. A inserção de epítomos na região intergênica NS2B/NS3 flanqueado pelo motivo de clivagem da protease permitiria a liberação da proteína inserida nessa região para o citoplasma celular (McAllister *et al.*, 2000; Tao *et al.*, 2005) e foi alvo de uma patente americana (Patente americana nº 6.589.531). Entretanto, esta região sofre limitação em relação ao tamanho do inserto a ser inserido (Bonaldo MC & Galler R, comunicação pessoal)

Inserções no 3'UTR do FA 17D foram cogitadas, mas todos os vírus obtidos em nosso laboratório por meio dessa metodologia foram geneticamente instáveis e perderam a inserção heteróloga na primeira passagem em monocamada celular (Bonaldo MC, comunicação pessoal). Estes resultados foram confirmados por outros autores (Pierson *et al.*, 2005). Alças da proteína E também foram utilizadas para inserção de seqüências exógenas pelo nosso grupo que expressou peptídeos na alça *fg* dessa proteína (Bonaldo *et al.*, 2002; 2005; 2006). A alça *E₀F₀* também foi estudada pelo nosso grupo (Bonaldo MC, comunicação pessoal).

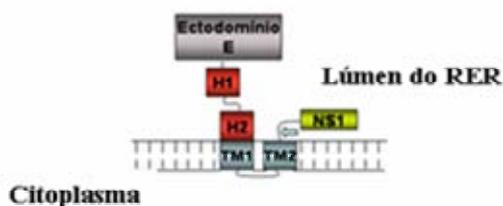
A última abordagem desenvolvida pelo nosso grupo foi alvo de uma patente (Bonaldo & Galler, 2005, Nº 20050121605 de 31/10/2005) e visa a inserção de proteínas heterólogas, flaqueadas por algumas seqüências-chave, entre E/NS1 do vírus FA 17D. Essa região foi escolhida por ser uma região natural de transição no genoma dos *Flavivírus*, delimitando duas porções funcionais, a primeira codificando os genes estruturais e a segunda, os genes não estruturais. Isso permite que seqüências maiores sejam inseridas na região.

A proteína inserida entre E/NS1 é sempre fusionada no seu N-terminal aos nove aa do N-terminal de NS1 que codificam para a seqüência reconhecida pela peptidase sinal e, no seu C-terminal, à região haste-âncora da proteína E. O objetivo dessas seqüências flanqueando o inserto é permitir o correto endereçamento e translocação da poliproteína viral que é processada em associação com o RER da célula hospedeira, garantindo a viabilidade e estabilidade do vírus recombinante (Chambers *et al.*, 1990).

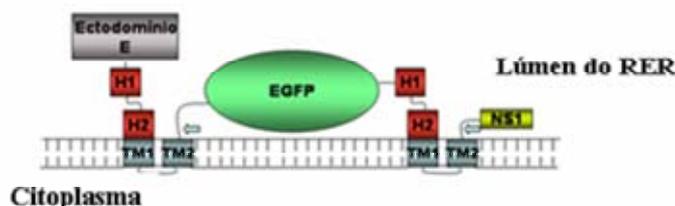
Bredenbeek *et al.* (2006) elegeram o mesmo sítio para inserir a glicoproteína de vírus de Lassa na região intergênica E/NS1 de FA 17D, porém as seqüências que flanqueavam o inserto eram diferentes. Os primeiros vírus construídos com essa tecnologia em nosso laboratório expressavam a proteína autofluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*) na região intergênica E/NS1 de FA 17D e tinham fusionado ao C-terminal da GFP a região HA completa ou truncada (sem os elementos H1 e CS) de FA (Bonaldo *et al.*, 2007; Mello, 2007).

Esses estudos mostraram que quanto menor a identidade entre a HA do cassete heterólogo e a HA presente na proteína E do FA 17D, mais estável geneticamente é o vírus. Por isso, uma nova geração de vírus foi construída utilizando essa mesma tecnologia, porém substituindo a HA completa e truncada de FA pela de DENV-4 (Oliveira, 2008). Essa segunda geração de vírus foi mais estável e teve níveis de replicação bastante satisfatórios, mostrando que essa é uma boa estratégia de inserção de proteínas heterólogas em FA 17D. A figura 2.1 ilustra a topologia na membrana do RER da célula hospedeira dos elementos envolvidos na inserção da proteína GFP entre E/NS1.

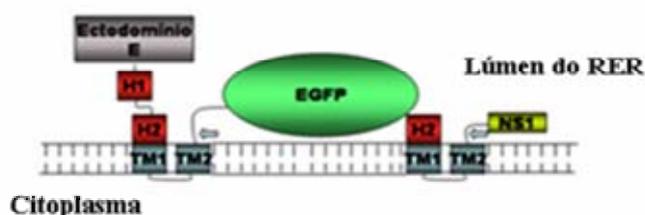
A) Proteína E do vírus da Febre Amarela



B) Construção I (Região Haste-âncora completa)



C) Construção II (Região Haste-âncora parcial)



← Signalase celular

Figura 2.1. Topologia na membrana do RER da célula hospedeira dos elementos envolvidos na inserção da proteína GFP entre E/NS1. (A) Topologia do vírus vacinal FA 17D sem o inserto de interesse. (B) e (C) ilustram a estratégia utilizada para fazer do vírus vacinal um vetor de expressão: a GFP foi fusionada no seu N-terminal com nove aminoácidos N-terminais de NS1 e, no seu C-terminal, com HA completa (B) ou truncada (C) (sem os elementos H1 e CS) de FA ou de DENV-4. Fonte: Laboratório de Biologia Molecular, IOC/FIOCRUZ.

Uma vez validado o vetor e a tecnologia utilizada para inserção de seqüências exógenas, resolvemos construir um vírus recombinante que pudesse servir de base para a construção de uma vacina contra a dengue. Como uma vacina contra a dengue deve ser tetravalente (Whitehead *et al.*, 2007), começamos com a construção de um vírus recombinante que expressaria o DIII da proteína E de DENV-3 entre E/NS1 do vírus FA 17D. Seguindo o estabelecido para os vírus anteriormente construídos com essa mesma tecnologia, o DIII de DENV-3 estaria fusionado no seu N-terminal aos nove primeiros aa de NS1 e, no seu C-terminal, à HA truncada de DENV-4.

O DIII foi escolhido como proteína alvo nesta dissertação para ser expresso pelo vírus vacinal da febre amarela 17D com a finalidade de se desenvolver uma vacina contra a dengue. Devido às características anteriormente descritas, espera-se que a expressão deste domínio induza à formação de anticorpos neutralizantes específicos para cada sorotipo de DENV a fim de proteger contra a infecção viral.

Assim, o vírion recombinante é uma partícula do vírus FA 17D, que ao infectar uma célula expressa no seu interior o polipeptídeo exógeno, o DIII de DENV-3. Uma formulação tetravalente com quatro construções do vírus FA 17D expressando o DIII de cada um dos sorotipos de dengue entre E/NS1 poderia levar ao desenvolvimento de uma vacina atenuada combinada contra dengue e FA em que todos os sorotipos de dengue se replicariam de forma homogênea, sem que houvesse risco de uma exacerbação da resposta imune devido ao ADE.

A presente dissertação utiliza o vírus vacinal de FA 17D para expressar o DIII da proteína E de DENV-3 na região intergênica E/NS1. A escolha desse vetor deve-se às boas propriedades vacinais de FA 17D e ao fato de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ ser o maior produtor mundial da vacina.

3. OBJETIVOS

Geral: desenvolver / avaliar o potencial de desenvolvimento de uma vacina combinada contra os vírus da dengue e febre amarela por meio da expressão do domínio III da proteína do envelope de DENV-3 no vírus vacinal FA 17D.

Específicos:

- 1- Analisar a seqüência do DIII de DENV-3 16562, utilizado na construção do cassete de expressão, comparando-o com DIII de outros DENV, de modo a se determinar diferenças entre os genótipos/sorotipos.
- 2- Estudar a estrutura tridimensional do DIII de DENV-3 16562 por meio de modelagem molecular por homologia, mapeando regiões de interesse.
- 3- Construir vírus recombinante expressando o DIII de DENV-3 entre E/NS1 do vírus vacinal FA 17D.
- 4- Caracterizar biologicamente o vírus recombinante quanto ao título viral, cinética de replicação e estabilidade genética em monocamada de células Vero.
- 5- Determinar a expressão e localização celular do DIII de DENV-3 expresso pelo vírus recombinante.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todas as etapas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Transcrição Reversa seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), clonagens e obtenção do molde de cDNA do vírus recombinante foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, IOC/FIOCRUZ. Este laboratório é considerado nível 1 para Organismos Geneticamente Modificados (OGM) de acordo com a licença emitida pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio - CQB 105/99).

As etapas que envolvem manipulação de cultura de células e vírus foram realizadas no Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV/Bio-Manguinhos/FIOCRUZ). Este laboratório enquadra-se no nível 2 de biossegurança com instalações em concordância com o CQB 110/99 da CTNBio. Os reagentes de cultura de células utilizados nesta etapa foram fornecidos pelo Laboratório de Sarampo (LASA/Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) que segue as normas de qualidade de produção de insumos estabelecidas pela instituição.

As composições dos meios, soluções e reagentes utilizados encontram-se na seção 10.1 “Soluções e Reagentes” nos Anexos.

4.1 Cultura de células

Durante toda a dissertação foram utilizadas apenas células Vero que derivam de células epiteliais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) obtidas da Coleção Americana de Culturas e Depósitos (ATCC, 1994) e certificadas de acordo com o registro CCL-81 (*Certified Cell Line-81*). As células foram mantidas por técnicos do LATEV seguindo Protocolos Operacionais Padrão (POPs) desenvolvidos por Bio-Manguinhos. Os técnicos faziam passagens semanais de células congeladas na sua nona passagem até aproximadamente a vigésima passagem, após a qual um novo lote de células era descongelado e utilizado. Essa linhagem foi escolhida por ser adequada à produção e padronização de vacinas.

Antes de cada experimento, as células eram semeadas em garrafas ou placas apropriadas com 24 h de antecedência. Este procedimento consistia em tripsinizar a garrafa com as células por meio de dupla lavagem com uma solução de verseno e tripsina a 1 % seguida de incubação a 37° C por 5 min. Após esse período, as células eram resuspensas em 5 mL de meio 199/Earle completo com 0,22 % NaHCO₃ (ver seção 10.1) para neutralização da

reação e uma pequena alíquota era diluída a 1:20 e contada com o auxílio de uma câmara de Neubauer em microscópio de luz invertido.

As células eram plaqueadas com a quantidade adequada de meio 199/Earle completo com 0,11 % (sistema aberto) ou 0,22 % (sistema fechado) de NaHCO₃ e incubadas a 37° C em estufa com atmosfera de CO₂ (5 %) até o seu uso no dia seguinte.

4.2 Vírus utilizados

4.2.1 Vírus FA 17DD

Esse vírus foi utilizado como controle em todos os experimentos e consiste no próprio vírus vacinal obtido de Bio-Manguinhos na apresentação liofilizada, reconstituído e utilizado para infectar células Vero. A reconstituição consistiu em adicionar 2 mL de água bidestilada gelada, homogeneizar a solução em *vortex* por 30 s, incubar no gelo por 10 min e adicionar 3 mL de meio 199/Earle completo com 0,11 % de NaHCO₃.

Em seguida, toda a suspensão foi utilizada para propagar o vírus em monocamada de células Vero com 80000 células/cm² até visualização de efeito citopático (CPE) intenso (4° dia pós-infecção). O sobrenadante de cultura foi misturado ao estabilizador sorbitol 8 % e armazenado a -70° C em alíquotas de 1 mL.

4.2.2 Vírus FA 17D/G1.2/T3

Este é o vírus parental usado como controle em vários experimentos e cujo arcabouço genético foi utilizado para clonar o inserto de interesse e originar o vírus recombinante FA 17D/Esa/DIII_{DENV-3}. Ele é formado a partir do sistema de clones infecciosos com os plasmídeos pG1/2 e pT3, derivados dos plasmídeos originais pYF5'3'IV e pYFM5.2 (Rice *et al.*, 1989), respectivamente, que provêm da cepa 17D 204. Jabor (2001) construiu os plasmídeos pG1/2 e pT3 por meio de mutações sítio-dirigidas nas proteínas E e NS5 presentes nos plasmídeos originais. Este vírus, assim como o 17DD, possui um motivo de N-glicosilação na alça E₀F₀ da proteína E.

O plasmídeo pG1/2 de 6905 pb, contém as regiões 5' e 3' do genoma viral (posição genômica de 1 a 2271 e 8276 a 10862, respectivamente, do vírus FA) e tem alterações nos nucleotídeos 1140, 1436, 1437, 8656 e 9605; além do sítio para a enzima *Bst* EII (na posição 8656). Já o plasmídeo pT3 de 9939 pb contém a região central do vírus (posição genômica de 1373 a 9428 do vírus FA) e foi modificado nas posições 1946, 2219, 2220, 8656 e 8808; além do sítio para as enzimas *Sal* I e *Bst* EII (na posição 8656), tornando esse novo plasmídeo mais longo (de 9229 pb para 9939 pb).

Esse vírus foi regenerado juntamente com o vírus recombinante como controle da transfecção. O sobrenadante obtido foi utilizado para infectar células Vero em uma garrafa de 175 cm² com 80000 células/cm² até o aparecimento de CPE intenso (72 h p.i.). Após esse período, foi adicionado sorbitol 8 % à garrafa e o estoque do vírus foi coletado, aliquotado e estocado a -70° C.

4.2.3 Vírus Dengue 3 derivado de H87

Este vírus deriva do protótipo DENV-3 H87 isolado em 1956 de um caso humano de DHF nas Filipinas e pertence ao genótipo I que inclui cepas do Sudeste Asiático/Pacífico Sul (Lanciotti *et al.*, 1994). O número exato de passagens não é conhecido. Na Fiocruz, foram feitas três passagens seriadas em cérebro de camundongo lactente e mais dez em células Vero. A partir de uma amostra cedida pelo LATEV/Bio-Manguinhos, foi preparado um estoque viral que apresentou título de 6,20 log₁₀ PFU/mL.

4.2.4 Vírus Dengue 3 16562

O vírus foi originalmente isolado de paciente com DHF nas Filipinas e passado nove vezes em diferentes culturas de células: rim de macaco verde africano susceptíveis a SV40 (BSC-1), rim de macaco rhesus (LLC-MK2) e *Toxorhynchites amboinensis* e nos foi cedido pela Dr^a Claire Kubelka (Laboratório de Imunologia Viral, IOC/FIOCRUZ) sob a forma de sobrenadante viral na sua quarta passagem em células de *Ae. albopictus* clone C6/36.

4.3 Modelagem molecular por homologia

Esta parte da dissertação foi realizada no Instituto de Física da USP de São Carlos com o auxílio do Dr. Richard Garret e Dr. João Renato Muniz com o objetivo de modelar o DIII da proteína E do vírus dengue 3 16562, utilizado na construção do vírus recombinante. Inicialmente, foi feita uma busca por estruturas de proteínas resolvidas por cristalografia de raios X (as estruturas resolvidas por ressonância magnética nuclear ou criomicroscopia eletrônica não permitem esse tipo de modelagem) e que tivessem grande homologia com a seqüência de aminoácidos do DIII de DENV-3 16562 por meio de um BlastP (Altschul *et al.*, 1997; disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on) tendo como banco de dados o PDB (*Protein Data Bank*; <http://www.rcsb.org/pdb/>) (Berman *et al.*, 2000).

Uma vez escolhida a proteína molde do DIII de DENV-3 baseada no grau de homologia com a seqüência da proteína a ser modelada, foi realizado um alinhamento da

seqüência de aminoácidos dessas proteínas com o auxílio do programa Clustal X 1.83 (Jeanmougin *et al.*, 1998; www.ebi.ac.uk/clustalx/) utilizando matriz Blosum e *output* pir. Tendo o alinhamento, as coordenadas atômicas da proteína molde (obtidas no PDB) e o *script* com os comandos para o computador, esses arquivos foram abertos no programa MODELLER versão 9v2, r5542 (Sali & Blundell, 1993; <http://salilab.org/modeller/>) para geração do modelo que foi visualizado pelo PyMol v0.99 (DeLano, W.L.; DeLano Scientific, Palo Alto, CA, EUA; <http://www.pymol.org>)

O modelo foi validado apenas pela análise do seu gráfico de Ramachandran (Ramachandran *et al.*, 1963) por meio do programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993; www.biochem.ucl.ac.uk/~roman/procheck/procheck.html), uma vez que as proteínas molde e modelo possuíam homologia bastante elevada (96 %).

4.4 Extração de RNA total com TRIzol LS[®]

O protocolo utilizado segue as orientações do fabricante, tendo sido originalmente descrito por Chomczynski e Sacchi (1987) e Chomczynski (1993). Resumidamente, 750 µL de TRIzol LS[®] (Invitrogen) foram adicionados a 250 µL de suspensão viral. Esse reagente é uma mistura comercial de fenol, clorofórmio e isotiocianato de guanidina. Em seguida, esta mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 5 min. Após este tempo, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e a mistura foi homogeneizada vigorosamente por 15 s, seguidos de incubação por 5 min à temperatura ambiente. Após esta incubação, as amostras foram centrifugadas a 12000x g por 15 min para separação da mistura em três fases. A fase inferior possui restos celulares e o reagente TRIzol LS[®]; a fase intermediária possui proteínas; e a fase aquosa superior é a fase de interesse por possuir o RNA.

A fase aquosa foi cuidadosamente removida e transferida para outro tubo de 1,5 mL onde foram adicionados 1 µL de glicogênio (20 µg/µL; Invitrogen) e 500 µL de isopropanol absoluto. As amostras foram incubadas por 15 min, centrifugadas a 12000x g por 15 min e o sobrenadante descartado. Em seguida, foi adicionado 1 mL de etanol 70 % às amostras e estas foram novamente centrifugadas a 12000x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado, o RNA obtido foi ressuspenso em água livre de RNase e armazenado a - 70° C ou utilizado imediatamente na reação de RT-PCR.

4.5 Bactérias competentes.

Foram utilizadas duas cepas de células bacterianas competentes para as clonagens. A cepa DH5α-T1[®] (Invitrogen) foi utilizada na clonagem do cassete de expressão heteróloga no plasmídeo pCR-BluntII-TOPO[®]; enquanto a cepa Sure[®] (Stratagene) foi utilizada na

subclonagem desse cassete no plasmídeo bacteriano pT3. Ambas as células eram quimiocompetentes e suas características genóticas estão descritas no quadro 4.1.

Quadro 4.1 - Marcadores genóticos das células competentes utilizadas nas clonagens.

Cepa (<i>Escherichia coli</i>)	Marcadores Genóticos
DH5 α -T1 [®] (Invitrogen)	F ⁻ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻,m_k⁺</i>) <i>phoA supE44</i> <i>thi-1 gyrA96 relA1 tonA</i> (resistente ao fago T1)
SURE [®] (Stratagene) (<i>Stop Unwanted Rearrangement Events</i>)	<i>e14-(McrA-)</i> Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)171 <i>endA1</i> <i>gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB recJ sbcC</i> <i>umuC::Tn5</i> (Kan ^r) <i>uvrC</i> [F' <i>proAB lacIqZ</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^r)].

A preparação de células SURE quimiocompetentes baseou-se no protocolo de preparação de células competentes por cloreto de cálcio descrito por Sambrook *et al.* (1989), com modificações.

4.6 Preparações plasmidiais

Todas as preparações plasmidiais foram feitas com sistemas *QIAprep*[®] da QIAGEN que realizam preparações em pequena (*Miniprep*), média (*Midiprep*) ou grande (*Maxiprep*) escala. Para extrair ácidos nucleicos em pequena escala com o sistema *QIAprep Miniprep*[®] da QIAGEN, 3 mL da cultura de bactérias foram centrifugados por 1 min a 12000x g, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 250 μ L do tampão P1. Em seguida, 250 μ L do tampão P2 foram adicionados para que houvesse lise celular e 350 μ L da solução N3 foram adicionados para neutralizar a reação. A mistura foi centrifugada por 10 min a 14000x g e, em seguida, o sobrenadante foi aplicado na coluna de sílica. Após centrifugação, a coluna foi lavada com 500 μ L do tampão PB e 750 μ L do tampão PE. O DNA foi eluído em 50 μ L de tampão EB. A cada etapa onde utiliza-se a coluna, a passagem do líquido foi facilitada por centrifugação a 12000x g por 1 min.

O princípio das extrações com os sistemas de *Midiprep* e *Maxiprep* da QIAGEN é o mesmo do descrito anteriormente. A diferença é a quantidade de cultura de bactérias utilizada no início e a quantidade de DNA que se consegue ao final da purificação. De forma resumida, de 50 mL (midi) a 150 mL (maxi) (plasmídeos com alto número de cópias) ou de 150 mL (midi) a 250 mL (maxi) (plasmídeos com baixo número de cópias) de cultura de bactérias foram centrifugadas a 6000x g por 15 min a 4° C e o sedimento foi ressuspensionado em 6 mL (midi) ou 10 mL (maxi) do tampão P1. Depois, foi adicionada a mesma quantidade do tampão

P2 e a mistura foi deixada à temperatura ambiente por 5 min para que houvesse a lise das células.

Após a lise, foi adicionada a mesma quantidade do tampão P3 gelado que neutraliza a reação. Todo o lisado foi colocado em um cartucho com tampa e incubado a temperatura ambiente por 10 min. A coluna do sistema foi previamente equilibrada por meio da aplicação de 4 mL (midi) ou 10 mL (maxi) do tampão QBT. O líquido foi retirado do cartucho e passado na coluna com o auxílio de um êmbolo. Após a passagem do lisado, a coluna foi lavada com 20 mL (midi) ou 60 mL (maxi) de tampão QC e o DNA eluído em 5 mL (midi) ou 15 mL (maxi) de tampão QF. Após a eluição, o DNA foi precipitado com isopropanol, lavado com etanol 70 % e eluído em 1 mL de tampão TE.

4.7 Seqüenciamento de ácidos nucléicos

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

4.8 Construção do vírus recombinante

4.8.1 Estratégia de clonagem

Para utilizar o vírus vacinal FA 17D como vetor de expressão, desenvolveu-se uma estratégia de clonagem do cassete heterólogo entre os genes do E/NS1 (Bonaldo & Galler, 2005; nº 20050121605 de 31/10/2005). Para isso, algumas seqüências conservadas nessa região foram duplicadas: foram adicionados nove aa do N-terminal da proteína NS1 de FA antes do inserto e, após o inserto, a haste-âncora (HA) truncada (sem os elementos H1 e CS) de DENV-4 foi adicionada.

4.8.2 Obtenção do cassete de expressão

Inicialmente, obtivemos diversos genótipos de DENV-3 como BRA2000 (AY038605) e BRA2002 (AAT79552) cedidas pela Dr^a Rita Nogueira (Laboratório de Flavivírus, IOC/FIOCRUZ); H87 (M93130) cedida pela Dr^a Ada Alves (Laboratório de Imunopatologia, IOC/FIOCRUZ); 16562 cedida pela Dr^a Claire Kubelka (Laboratório de Imunologia Viral, IOC/FIOCRUZ) que foram utilizadas para amplificar a região gênica do DIII da proteína E de DENV-3. Entretanto, ao longo das tentativas para amplificar esse domínio, DENV-3 16562 foi a que conseguimos amplificar melhor e, por isso, foi escolhido para ser utilizado neste trabalho.

O vírus DENV-3 16562 foi cedido sob a forma de sobrenadante de células de *Ae. albopictus* clone C6/36 infectadas na sua quarta passagem. A partir de RNA extraído desse sobrenadante com o reagente TRIzol LS[®] (Invitrogen), foi amplificado o DIII da proteína E em uma reação de RT-PCR seguida de PCR utilizando-se os oligonucleotídeos RG 400 (+) e RG 401 (-) (Quadro 4.2). A reação de amplificação de material genético *in vitro* foi descrita pela primeira vez por Mullis *et al.* (1986). Na reação de RT-PCR foi utilizada a enzima termoestável ThermoScript RT[®] (Invitrogen) e no PCR a enzima Platinum Pfx[®] (derivada de *Thermococcus sp.* - Invitrogen) que possui atividade revisora 3'-5', originado fragmentos de pontas cegas (*blunt end*).

Quadro 4.2 – Oligonucleotídeos utilizados para obtenção do cassete de expressão.

Nome	Seqüência (5'-3') ^a	T _m ^b
RG 400 (+)	GGA GTT GGC GCC GAT CAA GGA TGC GCC ATC AAC TTT GGC AAG GGG ATG AGC TAT GCA ATG TG C	73,3° C
RG 401 (-)	CCT GGT GCA CAG CCT TTC CCA ATG ATG TAG AGC TTC CTT TCT TAT ACC AGT TG	68,2° C
RG 402 (+)	CAA CTG GTA TAA GAA AGG AAG CTC TAC ATC ATT GGG AAA GGC TGT GCA CCA GG	68,2° C
RG 380 (-)	GCC AAA GTT GAT GGC GCA TCC TTG ATC GGC GCC AAC TGT GAA GCC C	72,6° C

a. Cores: laranja – proteína E de FA; azul – proteína NS1 de FA; vermelho – DIII de DENV-3; verde – HA de DENV-4. Em itálico e negrito está a seqüência GGCGCC correspondente ao sítio de clivagem da endonuclease *Nar I*. **b. T_m:** do Inglês *Temperature Melting* é a temperatura em que 50 % da dupla hélice do DNA se dissocia em duas fitas simples.

Na reação de RT-PCR, 1 µL do RNA extraído foi adicionado a 1 µL do oligonucleotídeo negativo (todos os oligonucleotídeos usados em PCR e RT-PCR tinham

concentração de 20 pmoles/ μ L), 2 μ L de deoxirribonucleotídeos (dNTP) 10mM e água livre de nuclease para um volume final de 12 μ L. A mistura foi incubada a 65° C por 5 min para desnaturar os ácidos nucléicos.

Em seguida, foi adicionado um *mix* contendo 4 μ L do tampão 5 X de síntese de cDNA, 1 μ L de 1,4-ditiotreitol (DTT) 0,1 M, 1 μ L de inibidor de RNase RNaseOUT[®] (40 U/ μ L - Invitrogen), 1 μ L de água livre de nuclease e 1 μ L da enzima ThermoScript RT[®] (15 U/ μ L). As amostras foram colocadas em um termociclador a 65° C por 60 min e 85° C por 5 min onde houve a síntese do cDNA. Foi adicionado 1 μ L de *E. coli* RNase H (2 U/ μ L - Invitrogen) por tubo e as amostras foram incubadas a 37° C por 20 min. Durante esse período, o RNA foi degradado permanecendo o cDNA na reação.

A cada 2 μ L do molde de cDNA foram adicionados 5 μ L do tampão de amplificação 10 X *Pfx*[®], 1 μ L de MgSO₄ 50 mM, 1 μ L de dNTP 10 mM, 1 μ L do oligonucleotídeo positivo (RG 400) e 1 μ L do negativo (RG 401) (Quadro 4.2), 0,4 μ L de Platinum *Pfx* DNA Polimerase[®] (2,5 U/ μ L - Invitrogen) e água livre de RNase para um volume final de 50 μ L. As amostras foram colocadas no termociclador com o seguinte programa: 94° C por 5 min; 30 ciclos de 94° C por 15 s, 55° C por 30 s e 68° C por 35 s; uma extensão final de 5 min a 68° C.

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar o DIII (376 pb) foram um de sentido positivo (RG 400) correspondente às seqüências codificadoras para os quatro aa C-terminais da proteína E de FA, os nove aa N-terminais de NS1 de FA e os oito aa da região N-terminal do DIII de DENV-3; e um negativo (RG 401) contendo os 25 nt do C-terminal do DIII de DENV-3, além de 28 nt do N-terminal da HA truncada de DENV-4 (Quadro 4.2). Foram amplificadas as regiões: C-terminal da proteína E de FA (12 nt), N-terminal proteína NS1 de FA (27 nt), DIII da proteína E de DENV-3 16562 (309 nt), C-terminal da HA truncada de DENV-4 (19 nt) (Figura 4.1).

A região gênica correspondente a HA parcial da proteína E de DENV-4 foi amplificada em um PCR utilizando o mesmo sistema da Platinum *Pfx* DNA Polimerase[®] (Invitrogen) a partir de um plasmídeo contendo cDNA da quimera FA 17D/DENV-4, construída em nosso laboratório. A amplificação desses fragmentos foi feita como descrito anteriormente modificando-se apenas os oligonucleotídeos positivo (RG 402) e negativo (RG 380) (Quadro 4.2) e adicionando-se 1 μ L do plasmídeo usado como molde (30 ng/ μ L).

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar a região gênica da HA truncada de DENV-4 (250 pb) foram um positivo (RG 402) contendo 24 nt do C-terminal do DIII de DENV-3 e 28 nt do N-terminal da HA truncada de DENV-4; e um negativo (RG 380) contendo 19 nt do C-terminal da HA de DENV-4 e nove aa do N-terminal de NS1 de FA

(Quadro 4.2). Foram amplificados: C-terminal DIII DENV-3 16562 (25 nt), HA truncada DENV-4 (sem os elementos H1 e CS) (198 nt), N-terminal NS1 FA (27 nt) (Figura 4.1).

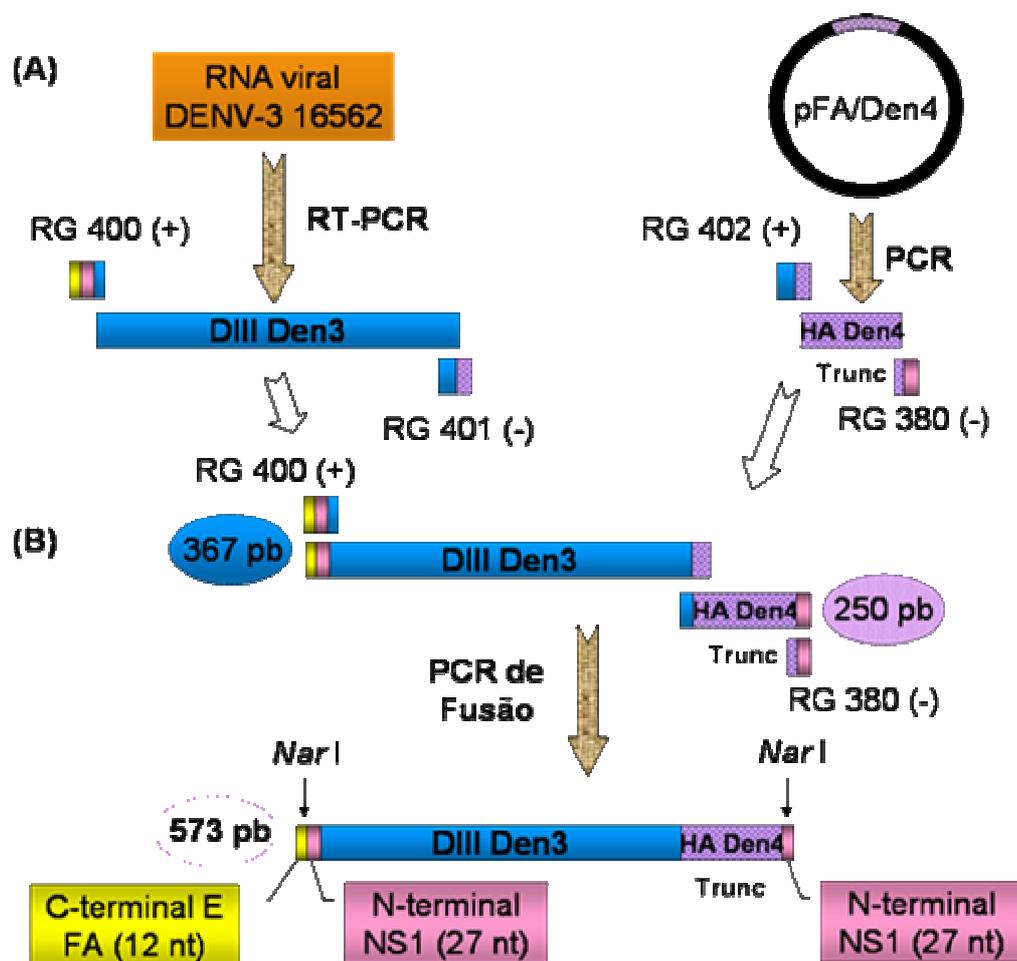


Figura 4.1. Esquema de amplificação do cassete de expressão heterólogo. (A) A região do DIII foi amplificada a partir de RNA viral do DENV-3 16562 com o oligonucleotídeo positivo RG 400 e o negativo RG 401. A HA truncada de DENV-4 foi amplificada a partir de um plasmídeo contendo cDNA da quimera FA 17D/DENV-4, utilizando o oligonucleotídeo positivo RG 402 e o negativo RG 380. (B) Os dois fragmentos de 367 pb e 250 pb, respectivamente, foram gerados com uma das extremidades complementares entre si. Esses fragmentos foram unidos por uma PCR de fusão utilizando os oligonucleotídeos das pontas não complementares o que gerou o cassete de expressão com 573 pb.

Os fragmentos gerados correspondentes ao DIII de DENV-3 e HA parcial de DENV-4 eram complementares em uma de suas extremidades e foram unidos por uma PCR de fusão utilizando os oligonucleotídeos das pontas não complementares (RG 400 e RG 380), gerando um cassete de expressão de 573 pb. Para isso, os fragmentos foram analisados em gel de agarose 0,8 %/tampão Tris acetato EDTA (TAE) corado com brometo de etídeo (BrEt) na concentração de 5 µg/mL e purificados a partir desse gel utilizando o sistema *QIAquick Gel*

Extraction[®] (QIAGEN). Resumidamente, a banda do gel que contém o DNA de interesse foi cortada e colocada em um tubo de 1,5 mL. À banda adicionou-se um volume do tampão QG correspondente a três vezes o seu peso (1,0 mg = 3,0 µL). A mistura foi homogeneizada e mantida a 50° C por 10 min. Em seguida, a mistura foi aplicada a uma coluna a qual foi centrifugada a 12000x g por 1 min e lavada com 0,75 mL da solução PE. O DNA foi eluído com 30-50 µL do tampão EB. A passagem do líquido pela coluna foi facilitada por centrifugação a 12000x g por 1 min em todos os passos.

Os fragmentos purificados foram quantificados em gel de agarose 0,8 %/TAE corado com BrEt por meio de análise comparativa com marcador *Low DNA Mass*[®] (Promega) e fusionados entre si por PCR de fusão utilizando a Platinum *Pfx* DNA Polimerase[®], como descrito anteriormente. Na reação de fusão, o DIII de DENV-3 e a HA parcial de DENV-4 foram colocadas de forma equimolar ou nas proporções de 1:3 e 3:1, sempre totalizando 70 ng de DNA total.

O fragmento obtido de 573 pb corresponde ao cassete de expressão a ser inserido entre E/NS1 no vírus FA 17DD. Para tal, a banda correspondente ao cassete foi purificada por eletroforese em gel de agarose 0,8 % em TAE, corado com BrEt, utilizando o sistema *QIAquick Gel Extraction*[®] e quantificada, como descrito anteriormente. O cassete de expressão é composto por 12 nt C-terminais da proteína E de FA, 27 nt N-terminais de NS1 de FA, 309 nt do DIII da proteína E de DENV-3 16562, 198 nt da HA truncada de DENV-4 e 21 nt do N-terminal de NS1 de FA (Figura 4.1).

4.8.3 Clonagem no pCR-Blunt II-TOPO[®]

O cassete de expressão purificado foi adicionado ao plasmídeo pCR-Blunt II-TOPO[®] (Invitrogen) que utiliza-se de uma topoisomerase ao invés de uma T4 DNA ligase para unir o fragmento a ser clonado ao vetor. Esse plasmídeo é desenhado para clonar fragmentos com pontas cegas, como é o caso dos gerados por polimerases com atividade revisora 3'-5'. A figura 4.2 mostra um esquema comercial do plasmídeo destacando seu sítio de multiclonagem e seus genes de resistência a antibióticos.

Basicamente, 4 µL do produto de PCR foram adicionados a 1 µL do vetor e 1 µL de uma solução salina presente no sistema originando a reação de clonagem. A mistura foi homogeneizada e mantida a temperatura ambiente por 5 min, procedendo-se então à transformação em células *E. coli* DH5α[®] quimio-competentes comerciais (Invitrogen) em que 2 µL da reação de clonagem foram adicionados a 50 µL das células competentes e incubadas no gelo por 30 min. Em seguida, as células sofreram choque térmico a 42° C por 30 s e foram novamente incubadas no gelo por 2 min. Às células foram adicionados 250 µL de meio SOC

(do Inglês, *Super Optimal Catabolite*) (Invitrogen) seguido de incubação a 37° C por 1 h com agitação constante de 150 rpm. Após esse período, as células foram plaqueadas em placas de Petri com meio LB (Luria-Bertani) sólido adicionado de 50 µg/mL de kanamicina e deixadas em estufa a 37° C por 16 h.

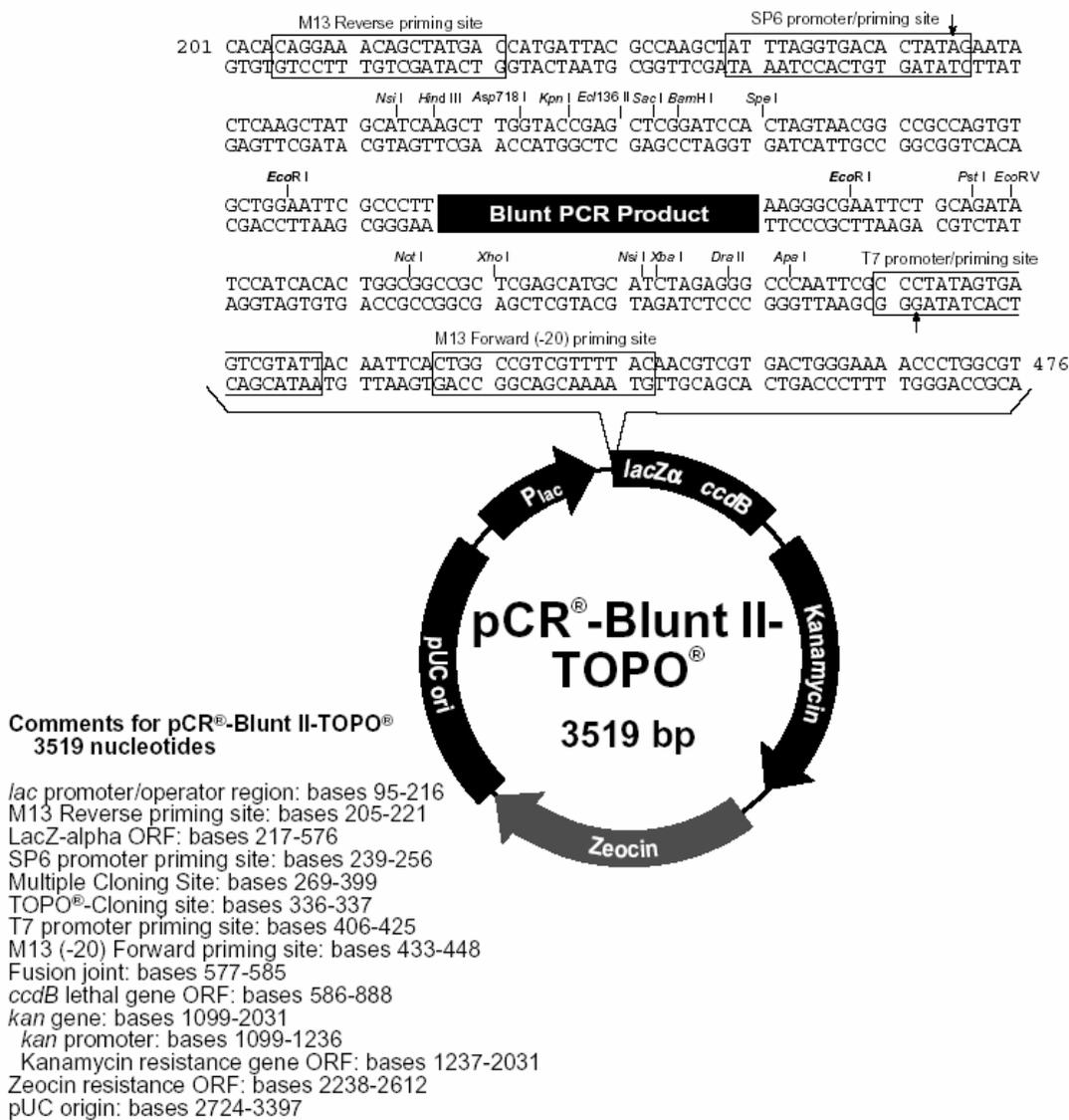


Figura 4.2. Mapa do plasmídeo pCR–Blunt II–TOPO[®]. Esse esquema mostra a seqüência da região de multiclonagem e os genes de resistência a antibióticos zeocina e kanamicina do plasmídeo. São mostrados ainda a origem de replicação (pUC ori), o promotor *lac* (P_{lac}) e as regiões onde os oligonucleotídeos comerciais M13R e M13F se ligam. Fonte: Invitrogen, http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcrbluntiiitopo_map.pdf.

Em seguida, colônias foram isoladas e incubadas por 16 h em meio LB líquido, adicionado de 50 µg/mL de kanamicina, a 37° C com agitação de 150 rpm. Após a incubação,

foram feitas preparações plasmidiais em pequena escala utilizando o sistema *QIAprep Miniprep*[®] (QIAGEN).

As preparações plasmidiais do pCR-Blunt II-TOPO[®] foram digeridas pela enzima de restrição *Eco* RI (Promega) utilizando-se 1 U da enzima, 1 µL do seu respectivo tampão 10 X e 200 ng de DNA plasmidial em um volume final de 10 µL. A mistura foi incubada a 37° C por 1 h. Essa enzima flanqueia o sítio de inserção do vetor e, portanto, leva à liberação do fragmento clonado, caso o clone seja positivo. A figura 4.3 esquematiza a clonagem do cassete de expressão no pCR-Blunt II-TOPO[®].

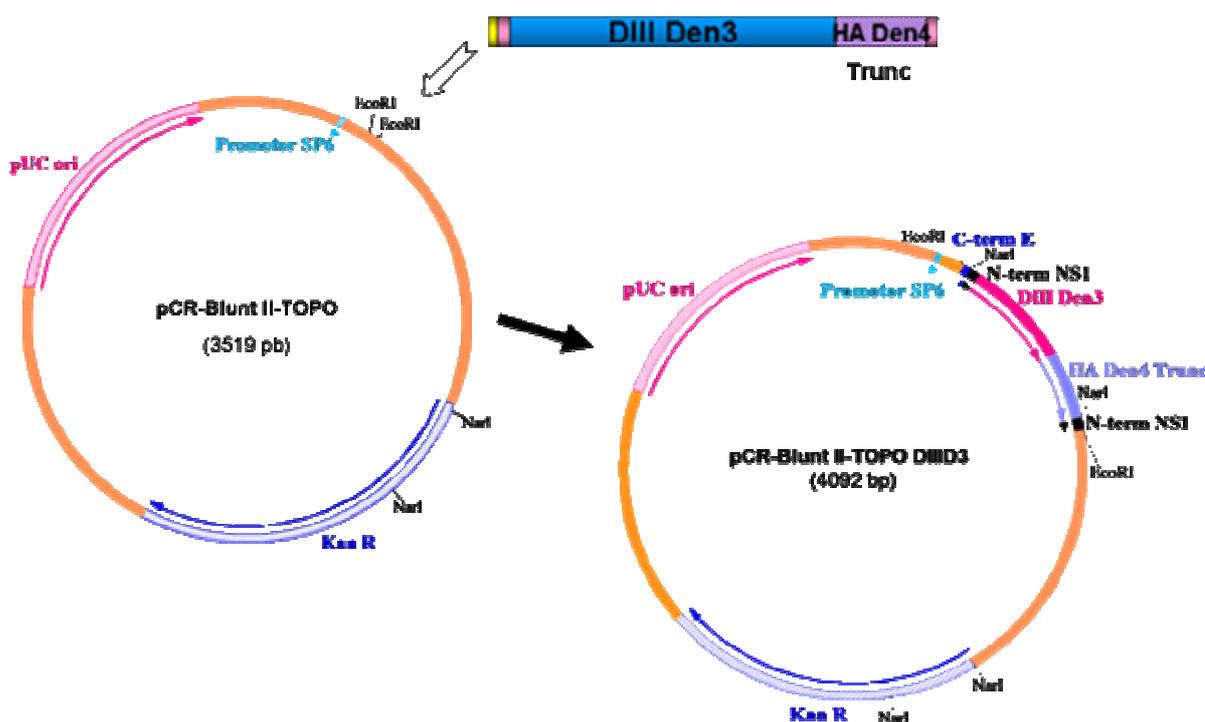


Figura 4.3. Esquema de clonagem do cassete de expressão no pCR-Blunt II-TOPO[®]. O cassete de expressão heterólogo foi adicionado ao plasmídeo pCR-Blunt II-TOPO[®] (3519 pb). A ligação foi transformada em *E. coli* quimiocompetentes DH5α originando o plasmídeo pCR-Blunt II-TOPO DIIID3 de 4092 pb. Plasmídeo desenhado com o programa Gene Construction Kit 2.5.

Os clones positivos obtidos tiveram a integridade do cassete inserido confirmada por seqüenciamento nucleotídico utilizando os oligonucleotídeos comerciais M13R e M13F (Figura 4.2 e Quadro 4.3). Alguns dos clones positivos que não apresentaram modificações em relação à seqüência esperada foram purificados em média escala (para que se obtivesse massa plasmidial suficiente para uma subclonagem) por meio do sistema *QIAprep Midiprep*[®] (QIAGEN). Os oligonucleotídeos utilizados no seqüenciamento estão na no quadro 4.3.

Quadro 4.3 – Oligonucleotídeos utilizados nos seqüenciamentos nucleotídicos.

Oligonucleotídeo	Seqüência (5'-3')
M13F (+)	CTG GCC GTC GTT TTA C
M13R (-)	CAC ACA GGA AAC AGC TAT GA
RG 174 (+)	CGG GGT GTG GAG AGA GAT GCA
RG 175 (+)	CCC AAC TGA CAC TGG CCA TGG
RG 176 (+)	GTT GGG AGA GGA GAT TCA CG
RG 19 (-)	GGG AGT CAA CTG AAT TTA GGC

4.8.4 Subclonagem no plasmídeo pT3

O plasmídeo bacteriano pT3 possui 9939 pb e faz parte do sistema de dois plasmídeos do clone infeccioso de FA (Rice *et al.*, 1989). Ele contém a região central do cDNA viral de FA (posição genômica de 1373 a 9428 do vírus FA) e a região alvo da clonagem, a região intergênica E/NS1, como mostrado na figura 4.4.

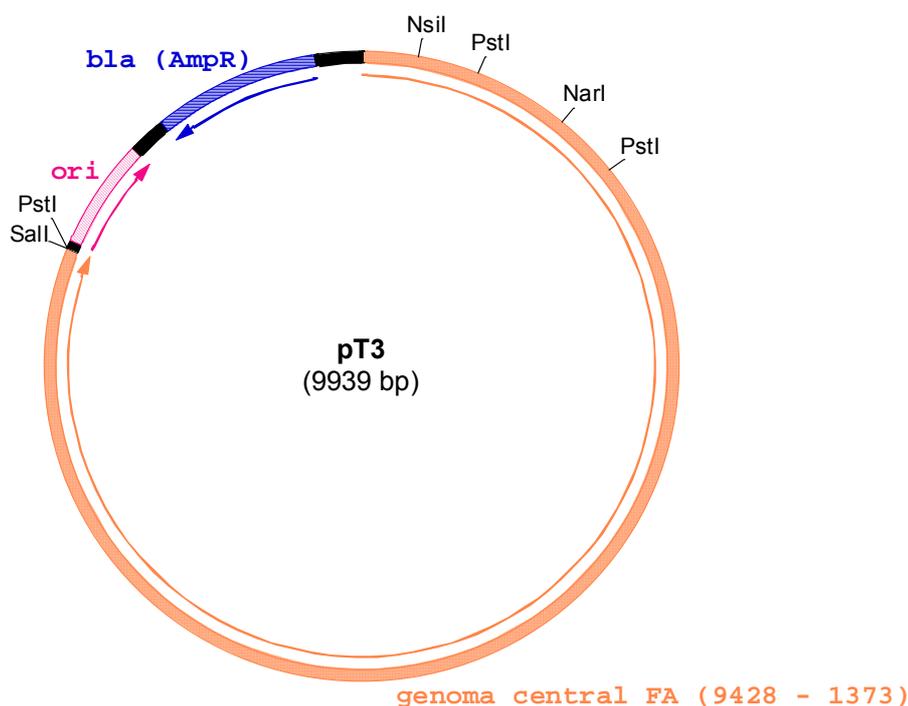


Figura 4.4. Mapa do plasmídeo bacteriano pT3 de 9939 pb contendo a região central do genoma do vírus FA (nucleotídeos 1373 a 9428). O cassete heterólogo foi clonado no sítio de *Nar* I do plasmídeo. O sítio de *Pst* I foi usado para análise dos clones. O gene de resistência a ampicilina (Amp R) e a origem de replicação (*ori*) também são mostrados. Plasmídeo desenhado com o programa Gene Construction Kit 2.5.

Assim, 2 µg do plasmídeo foram digeridos com 5 U da endonuclease *Nar* I (Promega) após incubação a 37° C por 3 h. Essa enzima está presente no início e no fim do cassete de expressão e foi o sítio de escolha para inserção do mesmo entre E/NS1 no vírus FA vacinal. Após a digestão, 100 ng do pT3 foram defosforilados com 1 U da enzima SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase* - 1 U/µL - Promega) por 30 min a 37° C e a reação foi inativada a 65° C por 15 min.

Preparações plasmidiais do pCR-Blunt II–TOPO[®] com o inserto de interesse foram igualmente digeridas com *Nar* I: 1µg do plasmídeo foi digerido com 3 U de *Nar* I a 37° C por 3h. A digestão foi analisada em gel de agarose 0,8 %/TAE corado com BrEt e a banda correspondente ao inserto de interesse a ser subclonado no pT3 foi purificada do gel utilizando o sistema *QIAquick Gel Extraction*[®]. O cassete purificado foi quantificado em gel de agarose como descrito anteriormente e ligado ao pT3 por meio da T4 DNA ligase (5 U/µL – Invitrogen).

A reação de ligação foi feita na proporção de 80:1 (inserto:vetor) e utilizou 25 ng do pT3 digerido e defosforilado, 120 ng do inserto digerido, 1 µL da ligase e 4 µL do seu tampão 5 X, totalizando 20 µL de volume final e foi incubada a 4° C por 16 h. Após a incubação, procedeu-se à transformação por choque térmico, como descrito anteriormente, de 2 µL da reação de ligação em 50 µL de células Sure[®] quimiocompetentes (Stratagene). As placas de Petri utilizadas no plaqueamento continham meio LB sólido adicionado de 50 ou 25 µg/mL de ampicilina. A figura 4.5 esquematiza a subclonagem do cassete heterólogo no plasmídeo pT3.

As colônias foram selecionadas da placa de Petri e incubadas por 16 h em meio LB líquido com 50 ou 25 µg/mL de ampicilina a 37° C com agitação de 150 rpm. Preparações plasmidiais em pequena escala dessas colônias feitas com o sistema *QIAprep Miniprep*[®] (QIAGEN), digeridas com *Pst* I ou *Nar* I e analisadas em gel de agarose 0,8 %/TAE corado com BrEt revelaram clones positivos.

As digestões com *Pst* I ou *Nar* I foram feitas utilizando: 1 µL da preparação plasmidial, 1 µL do tampão 10 X da enzima correspondente, 0,5 U de *Pst* I ou *Nar* I e água q.s.p. para 10 µL e a reação foi incubada a 37° C por 1 h. A orientação e a integridade do inserto dentro do pT3 foram posteriormente confirmados por seqüenciamento nucleotídico com oligonucleotídeos RG 174 (+), RG 175 (+), RG 176 (+) e RG 19 (-) (Quadro 4.3).

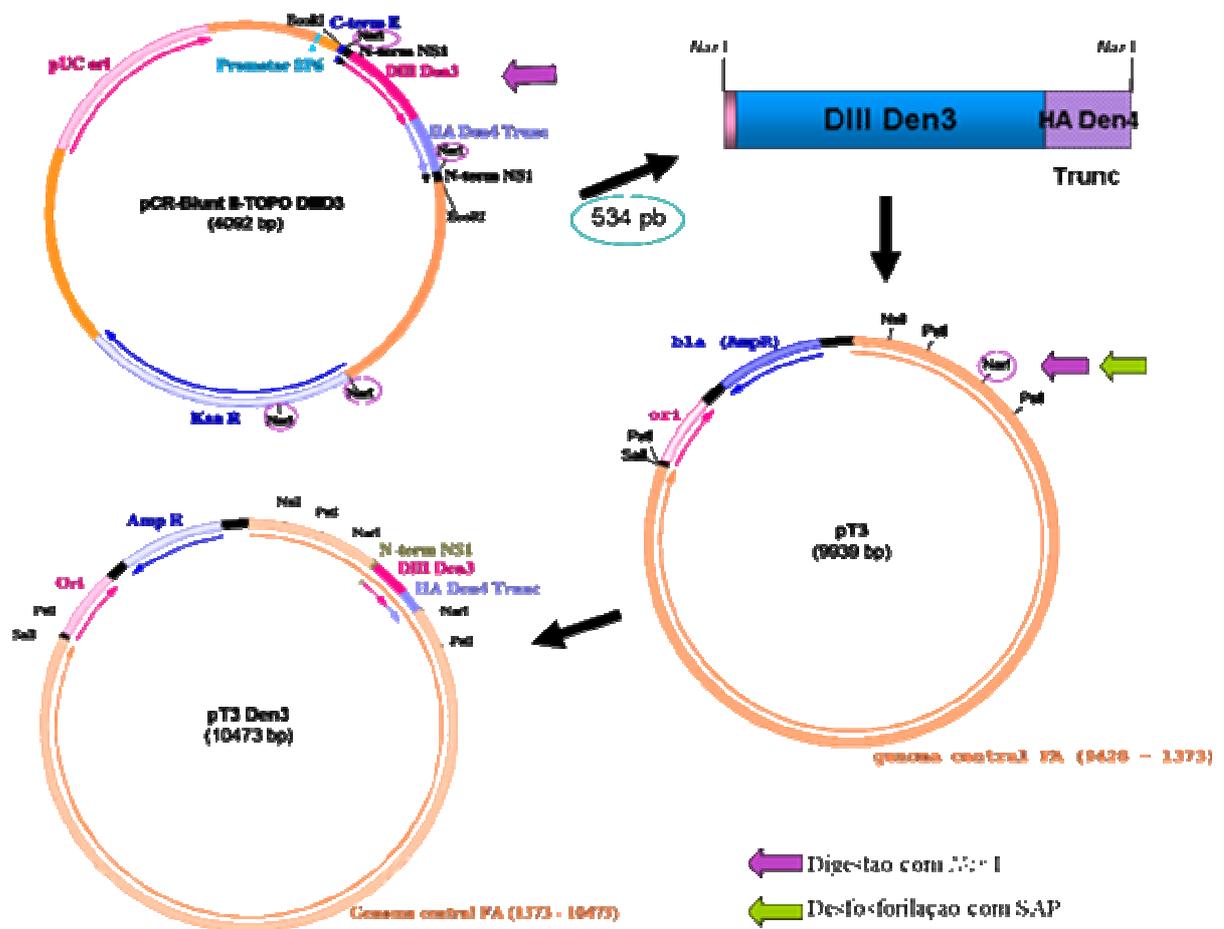


Figura 4.5. Esquema da subclonagem do cassete heterólogo no plasmídeo pT3. O plasmídeo pCR-Blunt II-TOPO DIII Den3 foi digerido com *Nar* I liberando, entre outras bandas, uma de 534 pb que corresponde ao inserto de interesse. Este foi purificado e ligado ao pT3 previamente digerido com *Nar* I e desfosforilado, obtendo-se o plasmídeo pT3 Den3. Plasmídeos desenhados com o programa Gene Construction Kit 2.5.

4.8.5 Obtenção do molde de cDNA

Os clones do pT3 confirmados por seqüenciamento foram purificados em larga escala com o sistema *QIAprep Maxiprep*[®] (QIAGEN), conforme descrito na seção 4.6. As preparações foram analisadas e quantificadas em gel de agarose 0,8 %/TAE corado com BrEt, como descrito anteriormente. Em seguida, 1,5 µg de cada clone do pT3 Den3 assim como do pT3 sem inserto foram digeridos com 3 U de cada uma das endonucleases *Nsi* I e *Sal* I, simultaneamente, por 3 h a 37° C.

O pG1/2, o outro plasmídeo que faz parte do sistema de dois plasmídeos do clone infeccioso da FA, também foi digerido com *Nsi* I e *Sal* I, nas mesmas condições descritas para pT3. Esse segundo plasmídeo possui 6905 pb e contém as regiões 5' e 3' do vírus FA (nucleotídeos 1 a 2271 e 8276 a 10862, respectivamente), como pode ser visto na figura 4.6.

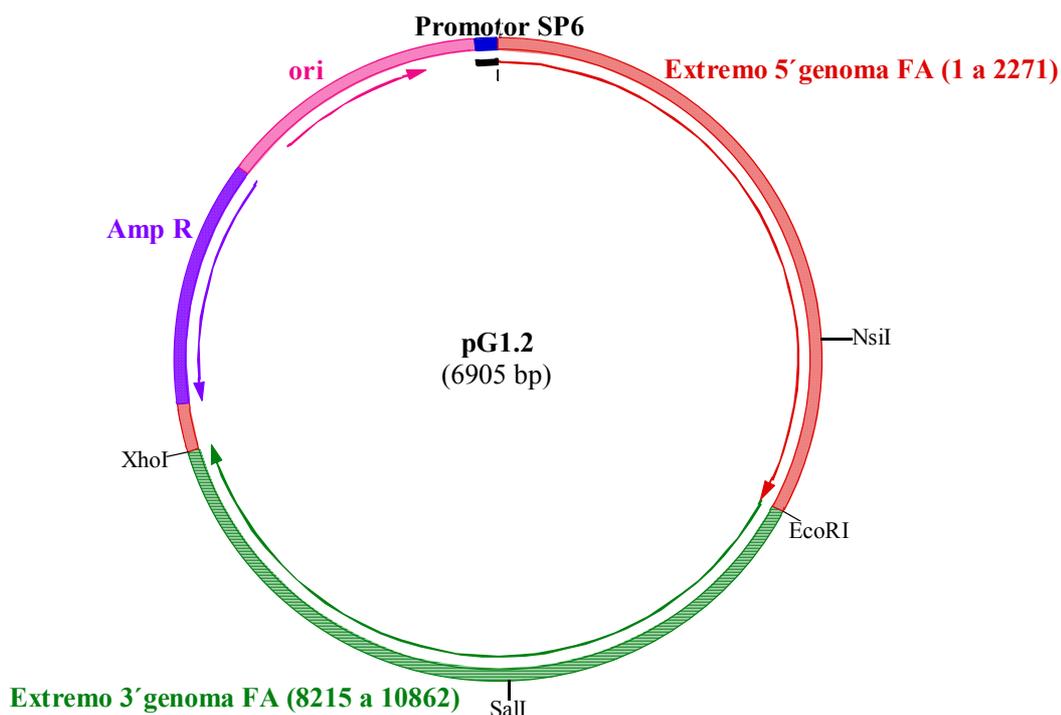


Figura 4.6. Mapa do plasmídeo pG1/2 com 6905 pb contém as regiões 5' (nucleotídeos 1 a 2271) e 3' (nucleotídeos 8215 a 10862) do genoma do vírus FA. Esse plasmídeo é uma modificação do plasmídeo original e faz parte do sistema de dois plasmídeos do clone infeccioso de FA desenvolvido por Rice *et al.* (1989). O gene de resistência a ampicilina (Amp R), a origem de replicação (ori) e o promotor do fago SP6 estão descritos. Plasmídeo desenhado com o programa Gene Construction Kit 2.5.

Todas as amostras digeridas tiveram as enzimas inativadas por calor e foram purificadas por coluna com o sistema *QIAquick PCR Purification*[®] (QIAGEN), segundo orientações do fabricante. De forma resumida, a um volume da amostra adicionam-se cinco volumes do tampão PB e essa mistura é aplicada à coluna onde o DNA fica adsorvido e só é liberado na presença de sal. A coluna é lavada pela adição de 0,75 mL de tampão PE. Em seguida, o DNA é recuperado da coluna pela eluição com o tampão EB. Em todos os passos a passagem do líquido pela coluna é facilitada por centrifugação a 12000x g por 1 min.

Após a purificação, as amostras foram quantificadas por eletroforese em gel de agarose 0,8 %/TAE corado com BrEt, como descrito anteriormente. Depois, procedeu-se à etapa de ligação: 300 ng de pT3 Den3 ou pT3 sem inserto foram ligados a 200 ng de pG1/2 com o auxílio de 5 U de T4 DNA ligase (Promega). As reações foram incubadas a 4° C por 16 h e a ligação foi confirmada por meio de análise em gel de agarose 0,8 % /TAE corado com BrEt.

4.9 Obtenção do vírus recombinante

4.9.1 Transcrição e transfecção do RNA viral

Os moldes de cDNA linearizados (pT3 sem inserto ligado ao pG1/2 e pT3 com o inserto ligado ao pG1/2) possuem em sua região 5' um promotor do bacteriófago SP6 possibilitando a transcrição *in vitro* do cDNA em RNA viral infeccioso pela SP6 RNA Polimerase. A transcrição foi feita utilizando o sistema *AmpliScrib SP6 High Yield Transcription*[®] (Epicentre), em condições livres de RNase e seguindo as recomendações do fabricante. Para cada reação de transcrição foram utilizados 100 ng de cada molde de cDNA linearizado, 1 µL do tampão 10 X do sistema, 10 mM de DTT, 7,5 mM de cada ribonucleotídeo (NTP) (menos do GTP que foi colocado a 0,75 mM), 3 mM de análogo de *cap*, 20 U de RNAsin[®] (Promega), 2 µL da enzima SP6 RNA Polimerase. A reação foi incubada a 37° C por 2 h e a integridade do RNA transcrito foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose 1 %/TAE, na ausência de qualquer tipo de nuclease.

No dia seguinte, 1 µg de cada RNA transcrito foi transfectado em monocamada de células Vero (30000 células/cm²), preparadas com 24 h de antecedência, com o auxílio de 20 µg do lipídeo catiônico Lipofectamine 2000[®] (Invitrogen – 2 mg/mL) na presença de 1 mL de Opti-MEM[®] 1 X (*Reduced Serum Medium Modification of MEM* - Gibco). O RNA transcrito, o Opti-MEM[®] e a Lipofectamina foram misturados e incubados no gelo por 10 min. O meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com Opti-MEM[®]. Em seguida, a solução Opti-MEM, RNA e lipofectamina gotejada sobre a monocamada de células e a garrafa foi incubada por 20 min à temperatura ambiente com agitação a cada 2 min.

Após a incubação, todo o sobrenadante da garrafa foi retirado e foram adicionados 12 mL de meio 199/Earle completo com 0,22 % de NaHCO₃ (ver item 10.1). A garrafa foi incubada a 37° C em estufa com atmosfera de 5 % de CO₂ e observada diariamente em microscópio invertido para verificar a presença de CPE, caracterizando a infecção viral.

4.9.2 Regeneração dos vírus e estoque viral

Cinco dias após a transfecção, as células transfectadas apresentaram CPE e, no sexto dia pós-transfecção (p.t.), os sobrenadantes do vírus controle FA 17D/G1.2/T3 (obtido com a ligação do pT3 sem inserto ao pG1/2) e do recombinante FA17D/DIII_{DENV-3} (obtido com a ligação do pT3 Den3 ao pG1/2) tiveram sorbitol adicionado para uma concentração final de 8 % e foram coletados, aliquotados e estocados a -70° C.

A partir desses sobrenadantes 1P (constitui a primeira passagem dos vírus em célula), foi extraído RNA (ver item 4.4) e feito um RT-PCR com os oligonucleotídeos RG174

(+) e RG 19 (-) para confirmar a integridade da inserção. Os fragmentos do RT-PCR foram purificados pela passagem em coluna do sistema *QIAquick PCR Purification*[®] (QIAGEN) e seqüenciados. No seqüenciamento foram utilizados os oligonucleotídeos RG 174 (+), RG 175 (+), RG 176 (+) e RG 19 (-) na concentração de 5 pmoles/ μ L (Quadro 4.3).

Em seguida, foi preparado um estoque 2P do vírus por meio da infecção de células Vero (62500 células/cm²) preparadas com 24 h de antecedência em uma garrafa T-175 cm² com 5 mL do sobrenadante 1P. Todo o meio da garrafa foi retirado, o sobrenadante 1P foi gotejado sobre as células que foram incubadas a 37° C por 1 h para adsorção do vírus, agitando a garrafa a cada 15 min. Passado o tempo de incubação, 75 mL de meio 199/Earle sem gentamicina e fungizona e com 0,11 % de NaHCO₃ foram adicionados à garrafa que foi novamente incubada a 37° C em estufa até o aparecimento de CPE.

Após a visualização de CPE na garrafa, o seu sobrenadante foi coletado, aliquotado e estocado a -70° C como descrito para 1P. Uma alíquota foi utilizada para extração de RNA e reação de RT-PCR, como descrito anteriormente, a fim de verificar a integridade da inserção no vírus recombinante. Os oligonucleotídeos utilizados no RT-PCR da 1P e 2P correspondem às seqüências do genoma viral que flanqueiam o inserto e pareiam-se a partir dos nucleotídeos 1639-1659 pb (RG 174) e 3152-3172 pb (RG 19) em relação a seqüência do plasmídeo pT3 Den3.

4.10 Caracterização viral

4.10.1 Titulação

O vírus recombinante, assim como os controles FA17D/G1.2/T3 e FA 17DD (obtido liofilizado) foram titulados por meio de ensaio de placas em uma adaptação do método descrito por De Madrid e Porterfield (1969). Os vírus foram diluídos seriadamente de 10⁻¹ a 10⁻⁶ em meio 199/Earle com 0,22 % NaHCO₃.

Placas de 24 poços (2 cm²/poço) contendo 50000 células Vero /cm², preparadas no dia anterior, tiveram o meio de seus poços retirado por aspiração com o auxílio de uma bomba de vácuo (sem encostar na monocamada) e 100 μ L de cada diluição foram adicionados em duplicata a diferentes poços da placa, de forma seriada. As placas foram incubadas por 1 h para adsorção viral a 37° C em estufa com atmosfera de 5 % de CO₂ e agitação manual a cada 15 min. Em seguida, o excesso de vírus de cada poço foi aspirado como descrito anteriormente e 1 mL de carboximetilcelulose 3 % (CMC) com meio 199/Earle 0,22 % NaHCO₃ (ver item 10.1) foi adicionado a cada poço. As placas foram novamente incubadas em estufa de CO₂ (5 %) a 37° C por 10 dias.

Após esse período, as placas foram fixadas pela adição de uma solução de formol 10 % (ver item 10.1) a cada poço da placa durante, no mínimo, 1h. Após a incubação, as placas foram lavadas com água, coradas com uma solução de cristal violeta a 0,02% (ver item 10.1) por 30 min, novamente lavadas e colocadas para secar. O número de placas de lise de cada diluição foi contado e o título do vírus determinado de acordo com a fórmula $T = M \times ID \times FC$. Cada vírus foi titulado três vezes, de forma independente.

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

M = média do nº de placas de lise contadas em uma determinada diluição

ID = inverso da diluição onde as placas de lise foram contadas

FC = fator de correção do inoculo para mL. Como o inoculo corresponde a 100 μ L, que é a décima parte de 1 mL, $FC = 10$

4.10.2 Cinética de replicação

O vírus recombinante, assim como os controles FA 17D/G1.2/T3 e FA 17DD tiveram suas cinéticas de replicação determinadas em monocamada de células Vero em garrafas T-25 cm^2 com 62500 células/ cm^2 (sempre preparadas no dia anterior). As garrafas tiveram seu meio retirado, foram infectadas com cada um dos vírus em um MOI (do Inglês, *Multiplicity of Infection*) de 0,02 e incubadas por 1 h para adsorção viral em estufa de CO_2 (5 %) a 37° C com agitação manual a cada 10 min. Essa MOI é considerada baixa e visa garantir que os vírus observados após a infecção provenham, em sua grande maioria, de progênie das células infectadas.

Após esse período, foram acrescentados 11 mL de meio 199/Earle completo com 0,22 % de NaHCO_3 , as garrafas foram novamente incubadas em estufa de CO_2 a 37° C. Aliquotas foram retiradas a 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h p.i. e estocadas a -70° C. Cada alíquota foi titulada em duplicata como descrito na seção anterior. Foram feitos três experimentos independentes para cada vírus.

A partir dos títulos obtidos em cada tempo p.i. foi possível montar uma curva com a cinética de replicação dos vírus. Os dados foram analisados pelo programa Excel (Microsoft, 2003) e foi montado um gráfico com a média dos três experimentos. A análise estatística dos dados de cada curva ao longo do tempo foi feita com o teste ANOVA *one way*, pós-teste Tukey. Já a análise estatística entre as curvas foi realizada com o teste de comparação múltipla Bonferroni. Todas as análises estatísticas foram feitas por meio do programa GraphPadPrism 3.02 (GraphPad, Inc.) e desvio padrão abaixo de 5 % foi considerado não significativo ($P < 0,05$).

4.10.3 Estabilidade genética do vírus recombinante

O vírus recombinante foi analisado quanto a sua estabilidade genética por meio de passagens seriadas e em duplicata (3P1 e 3P2, por exemplo, que corresponde à duplicata da 3ª passagem) em monocamada de células Vero a partir do estoque 2P até 10P. Garrafas T-25 cm² com 62500 células/cm² foram preparadas com 24 h de antecedência e infectadas com o vírus MOI 0,02 como descrito anteriormente para a cinética de replicação.

Em seguida, as garrafas foram incubadas em estufa de CO₂ (5 %) a 37° C até o aparecimento de CPE, determinada, neste caso, como sendo 72 h p.i.. Duas alíquotas foram coletadas de cada garrafa e estocadas a -70° C. Uma das alíquotas era utilizada para titulação do vírus, a fim de manter a MOI sempre próxima de 0,02; e outra alíquota era utilizada para infectar a passagem seguinte, como descrito anteriormente. Caso a MOI ultrapassasse o valor de 0,1, ela era recalculada para 0,02 na infecção da passagem seguinte.

Nas passagens 5P e 10P alíquotas foram utilizadas para extração de RNA seguida de RT-PCR e seqüenciamento nucleotídico para verificar a integridade da inserção entre E/NS1 do vírus recombinante. Os oligonucleotídeos utilizados aqui foram os mesmos dos descritos para as passagens 1P e 2P (Quadro 4.3).

4.10.4 Ensaios de imunofluorescência

Células Vero presentes em placas de oito poços de 1 cm² cada (*Lab-Tek Chamber Slides* – Nunc) em uma densidade de 20000 células/poço foram infectadas com os vírus controle FA17DD, DENV-3 IOC e o recombinante FA17D/DIII_{DENV-3} com MOI de 0,02 em um volume de 100 µL. As placas foram incubadas por 1 h a 37° C em estufa de CO₂ (5 %) para adsorção viral e, em seguida, 200 µL de meio 199/Earle 0,22 % NaHCO₃ foram acrescentados a cada poço.

Após 72 h de incubação a 37° C em estufa com atmosfera de CO₂ 5 %, o sobrenadante foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,4, fixadas em paraformaldeído 4 % tampão fosfato (ver item 10.1) por 10 min, permeabilizadas por uma solução 0,5 % de Triton X-100 em PBS por 10 min e bloqueadas com PBS adicionado de albumina sérica bovina (BSA) 1 % por 10 min. Em seguida, o anticorpo monoclonal anti-DIII de DENV-3 presente em fluido ascítico murino D6-8 A1-12 (lote 30102001; cedido por Bio-Manguinhos em 25/07/2007) e monoclonal anti-E de FA 2D12 (lote 0505001; cedido por Bio-Manguinhos em 19/10/2005) foram diluídos em PBS BSA 1 % para uma diluição de 1:10 e 1:300, respectivamente. Os anticorpos foram aplicados às células: 100 µL por poço, de acordo com o protocolo da placa em cada experimento.

A placa foi incubada à temperatura ambiente por 1 h, seguida de três lavagens com solução de bloqueio e incubação por 1 h com o anticorpo IgG de cabra *anti-camundongo* conjugado a Alexa 488 (Molecular Probes) na diluição de 1:400. Os poços foram novamente lavados por três vezes com solução de bloqueio (PBS BSA 1 %) e as lâminas foram montadas com *Slow Fade Gold - antifade reagent with DAPI*[®] (Molecular Probes).

As análises das lâminas foram inicialmente feitas em microscópio de fluorescência e depois em microscópio confocal LSM 510 META da Zeiss na plataforma multi-usuário de microscopia confocal (PDTIS-FIOCRUZ). As imagens foram capturadas e arquivadas com auxílio do programa *LSM Image Browse 3.5*.

4.10.5 Microscopia em contraste de fase

Placas de oito poços (*Lab-Tek Chamber Slides* – Nunc) com 1 cm²/poço foram semeadas com 20000 células/poço com 24 h de antecedência e infectadas com os vírus controle FA 17DD, FA 17D/G1.2/T3 e o recombinante FA17D/DIII_{DENV-3} com MOI 0,02 ou com meio (*mock*), como descrito para cinética de replicação. Fotografias desses vírus em contraste de fase foram feitas a 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h p.i. a fim de comparar o CPE entre os vírus.

5. RESULTADOS

5.1 Estudos preliminares sobre a estrutura e seqüência do DIII de DENV-3

5.1.1 Alinhamentos

Como um dos objetivos é expressar o DIII de DENV-3 16562 entre os genes E/NS1 do vírus vacinal FA 17D, foram feitos vários estudos iniciais desse domínio. Um desses estudos consistiu em verificar se o DIII é conservado entre as genótipos de DENV-3 e mesmo entre os demais sorotipos de dengue por meio de alinhamentos. Todos os alinhamentos foram feitos utilizando o programa ClustalW2 versão 2.01, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>.

Neste trabalho, considera-se DIII DENV-3 a porção da proteína E que engloba os aminoácidos de 293 a 395. O DIII de DENV-3 16562 foi alinhado com os demais sorotipos de DENV obtidos no GenBank (o número de acesso está entre parênteses após o nome do vírus). Foram escolhidos os vírus DENV-1 Hawaii (AF425619), DENV-2 Nova Guiné C 44 (AF038403), DENV-3 H87 (L11423), DENV-4 H241 (Y947539), além do próprio DENV-3 16562 utilizado para a construção do vírus recombinante. A figura 5.1 mostra o alinhamento entre esses vírus destacando suas nove fitas β . Como a estrutura do DIII de DENV-1 ainda não foi determinada, as fitas β desse sorotipo não foram delimitadas.

Entre os sorotipos de dengue, de um total de 103 aa, 45 mostraram-se idênticos, 21 com substituições conservadas e 11 com substituições semi-conservadas. Isso indica que, mesmo entre os sorotipos, a seqüência de aminoácidos do DIII é bastante conservada assim como a formação e extensão das fitas β que compõem este domínio. A fita β 5 foi a que apresentou maior variação entre os sorotipos principalmente devido a sua maior extensão no DENV-2, quando comparado com os demais sorotipos.

Seguiu-se a análise comparativa entre as seqüências dos diversos genótipos do DENV-3, determinados por estudos de evolução molecular (Lanciotti *et al.*, 1994). Foram alinhados um vírus de cada genótipo obtidos no GenBank (número de acesso está entre parênteses) e o vírus DENV-3 16562. Os vírus utilizados foram: Fiji 1992 29472 (L11422) classificado no genótipo I, Tailândia 1987 MK315 (L11442) classificado no genótipo II, Sri Lanka 1991 2783 (L11438) classificado no genótipo III e Porto Rico 1977 1340 (L11434) pertencente ao genótipo IV. A figura 5.2 ilustra o alinhamento.

Esse alinhamento mostra o elevado nível de conservação do DIII DENV-3 uma vez que, de 103 aa, 90 são idênticos, 9 possuem substituições conservadas e 1 possui substituição semi-conservada o que dá aproximadamente 87 % de identidade seqüencial. Além disso, a estrutura secundária desses vírus, determinada por suas fitas β , é idêntica.

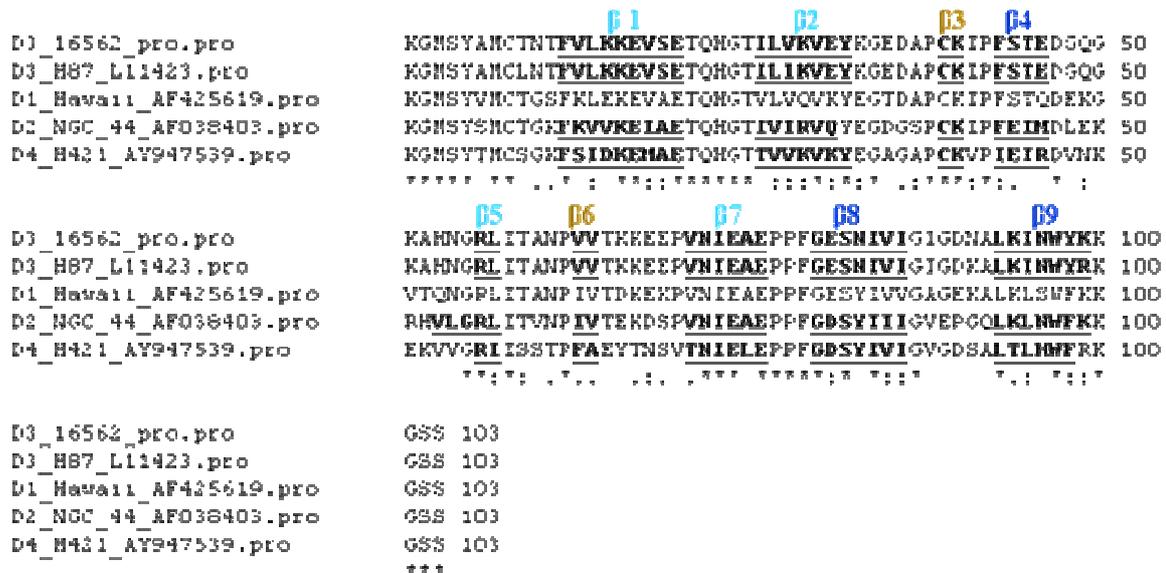


Figura 5.1. Alinhamento do DIII dos quatro sorotipos de dengue destacando as três folhas β organizadas em nove fitas. A primeira folha é composta pelas fitas $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ e $\beta 7$ em azul claro; a segunda, pelas fitas $\beta 3$ e $\beta 6$ em marrom claro; a terceira, pelas fitas $\beta 4$, $\beta 8$ e $\beta 9$ em azul escuro. Os aminoácidos que compõem as fitas β estão sublinhados e em negrito. As seqüências foram obtidas do GenBank e o número de acesso está na própria figura após a especificação da cepa, com exceção de DENV-3 16562. Asteriscos (*) representam resíduos idênticos em todas as seqüências, dois pontos (:) indicam substituições conservadas e ponto (.), substituições semi-conservadas (ClustalW2, versão 2.01, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

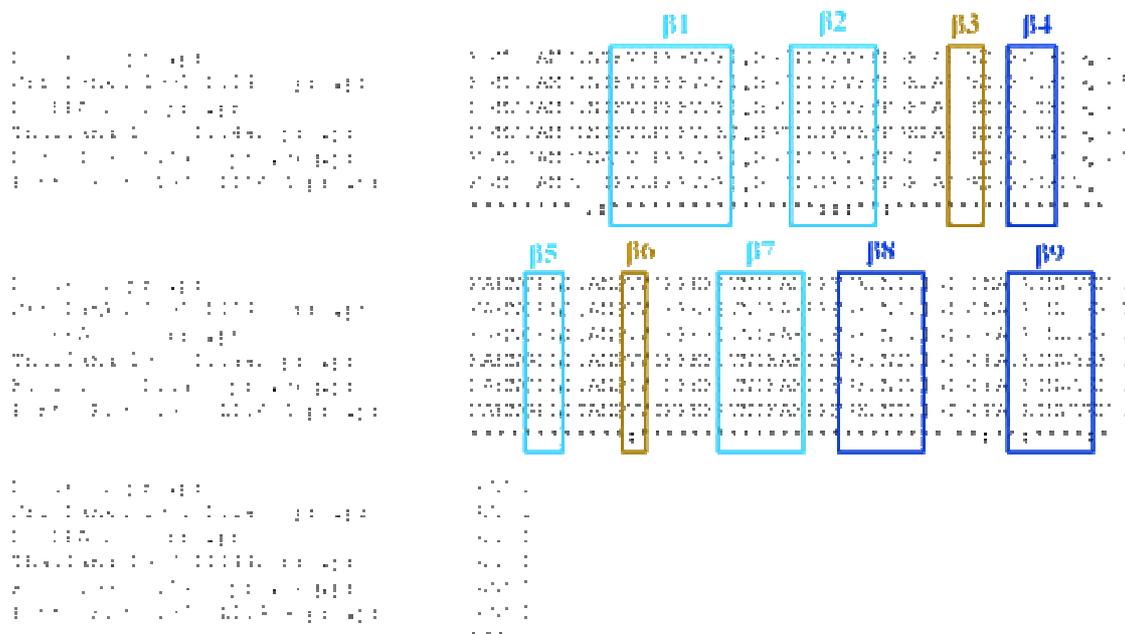


Figura 5.2. Alinhamento entre os diversos genótipos de DENV-3 destacando as nove fitas β formando as três folhas β que compõem o barril característico do DIII. As seqüências foram obtidas do GenBank e o número de acesso está na própria figura após a especificação da cepa, com

exceção do DENV-3 16562. Fiji 1992 pertence ao genótipo I, Tailândia 1987 ao genótipo II, Sri Lanka 1991 ao III e Porto Rico 1977 ao genótipo IV. Asteriscos (*) representam resíduos idênticos em todas as seqüências, dois pontos (:) indicam substituições conservadas e ponto (.), substituições semi-conservadas (ClustalW2, versão 2.01, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

Em seguida, o nível de similaridade seqüencial entre o DIII do vírus DENV-3 16562 e do vírus vacinal FA 17DD, cuja seqüência foi obtida no GenBank (Nº acesso U17066), foi analisado. A comparação dessas porções nos dois *Flavivírus* revelou que de 103 aa, 43 eram idênticos, 27 possuíam substituições conservadas e 12 substituições semi-conservadas, o que dá aproximadamente 42 % de identidade (figura 5.3B).

O alinhamento entre as regiões da HA completa de FA 17DD e HA completa e truncada do vírus DENV-4 também foi realizado (figura 5.3C). A seqüência de DENV-4 foi obtida do vírus quimérico FA 17DD/DENV-4 em que os genes E e prM do vírus amarílico foram substituídos pelos da cepa Venezuela 88 de DENV-4 (Galler R, comunicação pessoal). O domínio funcional haste (H1, CS e H2) e âncora (TM1 e TM2) completos possuem 96 aa em contraposição a 66 aa da HA truncada. Esses domínios foram delimitados de acordo com o descrito por Bonaldo *et al.* (2007)

Entre o alinhamento da HA completa de FA 17DD e DENV-4, de 96 aa, 45 eram idênticos, 28 eram substituições conservadas e 9 substituições semi-conservadas. Já em relação ao alinhamento entre a HA truncada de DENV-4 e de FA 17DD, de 66 aa, 30 eram idênticos, 20 possuíam substituições conservadas e 4 substituições semi-conservadas. A figura 5.3 mostra a seqüência e composição do cassete construído a ser inserido entre E/NS1 do vírus vacinal FA 17DD (A), bem como os alinhamentos entre o DIII de DENV-3 16562 e FA 17DD (B) e HA completa de FA 17DD e HA completa e truncada de DENV-4 (C).



Figura 5.3. Análise seqüencial dos componentes do cassete de expressão DIII DENV-3 HA truncada DENV-4. Seqüência e composição do cassete construído e inserido entre E/NS1 do vírus vacinal FA 17D (A); alinhamento entre o DIII de DENV-3 16562 e FA 17DD (B); alinhamento e delimitação dos elementos da HA completa de FA 17DD com a HA completa e truncada de DENV-4 (C). A seqüência de FA 17DD foi obtida no GenBank (Nº de acesso U17066) e a de DENV-4 a partir de uma quimera FA 17DD/DENV-4. Asteriscos (*) representam resíduos idênticos em todas as seqüências, dois pontos (:) indicam substituições conservadas e ponto (.), substituições semi-conservadas (ClustalW2, versão 2.01, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

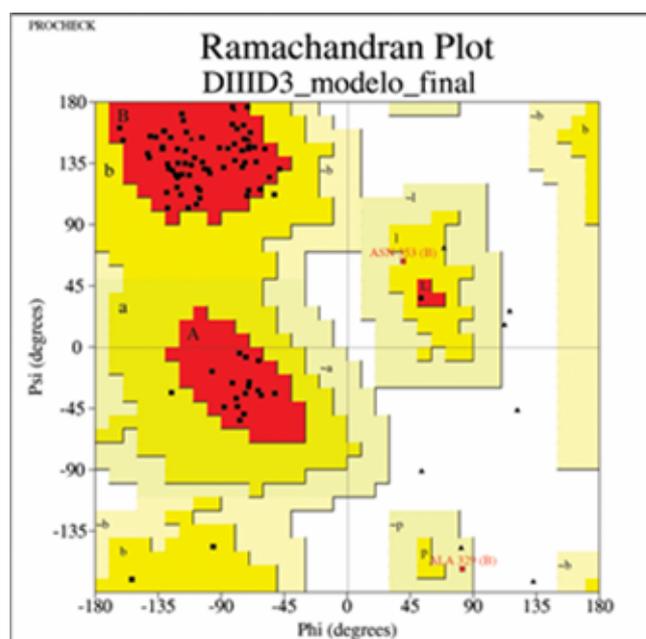


Figura 5.5. Gráfico de Ramachandran obtido para o modelo do DIII de DENV-3 16562. A estatística do gráfico obtido pelo PROCHECK mostra que de todos os resíduos de aminoácidos, excetuando-se Gly e Pro: 92,9 % estão nas regiões mais favoráveis (A, B, L), 4,7 % estão nas regiões adicionalmente permitidas (a, b, l, p), 2,4 % estão nas regiões generosamente permitidas e nenhum aminoácido encontra-se em regiões não permitidas. Um bom modelo tem 90 % de seus aminoácidos nas regiões mais favorecidas.

Tabela 5.1 – Composição, extensão e posição das nove fitas β do modelo do DIII DENV-3 16562.

Fita	Extensão (Nº de aminoácidos)	Posição no DIII de DENV-3 16562	Composição
β_1	9	304 – 312	FVLKKEVSE
β_2	7	318 – 324	ILVKVEY
β_3	2	331 – 332	CK
β_4	4	335 – 338	FSTE
β_5	2	348 – 349	RL
β_6	2	355 – 356	VV
β_7	6	363 – 368	VNIEAE
β_8	7	372 – 378	GESNIVI
β_9	7	385 – 391	LKINWYK

Nomeação das fitas está de acordo com o proposto por Volk *et al.* (2007).

O modelo construído do DIII de DENV-3 16562 foi utilizado para um estudo preliminar de importantes sítios presentes neste domínio, previamente descritos na literatura. Em primeiro lugar, foram determinados no novo modelo os sítios capazes de induzir à formação de anticorpos neutralizantes sorotipo específicos pelo hospedeiro, levando inclusive

a mutações de escape e alterações na ligação com o receptor celular. Esses sítios compreendem: (1) os aa de 381 a 383 (GDN) que encontram-se na alça entre as fitas $\beta 8$ e $\beta 9$; (2) a seqüência de 301 a 307 (TNTFVLK) localizada no N-terminal do DIII e no início da fita $\beta 1$. A figura 5.6 ilustra o novo modelo e mostra os sítios de escape de neutralização e o resíduo N388, relacionado com virulência/atenuação.

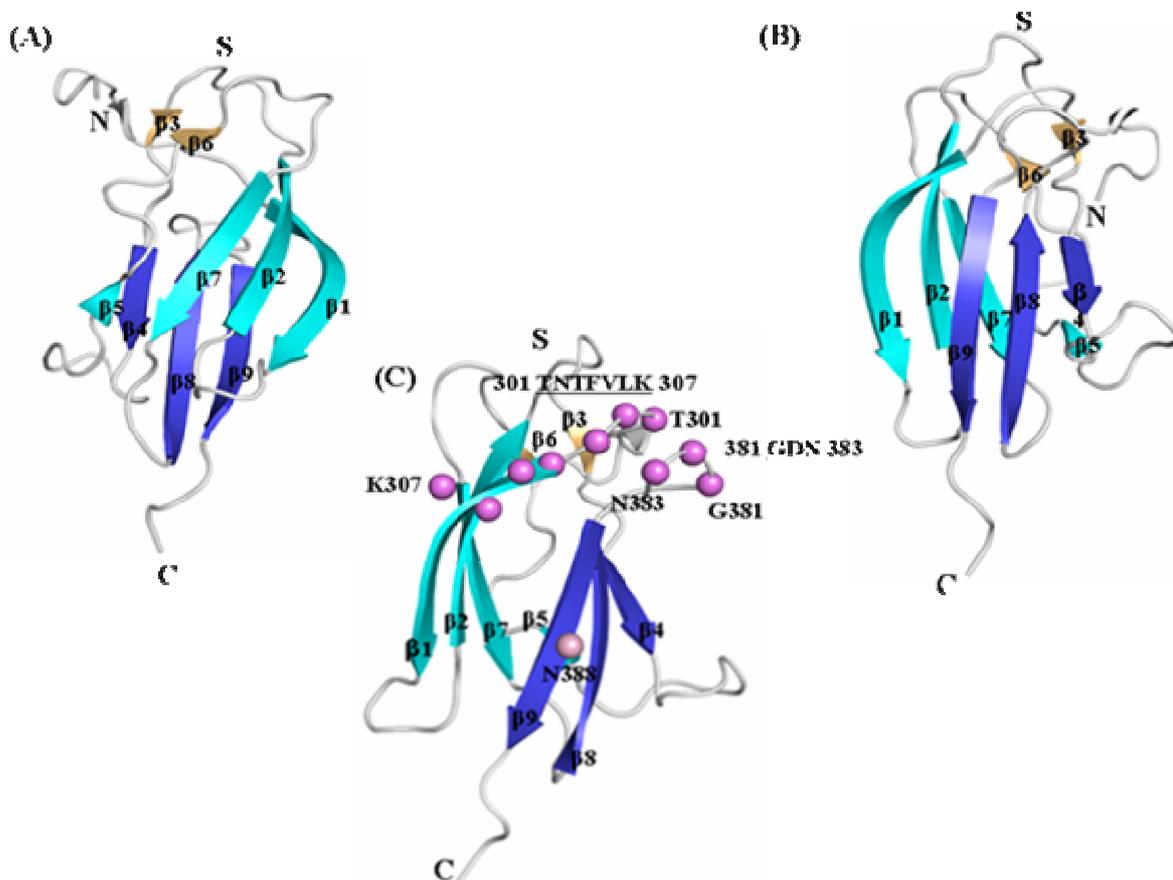


Figura 5.6. Modelo do DIII da proteína E de DENV-3 16562 mostrando sítios capazes de induzir formação de anticorpos neutralizantes. Em (A) e (B), têm-se vista externa e interna, respectivamente, do DIII com suas três folhas β , como descrito na figura 5.1. Em (C), tem-se uma visão lateral do modelo destacando sítios capazes de induzir à formação de anticorpos neutralizantes sorotipo específicos pelo hospedeiro. Destacam-se duas regiões (esferas roxas): aa 381- 383 (GDN) que se localizam na alça entre as fitas $\beta 8$ e $\beta 9$ e aa 301-307 (TNTFVLK) que se localizam no N-terminal do domínio e no início da fita $\beta 1$. O resíduo N388 (esfera rosa) por ser um asparagina é descrito na literatura como sendo responsável por conferir maior virulência à cepa. N: N-terminal da proteína; C: C-terminal da proteína e S: região voltada para a superfície do vírion.

Regiões de possível ligação a receptores celulares do tipo heparan sulfato (HS), em células de mamíferos, foram mapeadas. Elas consistem em lisinas conservadas presentes no DIII dos diversos sorotipos de dengue e também no vírus TBE. Essas lisinas, por serem

positivas, ligariam-se a HS, altamente negativo (Hung *et al.*, 2004). No modelo de DENV-3 16562 essas lisinas são: K293, K307, K308, K391, K392 e podem ser visualizadas na figura 5.7.

Foram mapeados ainda resíduos envolvidos na ligação a células de insetos de *Ae. albopictus* clone C6/36 descritos por Hung *et al.* (2004). Esses resíduos encontram-se em uma alça formada entre as fitas $\beta 8$ e $\beta 9$ e no início da fita $\beta 9$ totalizando dez aa: de 378 a 387 (IGIGDNALKI) (Figura 5.7).

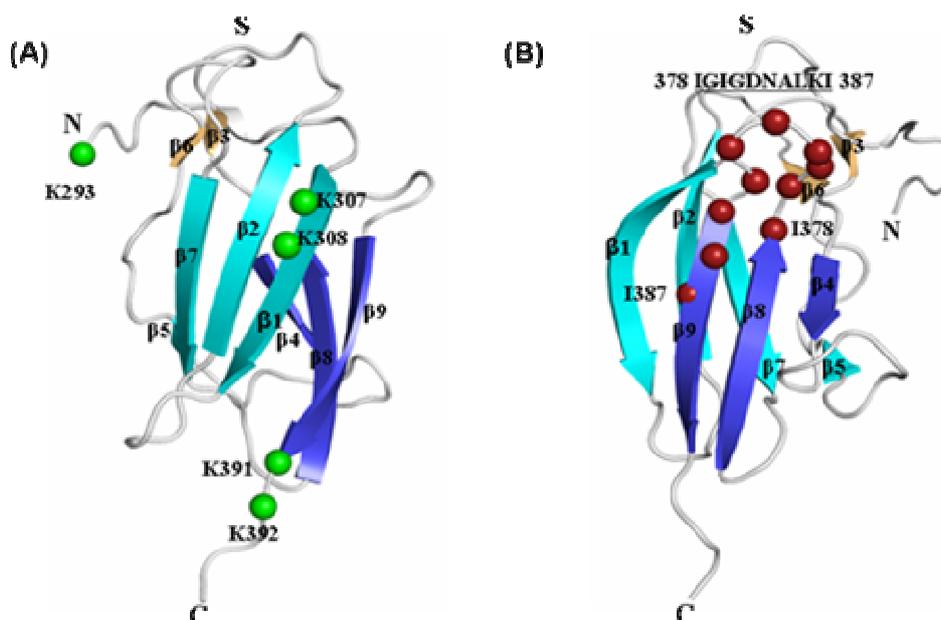


Figura 5.7. Modelo do DIII DENV-3 16562 destacando sítios de ligação a receptores celulares.

Em (A) visão externa do DIII destacando-se cinco lisinas (esferas verdes - K293, K307, K308, K391, K392) que devido a sua carga positiva contribuiriam com a ligação a receptores celulares do tipo HS, altamente negativos. Em (B) visão interna do modelo mostrando esferas vermelhas que mapeiam aminoácidos relacionados com a ligação a células de *Ae. albopictus* clone C6/36. Esses resíduos estão presentes em uma alça lateral localizada na alça entre as fitas $\beta 8$ e $\beta 9$ e no início da fita $\beta 9$, totalizando dez aa: de 378 a 387 (IGIGDNALKI). N: N-terminal da proteína; C: C-terminal da proteína e S: região voltada para a superfície do vírion.

As diferenças de aminoácidos encontradas entre os quatro genótipos de DENV-3 alinhados na figura 5.2 também foram adicionadas ao modelo de DIII para fossem melhor analisadas. Das treze diferenças encontradas, a maioria situa-se na superfície do DIII: 301-303 (TNT), K325, V355, I380 e N383, sendo seis em alças e apenas uma na fita $\beta 6$; três situam-se na 1ª folha (fitas $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$, $\beta 7$): 320-322 (VKV); duas na 3ª folha (fitas $\beta 4$, $\beta 8$, $\beta 9$): K386, K391; e uma na alça entre as fitas $\beta 4$ e $\beta 5$ (Figura 5.8). A tabela 5.2 sumariza as diferenças encontradas e sua localização.

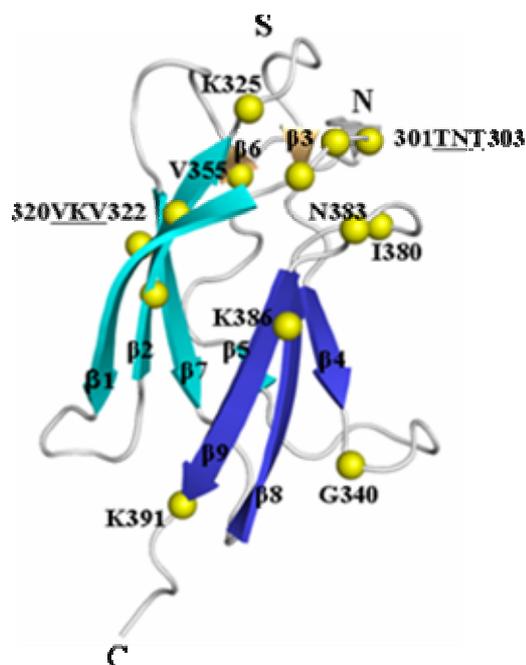


Figura 5.8. Modelo do DIII de DENV-3 16562 destacando diferenças de aminoácidos encontradas no alinhamento entre os quatro genótipos de DENV-3. O modelo está em vista lateral e as diferenças encontradas no alinhamento mostrado na figura 5.2 estão representadas por esferas em amarelo. São treze diferenças no total distribuídas na superfície do domínio: 301-303 (TNT), K325, V355, I380, N383; na 1ª folha (fitas $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$, $\beta 7$) interagindo com o DII do monômero oposto: 320-322 (VKV); na 3ª folha (fitas $\beta 4$, $\beta 8$, $\beta 9$) distantes da superfície viral: K386 e K391; na alça entre as fitas $\beta 4$ - $\beta 5$: G340. N: N-terminal da proteína; C: C-terminal da proteína e S: região voltada para a superfície do vírion.

Tabela 5.2 – Diferenças encontradas entre o DIII dos genótipos de DENV-3 e sua localização.

Mutação	Posição na proteína E	Localização em DIII
T / L / S	301	Alça N-terminal
N / G	302	Alça N-terminal
T / A	303	Alça N-terminal
V / I	320	Fita $\beta 2$
K / R	321	Fita $\beta 2$
V / I	322	Fita $\beta 2$
K / R	325	Alça $\beta 2$ - $\beta 3$
G / V	340	Alça $\beta 4$ - $\beta 5$
V / I	355	Fita $\beta 6$
I / T	380	Alça $\beta 8$ - $\beta 9$
N / K	383	Alça $\beta 8$ - $\beta 9$
K / R	386	Fita $\beta 9$
K / R	391	Fita $\beta 9$

Além dos parâmetros estruturais avaliados, a superfície eletrostática do modelo também foi obtida e analisada a partir do próprio PyMol. A parte lateral externa do modelo apresenta um acúmulo de cargas positivas, enquanto a região lateral interna apresenta distribuição mais uniforme das cargas. Já a região externa apical possui mais cargas negativas, assim como a região interna apical. A figura 5.9 mostra a superfície eletrostática das regiões do modelo.

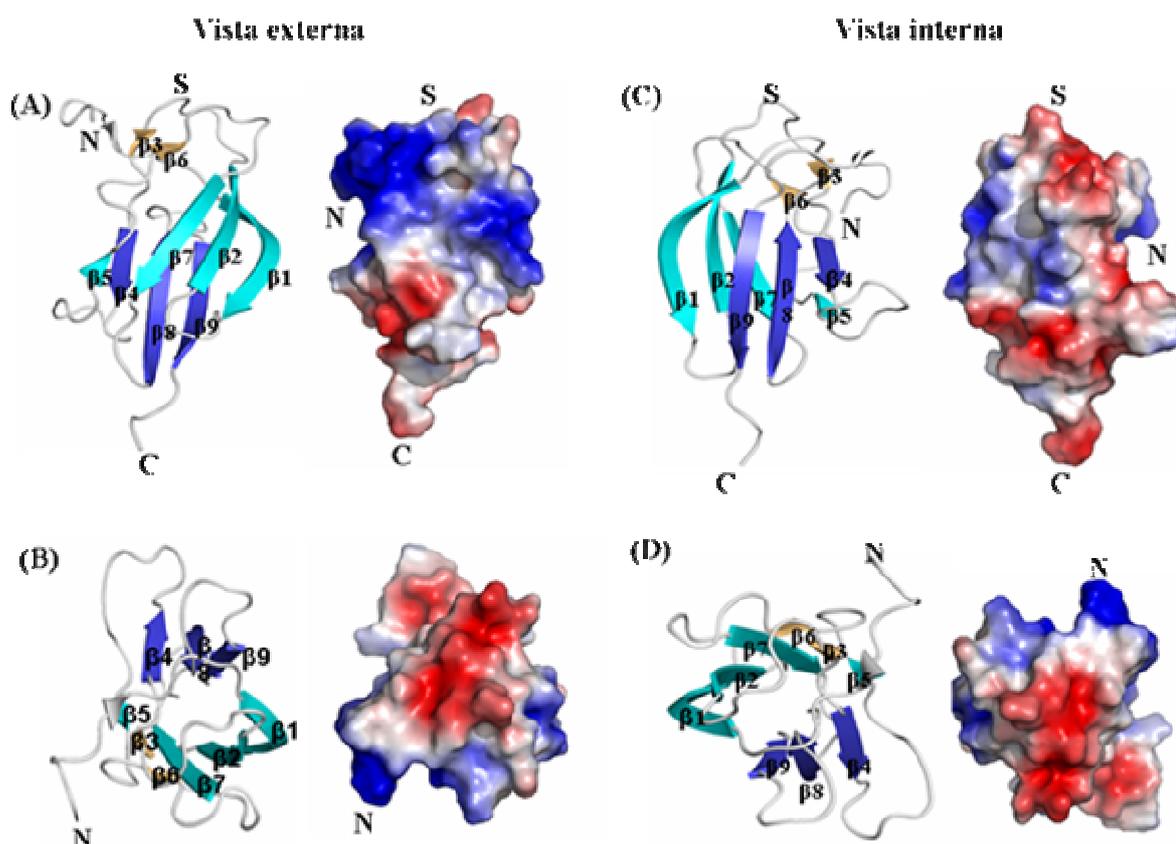


Figura 5.9. Superfície eletrostática do modelo de DENV-3 16562 em diversos ângulos. Os esquemas de superfície eletrostática são acompanhados pelos respectivos modelos para facilitar o entendimento da visão mostrada. Cargas positivas estão em azul, negativas em vermelho e neutras, em branco. (A) Visão lateral externa do DIII mostrando que nessa região predominam as cargas positivas (azul) diferentemente da região lateral interna onde há maior equidade na distribuição das cargas (C). (B) Visão externa apical do modelo onde predominam as cargas negativas (vermelho), assim como na superfície apical interna (D). N: N-terminal da proteína; C: C-terminal da proteína e S: região voltada para a superfície do vírion.

5.2 Construção do vírus recombinante

5.2.1 Obtenção do cassete de expressão e clonagem no pCR-Blunt II-TOPO®

Houve muita dificuldade em amplificar o DIII de DENV-3 16562 a partir de RNA extraído do sobrenadante de células de *Ae. albopictus* clone C6/36 infectadas utilizando enzimas mesofílicas que fazem a reação de RT-PCR a 42°C. Especulou-se então que essa região do RNA poderia ser rica em estruturas secundárias, o que dificultaria uma amplificação com enzimas comuns, mas poderia ser amplificada com enzimas termoestáveis que sintetizam cDNA a temperaturas mais elevadas, linearizando o RNA molde e permitindo sua amplificação. A seqüência DIII só foi amplificada de forma satisfatória quando foram utilizadas enzimas termoestáveis que sintetizam o cDNA a 65°C.

Para amplificar a HA trucada de DENV-4, utilizou-se um plasmídeo com o cDNA da quimera FA 17D/DENV-4 e não houve dificuldades com a reação de PCR que foi realizada utilizando uma DNA polimerase termoestável de alta fidelidade, com atividade exonucleásica 3'-5'. Os dois fragmentos amplificados eram complementares em uma de suas extremidades e foram unidos por um PCR de fusão utilizando os oligonucleotídeos das pontas não complementares, gerando um cassete de expressão de 573 pb.

O fragmento resultante da PCR de fusão foi adicionado ao plasmídeo pCR-Blunt II-TOPO® de 3519 pb e a mistura foi transformada em *E. coli* quimiocompetentes DH5α resultando em diversos clones positivos com 4092 pb. A clonagem foi confirmada por digestão com a endonuclease *Eco* RI, que libera o inserto do plasmídeo, e por seqüenciamento nucleotídico. A figura 5.10 mostra os fragmentos da RT-PCR, PCR e PCR de fusão amplificados, bem como preparações plasmidiais e análise dos clones positivos do pCR-Blunt II-TOPO® após serem digeridos com as endonucleases *Eco* RI e *Nar* I, submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8 %/TAE e corados com BrEt.

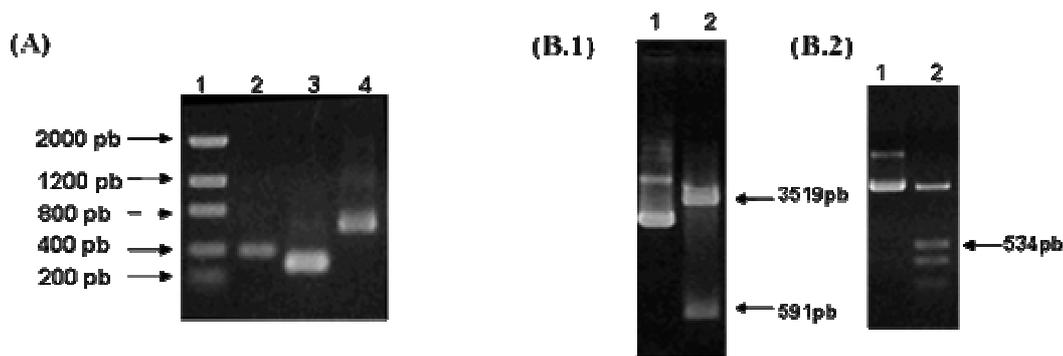


Figura 5.10. Análise dos fragmentos de amplificação do cassete de expressão e clonagem do cassete no pCR-Blunt II-TOPO[®]. Eletroforese em géis de agarose 0,8 %/TAE corados com BrEt. (A) Fragmentos da amplificação do cassete de expressão heterólogo: DIII DENV-3 16562 com 367 pb (poço 2); HA truncada de DENV-4 com 250 pb (poço 3); cassete heterólogo com 573pb, resultante da PCR de fusão entre as duas amplificações anteriores (poço 4). (B) Clonagem do cassete heterólogo no pCR-Blunt II-TOPO[®]. (B.1) Poços: 1 - preparação plasmidial do pCR-Blunt II-TOPO[®] com o cassete de expressão clonado; 2 - digestão desse plasmídeo com a endonuclease *Eco* RI confirmando a clonagem por mostrar duas bandas: uma de 3519 pb correspondente ao plasmídeo e outra de 591 pb que corresponde ao inserto de interesse mais seqüências flanqueadoras do sítio de *Eco* RI. (B.2) Preparação plasmidial do pCR-Blunt II-TOPO[®] (poço 1) e a sua digestão com a endonuclease *Nar* I (poço 2), levando a liberação do inserto de interesse: banda de 534 pb.

5.2.2 Subclonagem do cassete no plasmídeo pT3

Após confirmação da clonagem, o cassete de expressão foi retirado do pCR-Blunt II-TOPO[®] por digestão com a endonuclease *Nar* I (banda de 534 pb; figura 5.10B) e ligado ao mesmo sítio do plasmídeo bacteriano pT3, previamente digerido com a mesma endonuclease e desfosforilado. A ligação foi transformada em linhagem de *E. coli* Sure quimiocompetente o que gerou diversos clones.

Entretanto, alguns clones continham deleções grandes e visíveis em gel de agarose após digestão com endonuclease específica. Além disso, todos os clones que não possuíam deleções e foram confirmados como positivos por meio de digestão com as endonucleases *Pst* I ou *Nar* I, mostraram-se clonados de forma invertida no pT3 quando seqüenciados. Como isso ocorreu em uma proporção aparentemente acima dos 50% esperados em uma clonagem não direcional, especulou-se que o DIII pudesse ser deletério para as bactérias e, por isso, só conseguia ser clonado de forma invertida ou com deleções, ou seja, quando não estava sendo expresso corretamente.

Uma nova transformação foi feita diminuindo a concentração do antibiótico utilizado na seleção dos clones pela metade (de 50 µg/mL para 25 µg/mL). Vários clones foram

obtidos, muitos confirmados por seqüenciamento como estando na posição correta e sem deleções ou mutações. A figura 5.11 mostra a subclonagem do cassete no pT3 por meio de eletroforese em géis de agarose 0,8 %/TAE corados com BrEt.

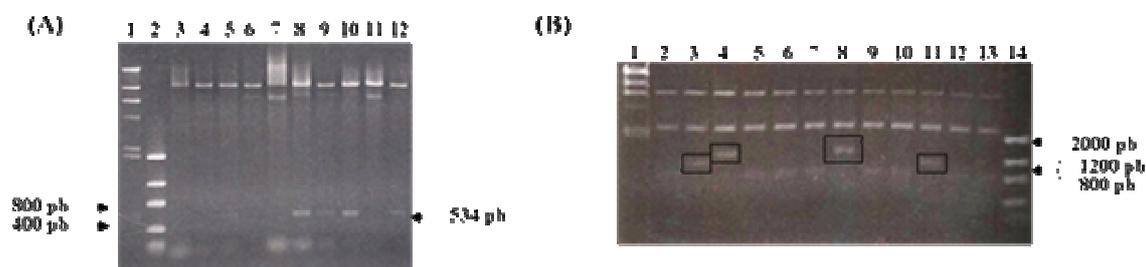


Figura 5.11. Clonagem do cassete heterólogo no plasmídeo pT3. Análises de eletroforese em géis de agarose 0,8 %/TAE corados com BrEt. (A) Clones negativos (poços 3, 4, 5, 6, 7 e 11) e positivos (poços 8, 9, 10 e 12) do plasmídeo pT3 após digestão com a endonuclease *Nar* I. A seta à direita indica a posição e o tamanho (534 pb) do inserto clonado, liberado após digestão. (B) Digestão dos clones com a endonuclease *Pst* I revela clones positivos (poços 4 e 8), deletados (poços 3 e 11) e negativos (poços 2, 5, 6, 7, 9, 10, 12 e 13).

5.2.3 Obtenção do molde de cDNA.

A tecnologia do clone infeccioso de *Flavivírus* consiste em acomodar de forma estável o genoma de RNA fita simples positiva do vírus sob a forma de cDNA em plasmídeos, de modo que o genoma viral possa ser manipulado geneticamente. No caso de FA, o genoma só é estável quando distribuído em dois plasmídeos, um contendo a região central do genoma viral (nesse caso o pT3) e o outro as regiões 5' e 3' do vírus, além de um promotor do fago SP6 (plasmídeo pG1/2).

Um dos clones positivos do pT3Den3, assim como o plasmídeo pT3 sem inserto, juntamente com o pG1/2, foram escolhidos para a construção do vírus recombinante FA17D/DIII_{DENV-3} e do vírus controle FA17D/G1.2/T3, respectivamente. Cada um dos plasmídeos foi digerido com as endonucleases *Nsi* I e *Sal* I, simultaneamente. O pT3Den3 originou bandas de 8298 pb e 2175 pb; o pT3 sem o inserto originou bandas de 7764 pb e 2175 pb; o pG1/2 originou bandas de 5146 pb e 1759 pb.

Os fragmentos do pT3Den3 foram ligados aos do pG1/2 obtendo-se o molde de cDNA do vírus recombinante, enquanto os fragmentos do pT3 sem inserto ligados aos do pG1/2 originaram o molde de cDNA do vírus controle. Ambos os moldes foram linearizados por digestão com a endonuclease *Xho* I e transcritos *in vitro* por meio do promotor da SP6 RNA

polimerase. A figura 5.12 ilustra as etapas de digestão e ligação, além da transcrição vistas por eletroforese em géis de agarose 0,8 %/TAE corados com BrEt.

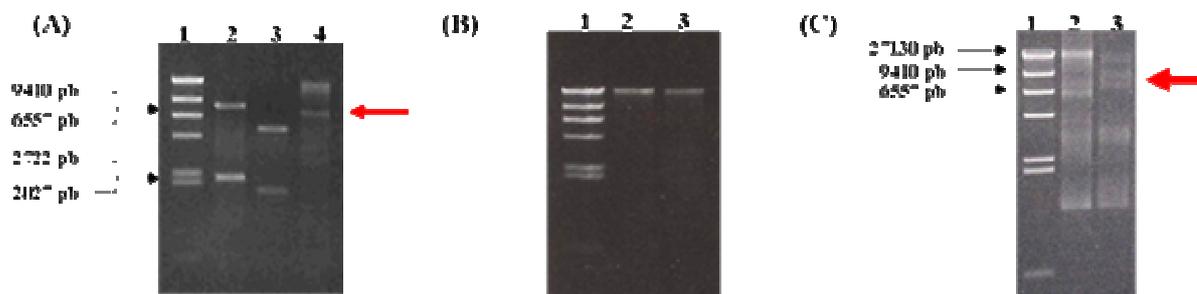


Figura 5.12. Etapas para obtenção do molde de cDNA analisadas em géis de agarose 0,8 %/TAE corados com BrEt. (A) Digestões simultâneas com as endonucleases *Nsi I/Sal I*: pT3Den3 (poço 2); pG1/2 (poço 3). No poço 4 está o molde de cDNA do vírus recombinante após ligação (B) e linearização com *Xho I*. (B) Ligação de plasmídeos previamente digeridos com *Nsi I/Sal I*: pT3 sem inserto com pG1/2 (poço 2) e pT3Den3 com pG1/2 (poço 3). (C) Produtos da transcrição *in vitro* do molde de cDNA viral: RNA correspondente à transcrição do vírus controle FA17D/G1.2/T3 (poço 2); RNA correspondente à transcrição do vírus recombinante FA17D/Esa/DIII_{DENV-3} (poço 3). As setas vermelhas indicam o fragmento que corresponde ao molde de cDNA (A) ou RNA (C) do vírus recombinante.

5.3 Regeneração dos vírus e estoque viral.

Os RNAs sintetizados foram utilizados para transfectar monocamada de células Vero, levando à obtenção do vírus controle FA 17D/G1.2/T3, fenotipicamente semelhante ao da cepa vacinal 17DD, e do vírus recombinante FA 17D/Esa/DIII_{DENV-3} (de forma abreviada, FA 17D/D3).

O sobrenadante celular da transfecção (denominado 1P) do vírus FA 17D recombinante foi coletado. Uma amostra da suspensão foi submetida à extração de RNA seguida de RT-PCR na presença de oligonucleotídeos sintéticos correspondentes às seqüências do genoma viral que flanqueiam o inserto, obtendo-se uma banda de 1513 pb que, após seqüenciamento, confirmou a inserção correta do DIII no FA 17D entre E/NS1, gerando o vírus FA 17D/Esa/DIII_{DENV-3}.

O sobrenadante viral 1P foi utilizado em nova infecção de células Vero para se obter um grande estoque de segunda passagem ou 2P, pois esse estoque será utilizado em todas as etapas de caracterização do vírus. Amostras de RNA de sobrenadante celular 2P foram submetidas a RT-PCR e seqüenciamento, com os mesmo oligonucleotídeos utilizados na 1P,

confirmando a integridade da inserção no vírus vetor, como mostrado na figura 5.13. Estoques 2P dos vírus controles FA 17D/G1.2/T3 e FA 17DD também foram obtidos.

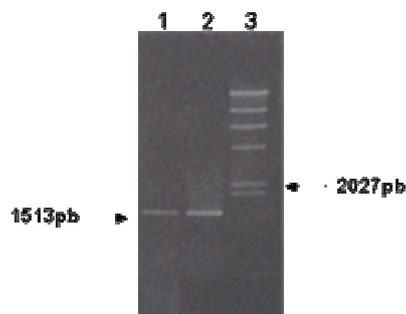


Figura 5.13. Estabilidade genética do vírus recombinante nas primeira e segunda passagens em células Vero. Eletroforese em gel de agarose 0,8 %/TAE corado com BrEt mostrando os *amplicons* obtidos na RT-PCR de sobrenadante de células Vero infectadas com FA 17D/Esa/DIII_{DENV-3} nas passagens 1P (poço 1) e 2P (poço 2). A reação utilizou oligonucleotídeos que flanqueiam o cassete de expressão, inserido entre E/NS1, pareando nas regiões 1639-1659 pb (positivo) e 3152-3172 pb (negativo) do genoma do vírus FA recombinante, obtendo-se uma banda de 1513 pb.

5.4. Caracterização viral

5.4.1 Titulação e cinética de replicação em células Vero

Alíquotas do estoque 2P do vírus recombinante FA 17D/Esa/DIII_{DENV-3} e dos vírus FA controles (FA 17D/G1.2/T3 e FA 17DD) foram utilizadas para titular os vírus por ensaio de placa em células Vero. Foram feitos três ensaios independentes por vírus, sendo que em cada ensaio os vírus foram titulados em duplicata. Os títulos obtidos foram: 6,0 log₁₀ PFU/mL para o FA 17D/D3; 7,7 log₁₀ PFU/mL para o FA 17D/G1.2/T3; 7,5 log₁₀ PFU/mL para o FA 17DD.

Esses mesmos vírus foram utilizados posteriormente para infectar células Vero com uma MOI de 0,02 em um ensaio de cinética de replicação e tiveram alíquotas coletadas a 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h p.i.. Cada uma dessas alíquotas foi titulada por ensaio de placa em duplicata e a cinética foi feita três vezes de forma independente. Dessa forma, pôde-se acompanhar a replicação viral em termos de log₁₀ PFU/mL ao longo do tempo e obter uma curva de replicação característica de cada vírus (Figura 5.14). A tabela 5.3 contém os valores acompanhados pelo desvio-padrão de cada ponto das curvas e os picos de replicação (tempo precoce com maior título) para cada vírus em **negrito**.

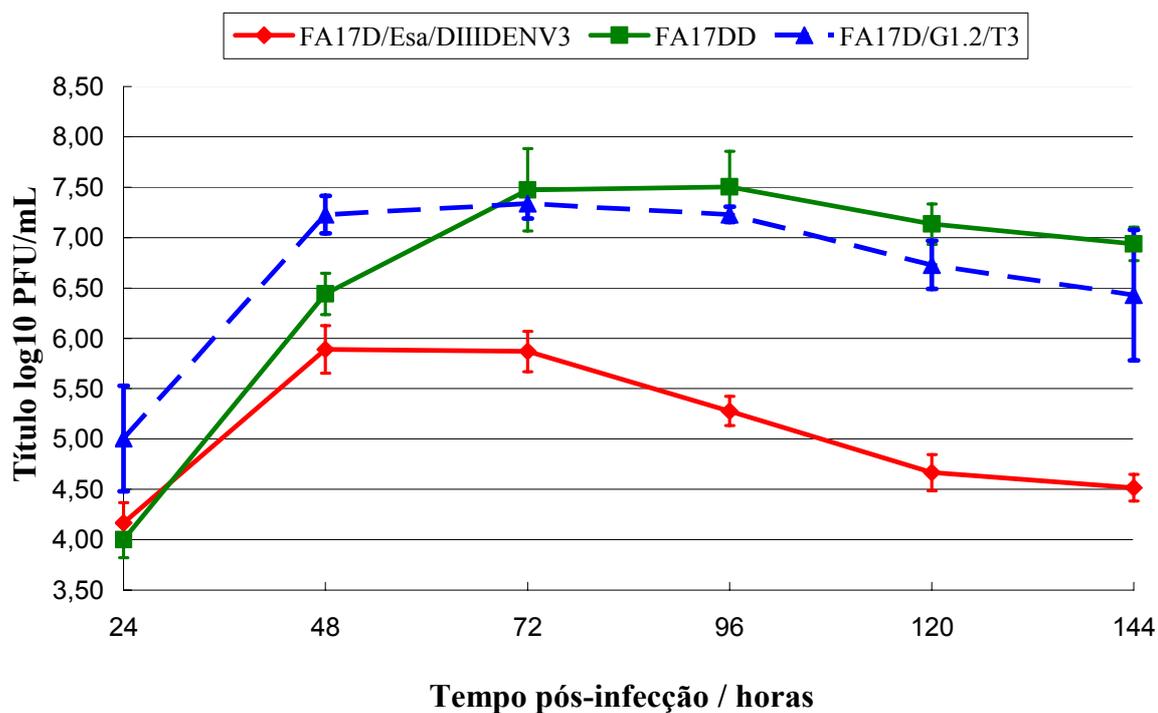


Figura 5.14. Cinética de replicação do vírus recombinante e dos controles vacinal e parental. A cinética foi feita em monocamada de células Vero com MOI 0,02 utilizando os vírus FA 17D/Esa/DIII_{DENV3} (em vermelho) e controles FA 17DD (em verde) e FA 17D/G1.2/T3 (em azul) e mostra a replicação de cada vírus em log₁₀ PFU/mL ao longo do tempo pós-infecção. Os pontos das curvas representam a média de três experimentos independentes e estão acompanhados pelos respectivos desvios-padrão.

Tabela 5.3 – Valores e seus desvios-padrão em log₁₀ PFU/mL da cinética de replicação em monocamada de células Vero.

Vírus	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
FA17D/D3	4,17±0,20	5,89±0,24	5,87±0,20	5,28±0,15	4,67±0,18	4,52±0,13
FA17D/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
FA17DD	4,00±0,18	6,44±0,21	7,47±0,41	7,50±0,35	7,13±0,20	6,94±0,17

As células em negrito indicam os picos de replicação viral (tempo precoce com maior título) para cada vírus.

Para análise das cinéticas entre os vírus foi realizado o teste estatístico de comparação múltipla Bonferroni com $P < 0,05$. Essa análise revelou que em 24 h p.i. o vírus recombinante FA 17D/D3 possui níveis de replicação semelhantes ao 17DD sem diferença estatística ($P > 0,05$), porém a partir de 72 h p.i. o nível de replicação do 17DD aumenta assemelhando-se ao vírus 17D/G1.2/T3 ($P > 0,05$) e distanciando-se do FA17D/D3 ($P < 0,001$), o que se mantém até 144 h p.i. ($P < 0,01$).

Os vírus parental 17D/G1.2/T3 e recombinante FA 17D/D3 possuem níveis de replicação com diferença estatística a partir de 48 h p.i. ($P < 0,001$) até 144 h p.i. ($P < 0,01$). Entretanto, o formato geral da curva da cinética de replicação é bastante semelhante entre esses vírus. Entre os vírus controle há diferença apenas em 24 h p.i. ($P < 0,05$) e 48 h p.i. ($P < 0,01$), mas a partir de 72 h p.i. não há mais diferença com $P > 0,05$.

A análise de cada vírus isoladamente ao longo do tempo foi feita utilizando-se o ANOVA *one-way* com pós-teste Tukey e $P < 0,05$. O pico de replicação do FA 17DD ocorre em 72 h p.i. e mantém-se sem diferença significativa até 144 h p.i. ($P > 0,05$). O FA 17D/G1.2/T3 possui pico em 48 h p.i. que mantém-se até 144 h p.i. com $P > 0,05$. O vírus recombinante, FA17D/D3, possui pico de replicação em 48 -72 h p.i. sem diferença entre os tempos ($P > 0,05$). Entretanto, após esse pequeno platô, os níveis de replicação caem de forma abrupta e 144 h p.i. voltam praticamente aos níveis de 24 h p.i. com $P < 0,05$.

Devido a essas diferenças na cinética dos vírus controles e recombinante, foi feito um ensaio em microscopia de contraste de fase com fotos tiradas nos mesmos tempos p.i. da cinética de replicação. O objetivo era saber se as diferenças entre os vírus refletiam-se no CPE induzido pelos mesmos em células Vero. A figura 5.15 ilustra o ensaio em microscopia de contraste de fase.

Esse ensaio revelou que há uma grande diferença de CPE a 72 h p.i. entre os vírus 17D/G1.2/T3 e FA 17D/D3 em relação ao 17DD, cujo CPE mantém-se próximo ao do *mock*. Além disso, o CPE dos vírus parental e recombinante FA 17D/D3 são muito parecidos, o que pode ocorrer devido ao compartilhamento do mesmo arcabouço genético por ambos os vírus.

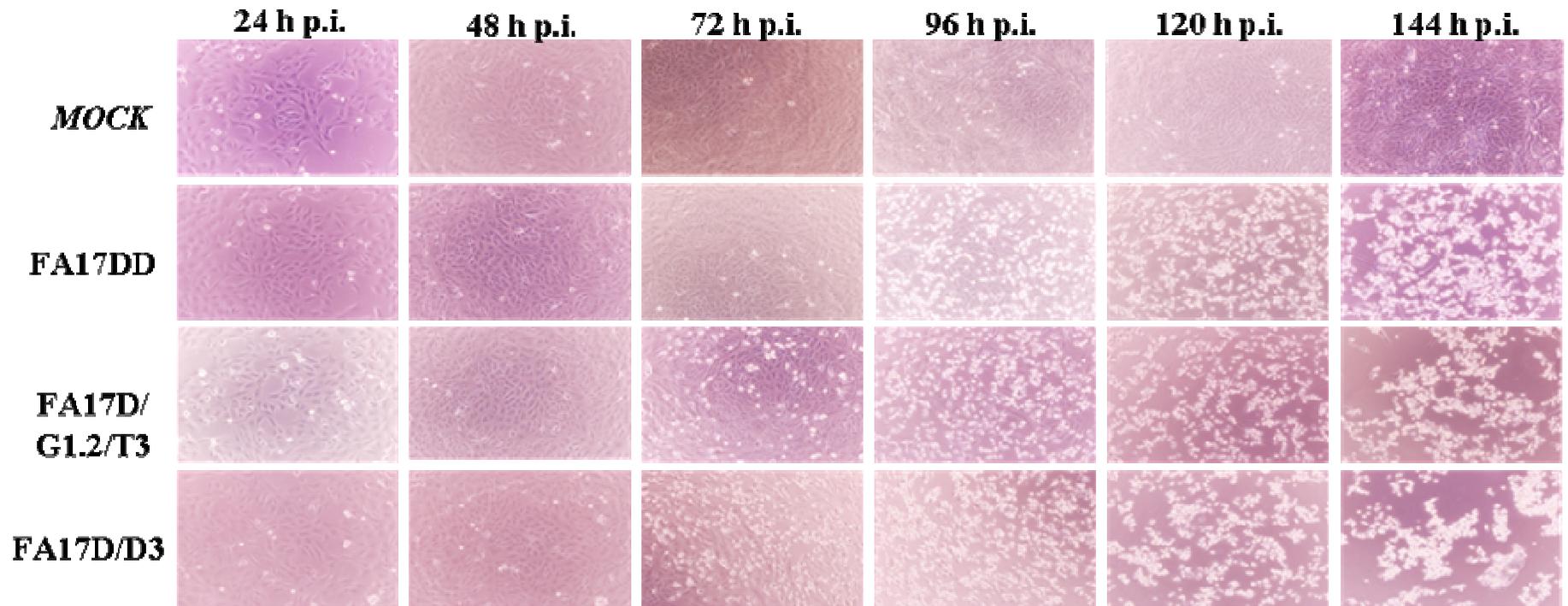


Figura 5.15. Microscopia em contraste de fase dos vírus controles FA17DD e FA17D/G1.2/T3 e do recombinante FA17D/D3 infectando ou não (*Mock*) células Vero. As fotografias foram tiradas em microscópio de contraste de fase a 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h p.i., mesmos tempos da cinética de replicação, para visualização do efeito citopático (CPE).

5.4.2 Estabilidade genética do vírus recombinante.

Esse parâmetro foi analisado por meio de duas passagens independentes sucessivas do vírus com MOI 0,02 em monocamada de células Vero seguidas de titulação, além de RT-PCR e seqüenciamento nas passagens de número 5 e 10. A tabela 5.4 contém a MOI e o título do vírus recombinante a cada passagem. Como na 5ª passagem a MOI ultrapassa o limite de 0,1, ela foi recalculada para 0,02 na infecção da 6ª passagem.

Tabela 5.4 – MOI e título em log₁₀ PFU/mL do vírus recombinante FA17D/D3 da terceira até a décima passagem em células Vero.

Passagem P1	Título (log ₁₀ PFU/mL)	MOI	Passagem P2	Título (log ₁₀ PFU/mL)	MOI
3P1	5,54	0,007	3P2	5,69	0,009
4P1	6,44	0,050	4P2	6,49	0,060
5P1	6,65	0,090	5P2	6,76	0,110
6P1	6,55	0,016	6P2	6,46	0,010
7P1	6,88	0,034	7P2	6,85	0,026
8P1	6,81	0,029	8P2	6,90	0,029
9P1	7,02	0,044	9P2	6,88	0,027
10P1	7,16	0,064	10P2	7,11	0,047

As reações de RT-PCR foram feitas com o sobrenadante celular das passagens 5 e 10 e utilizaram os mesmos oligonucleotídeos empregados na análise pela RT-PCR da 1P e 2P, obtendo-se um *amplicon* de 1513 pb caso o inserto estivesse presente ou de aproximadamente 1000 pb, caso o inserto não estivesse presente. Na figura 5.16 as amplificações obtidas na RT-PCR dessas passagens podem ser vistas por eletroforese em gel de agarose 0,8 %/TAE corado com BrEt.

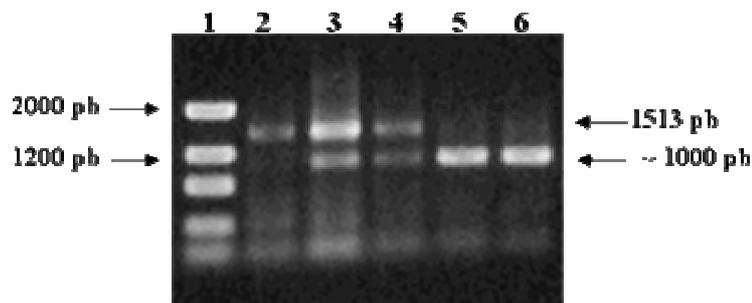


Figura 5.16. Estabilidade genética do vírus recombinante nas passagens 2P, 5P e 10P. Eletroforese em gel de agarose 0,8 %/TAE mostrando os *amplicons* obtidos na RT-PCR de sobrenadante de células Vero infectadas com FA 17D/Esa/DIII_{DENV-3} nas passagens: 2P em que o cassete de expressão está intacto dentro do vírus (poço 2); 5P em que há mistura de populações virais com e sem o inserto (poços 3 e 4); e 10P em que o inserto foi perdido em toda a população viral (poços 5 e 6).

A RT-PCR mostrou que embora na 2ª passagem o inserto esteja intacto e íntegro no vírus, na 5ª passagem já há perda do inserto com a existência de duas populações virais distintas uma com e outra sem o inserto. Na 10ª passagem, o inserto já foi totalmente perdido e somente a banda de aproximadamente 1000 pb, que indica ausência da inserção no vírus, é visível.

Cada *amplicon* foi seqüenciado três vezes em cada sentido o que confirmou o descrito anteriormente e revelou que existe mutação no vírus tanto na 5P como na 10P. Na passagem 5P1 o inserto está presente em apenas parte da população, mas não há mutações; na 10P1 o inserto não existe em toda a população, permanecendo apenas o N-terminal do cassete (DQG) e o final da HA DENV-4 (LFLGFTVGA), retornando em seguida para DQGCAINFGKRELK e seguindo na seqüência do plasmídeo pT3. Foi verificado na 10P1 mutação na base 593 (tendo como zero o início da seqüência do plasmídeo pT3 onde foi feita a clonagem) de C para G levando a modificação de aminoácido de T para A.

A passagem 5P2 também possui o inserto heterólogo presente em apenas parte da população, porém já apresenta a mutação na mesma base 593 de C para G levando a modificação de aminoácido de T para A. Na passagem 10P2 a mutação mencionada permanece e, assim como na 10P1, não há presença do inserto em toda a população, permanece apenas o N-terminal do cassete (DQG) e o final da HA DENV-4 (FLGFTVGA), seguido pela seqüência do plasmídeo pT3 (DQGCAINFGKRELK). A figura 5.17 ilustra qual parte do cassete de expressão permaneceu nas populações virais em 10P1 e 10P2.

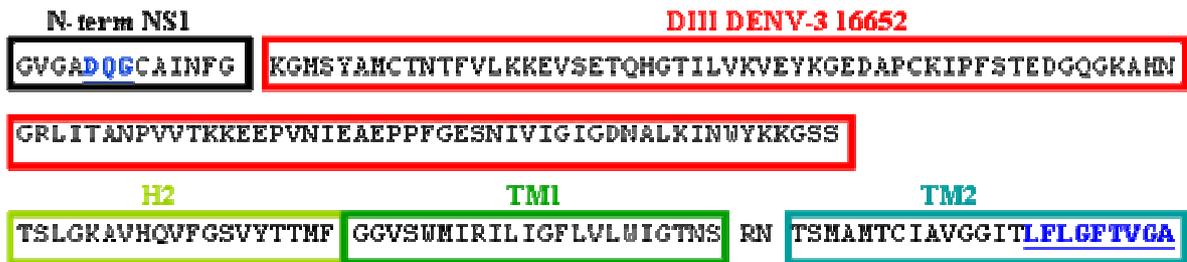


Figura 5.17. Modificações ocorridas no cassete de expressão das populações virais de 10P1 e 10P2. Apenas as seqüências destacadas em azul e sublinhadas do cassete permaneceram nas populações virais em 10P1. O mesmo foi observado para 10P2 com exceção do aminoácido L no início da marcação em azul em TM2 que não foi encontrado no inserto.

5.4.3 Ensaios de imunofluorescência

Foram feitos ensaios de imunofluorescência infectando células Vero com MOI 0,02 com os vírus controle FA 17DD e DENV-3 IOC e com o recombinante FA 17D/D3. As marcações feitas 72 h p.i. foram observadas em microscópio confocal. Na figura 5.18 tem-se uma prancha com os resultados.

A marcação com o anticorpo primário foi específica e apenas o vírus recombinante expressa tanto a proteína E de FA, como o DIII da proteína E de DENV-3. Além disso, essa expressão ocorre, em todos os casos, em uma região perinuclear que corresponde, muito provavelmente, ao RER da célula hospedeira. Os vírus controle utilizados para verificar a especificidade da marcação só expressam a proteína E presente em seus genomas: proteína E de FA (vírus FA 17DD) e proteína E de DENV-3 (vírus DENV-3 IOC).

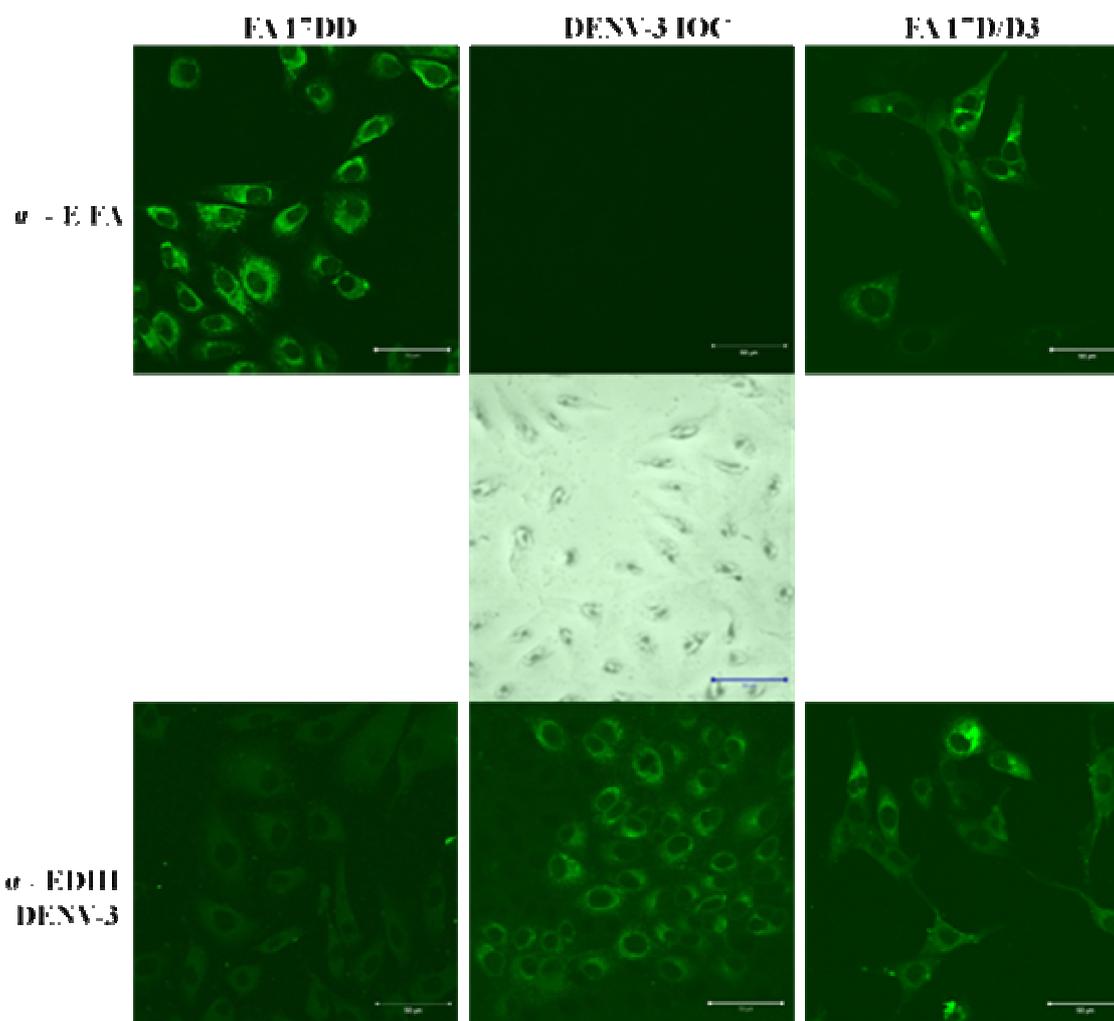


Figura 5.18. Ensaio de imunofluorescência com o vírus recombinante para detecção da expressão de DIII de DENV-3. A marcação com o anticorpo primário é específica e apenas o recombinante expressa a proteína E de FA, bem como o DIII da proteína E de DENV-3. O vírus recombinante expressa o DIII de DENV-3 em uma região perinuclear que corresponde, muito provavelmente, ao RER da célula hospedeira. Os vírus controle utilizados para verificar a especificidade da marcação só expressam a proteína E presente em seus genomas: proteína E de FA (FA 17DD) e proteína E de DENV-3 (DENV-3 IOC). As barras correspondem a 50 μm

6. DISCUSSÃO

Este trabalho propõe uma estratégia de utilização do vírus vacinal FA 17D como vetor para expressão de proteínas heterólogas na região intergênica E/NS1 com o objetivo de obter-se novas vacinas combinadas contra patógenos humanos que compartilhem uma área de transmissão, como é o caso de DENV e FA ou de malária e FA. Essa metodologia é uma adaptação do proposto por Bonaldo *et al.* (2007) e consistiu em expressar o DIII da proteína E de DENV-3 na região intergênica E/NS1 do vírus vacinal FA 17D. Assim, o vírion recombinante é uma partícula do vírus FA 17D, que ao infectar uma célula expressa no seu interior, muito provavelmente no RER, o polipeptídeo exógeno, o DIII de DENV-3.

Bonaldo *et al.* (2007) expressaram a proteína repórter autofluorescente GFP na região intergênica E/NS1 de FA 17D. Essa estratégia levou em consideração a existência de motivos funcionais e regiões conservadas flanqueando E/NS1 para duplicá-las e fusioná-las ao inserto de interesse. Assim, foram fusionados nove aa do N-terminal de NS1 ao N-terminal da GFP e a região HA completa de FA ao C-terminal da proteína de interesse. O objetivo dessas seqüências flanqueando o inserto foi permitir o correto endereçamento e translocação da poliproteína viral que é processada em associação com o RER da célula hospedeira garantindo a viabilidade e estabilidade do vírus recombinante (Chambers *et al.*, 1990),

Neste trabalho, a HA completa de FA foi substituída por uma versão truncada (sem os elementos H1 e CS) de DENV-4. O objetivo foi diminuir a identidade entre a HA presente no vírus vetor e a HA do cassete heterólogo para aumentar a estabilidade genética do vírus, evitando a perda da inserção por pareamento entre essas HA complementares não alélicas durante a replicação do genoma viral, como sugerido por Bonaldo *et al.* (2007).

O DIII da proteína do envelope de DENV-3 foi escolhido por participar da maioria dos eventos biológicos relevantes relacionados à patogenia do vírus como ligação ao receptor do hospedeiro (Chen *et al.*, 1996), virulência, neurovirulência e atenuação (Leitmeyer *et al.*, 1999; Sanchez & Ruiz, 1996). Roehrig (2003) diz que anticorpos dirigidos ao DIII tendem a ser sorotipo-específicos e são os mais eficientes na neutralização da infecção celular. Logo, uma formulação tetravalente com quatro construções do vírus FA 17D expressando o DIII de cada um dos sorotipos de dengue entre E/NS1 poderia levar ao desenvolvimento de uma vacina atenuada combinada contra DENV e FA em que os quatro sorotipos de dengue replicariam-se de forma homogênea, sem que houvesse risco de uma exarcebção da resposta imune devido ao ADE.

Não há um consenso quanto à delimitação do DIII (Rey *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996; Modis *et al.*, 2005; Volk *et al.*, 2007). A tripsinização de E libera a proteína na sua forma

dimérica, solúvel, sem a região HA, incluindo os aa de 1-395 em TBE (Heinz *et al.*, 1991) o que significa até o aminoácido K392 de DENV-3 (sem a porção GSS final).

Neste trabalho, o DIII foi delimitado como uma região de 103 aa que se estende do aa 293 ao 395 da proteína E de DENV-3 incluindo, portanto, a porção C-terminal que conecta-se à HA (GSS). Os resíduos limítrofes do DIII foram escolhidos por serem aa com cadeia lateral pequena e não serem hidrofóbicos. Este último critério justifica-se para não alterar a solubilidade do domínio e garantir a expressão de sua forma nativa, sem perder características tridimensionais que afetem seu reconhecimento por anticorpos neutralizantes, por exemplo. A porção GSS foi mantida por possuir resíduos bastante conservados em *Flavivírus* e que possuem cadeia lateral pequena, proporcionando maior flexibilidade à cadeia polipeptídica o que, em teoria, levaria a uma melhor acomodação do DIII em relação à poliproteína viral como um todo e aos domínios fusionados do cassete heterólogo.

As fitas do DIII foram nomeadas de acordo com a nomenclatura empregada por Volk *et al.* (2007). Entretanto, caso seja empregada a nomenclatura utilizada por Rey *et al.* (1995), as fitas β 1-9 equivalem a: A, B, Cx, C, D, Dx, E, F e G, respectivamente, observando-se algumas alterações em relação às suas composições e/ou extensões. A primeira folha é formada pelas fitas β 1, β 2, β 5, β 7 e sua face externa superior fica exposta na partícula viral, enquanto no dímero da proteína E a maior parte dessa folha interage com o DII do monômero oposto. A segunda folha é menor e possui as fitas β 3 e β 6: sua face externa interage com o DI do mesmo monômero. A terceira folha engloba as fitas β 4, β 8, β 9 e é a mais distante da superfície da partícula viral (Rey *et al.*, 1995; Volk *et al.*, 2007).

A proteína E possui 40 % de conservação entre os *Flavivírus* (Chambers *et al.*, 1990) e alinhamento realizado entre o DIII dos quatro sorotipos de dengue mostrou identidade de cerca de 44 % (Figura 5.1). Estudos realizados com o DIII de DENV-3 revelaram que esse sorotipo possui quatro genótipos geneticamente distintos: vírus oriundos da Indonésia, Malásia, Filipinas e Ilhas do Pacífico Sul (genótipo I), vírus da Tailândia (genótipo II), vírus do Sri Lanka, Índia, África e Samoa (genótipo III) e vírus de Porto Rico e Taiti (genótipo IV) (Lanciotti *et al.*, 1994).

De acordo com essa classificação, foi escolhido um vírus de cada genótipo para alinhamento com o vírus 16562, utilizado na construção do vírus recombinante (Figura 5.2). Esse alinhamento ilustra a grande conservação estrutural e seqüencial que existe entre os DIII de DENV-3 com aproximadamente 87 % de identidade entre os resíduos de aa. Entretanto, também podem ser vistas 13 diferenças entre substituições conservadas, semi-conservadas e não conservadas.

Das diferenças encontradas, a maioria (sete) encontra-se distribuída na superfície do DIII. Destas, cinco estão relacionadas a sítios capazes de induzir a formação de anticorpos neutralizantes pelo hospedeiro: aminoácidos T301, N302, T303, K325 e N383, fazendo parte de epítomos maiores que englobam os aminoácidos 301-307 (alça I₀-β1 no N-terminal e fita β1 do DIII) (Lin *et al.*, 1994), 381-383 (alça entre as fitas β8 e β9) (Hiramatsu *et al.*, 1996; Hung *et al.*, 2004), além de um epítomo estrutural localizado em quatro alças da superfície externa do DIII (alça I₀-β1, alças entre as fitas β2-β3, β5-β7, β8-β9) que inclui os resíduos 301, 302, 303, 325 e 383 (Nybakken *et al.*, 2005).

O resíduo V355 é o único dos resíduos de superfície que não está localizado em uma alça, uma região naturalmente mais variável, mas sim na fita β6. Logo, ele não chega a fazer parte da alça entre as fitas β5-β7 e não faz contato com o anticorpo neutralizante E16 citado por Nybakken *et al.* (2005). Já o resíduo I380 está adjacente a um sítio que induz a formação de anticorpos neutralizantes: aminoácidos de 381 a 383 (GDN) (Hiramatsu *et al.*, 1996; Hung *et al.*, 2004) localizada na alça entre as fitas β8 e β9, observada em *Flavivírus* transmitidos por mosquitos.

Diferenças entre genótipos, principalmente se localizadas em alças no topo do DIII, parecem ter implicações importantes na resposta imune do hospedeiro e afetar o reconhecimento de anticorpos oriundos de imunização prévia contra um outro genótipo do mesmo sorotipo (Zulueta *et al.*, 2006).

Entre as demais diferenças encontradas, apenas o G340 localiza-se distante da superfície do vírion na região da alça entre as fitas β4-β5. Na literatura, não existe nada descrito que justifique essa diferença que parece ser um caso isolado uma vez que ela ocorreu apenas no vírus de Porto Rico 1977, mas não estava presente nos vírus Porto Rico 1963 e Taiti 1965, todos pertencentes ao genótipo IV de DENV-3 (Lanciotti *et al.*, 1994).

As duas outras diferenças entre genótipos de DENV-3 foram encontradas na 1ª folha: 320-322 (VKV) e na 3ª folha (fita β9). As diferenças encontradas nos aminoácidos 320-322 (fita β2), que interagem com o DII do monômero oposto, são substituições conservadas para as quais não foi descrita função na literatura. Essas diferenças ocorrem em alguns vírus, mas não são características de nenhum genótipo específico (Lanciotti *et al.*, 1994). Assim como esses resíduos, todas as diferenças observadas em região de fita ou delimitando fitas foram substituições conservadas, o que reflete uma menor variabilidade natural dessas estruturas quando comparada às regiões de alças.

A outra diferença reside na fita β9 em resíduos localizados distantes da superfície viral: K386 e K391. Estes resíduos de lisina, devido a sua carga positiva, estariam envolvidos com a ligação a receptores celulares do tipo HS, altamente negativos. Entretanto, apesar de

ambos encontrarem-se dentro da região putativa de ligação a HS: aminoácidos 284-310 e 386-411 (Chen *et al.*, 1997), apenas K391 parece estar envolvida nesse tipo de ligação, enquanto K386, assim como os aminoácidos I380 e N383, fazem parte da alça putativa de ligação a receptores em células de *Ae. albopictus* clone C6/36, presente apenas em *Flavivírus* transmitidos por mosquitos (Hung *et al.*, 2004) e delimitada pelos aa 378-387 em DENV-3. O resíduo 386 também está relacionado a escape de neutralização por meio de uma mutação detectada de K para N selecionada em DENV-3 na presença do anticorpo monoclonal neutralizante 1H9 (Serafin & Aaskov, 2001)

Zulueta *et al.* (2006) mapeiam cinco substituições no DIII de DENV-3 que determinariam a antigenicidade e a imunogenicidade em camundongos: aa 301, 303, 329, 383 e 391. Das cinco substituições, quatro correspondem às diferenças que também foram encontradas no alinhamento entre genótipos de DENV-3: aminoácidos 301, 303, 383 e 391.

A substituição de T303 por A303 presente no vírus Fiji 1992 do alinhamento é característico do genótipo I ao qual pertence esse vírus (Lanciotti *et al.*, 1994). As substituições nos aminoácidos 301 e 383 ocorrem em posições que determinam genótipos (Zulueta *et al.*, 2006) e 383 está localizado na alça entre as fitas $\beta 8$ - $\beta 9$ cuja mutação em DENV-2 afeta a interação com o anticorpo monoclonal 3H5 (Hiramatsu *et al.*, 1996).

O resíduo 391 é altamente conservado entre DENV-3 com exceção de alguns vírus oriundos do sudeste asiático como H87; os resíduos 301, 329 e 383 estão localizados em alças no topo do DIII próximos o suficiente para pertencerem ao mesmo epítipo de superfície (Zulueta *et al.*, 2006). Mutações neste epítipo afetariam o reconhecimento por anticorpos, o que é corroborado pelo estudo de Nybakken *et al.* (2005).

Um anticorpo monoclonal cujo epítipo está presente no DIII e que possui características bastante interessantes é o 4E11 criado inicialmente contra DENV-1, mas que logo mostrou ser capaz de neutralizar os quatro sorotipos de dengue e nenhum outro *Flavivírus* (Megret *et al.*, 1992). O epítipo mínimo desse anticorpo descontínuo e conformacional encontra-se em região de fita ($\beta 1$: 305-310 e $\beta 9$: 385, 387, 389) e a conservação dos resíduos 306, 310 e 387 entre os sorotipos de dengue mas não entre os demais *Flavivírus* explicaria as características do anticorpo (Lisova *et al.*, 2007).

Embora nenhuma das diferenças do alinhamento entre os vírus de DENV-3 mapeie nas regiões de ligação a esse anticorpo, os resíduos 386 e 391 estão próximos a aminoácidos que fazem parte deste epítipo mínimo. Esses resíduos variáveis também estão próximos ao aminoácido 388 que foi descrito por Leimeyer *et al.* (1999) como sendo determinante de maior ou menor virulência caso o aminoácido seja N ou D, respectivamente. Uma asparagina é encontrada na posição 388 de DENV-3 16562 indicando uma maior probabilidade da

infecção por esse vírus levar à DHF. Sánchez & Ruiz (1996) mostraram que substituições nessa posição alteraram a neurovirulência de DENV em camundongos

Sukupolvi-Petty *et al.*, (2007) relatam que o DIII de DENV é capaz de produzir anticorpos monoclonais: tipo-específicos, cujos epítomos estão centralizados na alça entre as fitas $\beta 8$ - $\beta 9$ e bastante expostos na superfície do vírion; específicos de um subcomplexo, cujos epítomos localizam-se na fita $\beta 1$, especialmente nas lisinas presentes nessa região e que são menos expostos na superfície; com reação cruzada entre *Flavivírus*, cujos epítomos localizam-se na alça entre $\beta 1$ - $\beta 2$, fracamente acessível na estrutura do vírion. Essas diferenças parecem refletir uma conservação/variabilidade natural entre os resíduos de aminoácidos dos epítomos que levam à formação desses anticorpos.

Portanto, embora o DIII induza à produção de outros anticorpos que não os tipo-específicos, esses anticorpos não neutralizam o vírus de forma eficiente, uma vez que seus epítomos estão escondidos na superfície viral e os epítomos sorotipo-específicos são os que elicitam anticorpos com maior poder de neutralização.

O vírus utilizado para a construção do vírus recombinante DENV-3 16562 foi isolado de um caso de DHF nas Filipinas e pertence ao genótipo I (Lanciotti *et al.*, 1994). Entretanto, como este vírus foi passado várias vezes em cultura de células de mamíferos e de insetos, é possível que sua atual seqüência de aa não corresponda à original, típica desse genótipo. Um exemplo é a presença de uma treonina na posição 303, onde a existência de uma alanina é típica do genótipo vírus (Lanciotti *et al.*, 1994; Zulueta *et al.*, 2006).

A estrutura tridimensional da proteína E de *Flavivírus* é mantida por seis pontes dissulfeto bastante conservadas, sendo duas no DI, três no DII e uma no DIII (Rey *et al.*, 1995). As cisteínas que participam dessa ligação no DIII estão presentes nas posições 300 e 331 de DENV-3 e são conservadas mesmo entre os sorotipos de DENV. Epítomos do DIII que interagem com anticorpos neutralizantes costumam ser sensíveis a eliminação dessa ponte, uma vez que isso desestabiliza a estrutura tridimensional de todo o domínio (Roehrig *et al.*, 2004).

Entretanto, toda essa variabilidade entre DIII de genótipos de DENV-3 não impossibilita a criação de uma vacina contra esse sorotipo a partir de um único vírus, uma vez que anticorpos neutralizantes sorotipo-específicos elicitados por um vírus dentro de um genótipo são eficientes contra vírus de qualquer outro genótipo do sorotipo (Li *et al.*, 2005; Gromowski & Barret, 2007).

A estratégia de construção do vírus recombinante utilizada neste trabalho foi patenteada em 2005 (Bonaldo & Galler, 2005; nº 20050121605 de 31/10/2005) e consiste em inserir o cassete heterólogo, o DIII de DENV-3 flanqueado por regiões importantes, entre os

genes E/NS1 que é uma região natural de transição no genoma dos *Flavivírus* por delimitar duas porções funcionais do genoma: a primeira codificando os genes estruturais; a segunda os genes não estruturais. Isso permite que seqüências maiores sejam inseridas na região.

O cassete heterólogo do DIII de DENV-3 foi construído de modo a fundir no seu N-terminal 27 nt do N-terminal de NS1 que codificam o motivo DXGC (DQGC em FA) bastante conservado em *Flavivírus* e responsável pela clivagem pela peptidase sinal entre E/NS1 (Chambers *et al.*, 1990; Bonaldo *et al.*, 2007). Na porção C-terminal do DIII de DENV-3 foi fundido a HA truncada de DENV-4 onde estavam presentes os elementos H2, TM1 e TM2 e ausentes os elementos H1 e CS. A duplicação da região da HA, mesmo truncada, além de permitir a correta translocação da poliproteína viral no RER permite o seu correto processamento por meio de funções executadas por seus elementos.

O segundo elemento da haste H2 forma uma α -hélice contínua com a primeira região da âncora, TM1, dando maior estabilidade ao heterodímero prM/E (Allison *et al.*, 1999), além de fornecer informação para a localização e retenção da proteína E no RER (Op De Beeck *et al.*, 2004). No caso do vírus recombinante, esses elementos, por estarem no C-terminal do DIII, permitiriam, em teoria, maior estabilidade do inserto e localização do DIII no RER.

Já o segundo elemento da âncora TM2, funciona como uma seqüência sinal para NS1, além de também ser um sinal de retenção da proteína E no RER permitindo a correta translocação da poliproteína com o inserto heterólogo na membrana do RER (Allison *et al.*, 1999; Op De Beeck *et al.*, 2004). A região de âncora da HA tem um papel central na formação do envelope de *Flavivírus*, embora não tenha um papel na heterodimerização que ocorre entre prM/E para formação desse envelope (Op De Beeck *et al.*, 2003). Os elementos que foram retirados na versão da HA truncada têm a função de auxiliar a trimerização de E a baixo pH (H1) ou função desconhecida até o momento, embora sua seqüência seja conservada entre os *Flavivírus* (CS) (Allison *et al.*, 1999).

O primeiro vírus viável obtido por meio dessa estratégia expressava a proteína GFP fusionada a HA completa de FA entre E/NS1 do vírus vacinal FA 17D (Bonaldo *et al.*, 2007). Esse vírus foi estável até a 10ª passagem em cultura celular e a perda da inserção foi justificada, em parte, por pareamentos inespecíficos entre as HAs complementares não alélicas durante a replicação do vírus, uma vez que as duas HAs possuíam identidade de 100 %. A quimera FA17D/DEN4/Esa/6, descrita no mesmo trabalho, possui duas HAs completas e diferentes: a de DENV-4 como parte do próprio vírus vetor quimérico que possui prM/E de DENV-4 e a de FA fusionada ao C-terminal do inserto. Esse vírus foi estável até a 20ª passagem em cultura celular, embora sua cinética de replicação tenha sido lenta, inferior aos vírus controles (Bonaldo *et al.*, 2007).

Como a HA completa de DENV-4 e FA possuem identidade de 58 % em contrapartida com a identidade de 100 % encontrada entre as duas HAs de FA, especulou-se que quanto menor a identidade da HA, maior seria a estabilidade da inserção heteróloga. Essa teoria foi comprovada por um vírus construído no laboratório que expressa a proteína GFP entre E/NS1, flanqueada pelo N-terminal de NS1 e pela região da HA completa ou truncada (sem os elementos H1 e CS) de DENV-4 (Oliveira, 2008) obtendo, com a construção da HA truncada um vírus com estabilidade relativa até a 20^a passagem em cultura de células Vero e estabilidade completa até a 10^a passagem, além de taxa de replicação superior quando comparado à quimera FA17D/DEN4/Esa/6.

Logo, o presente trabalho consistiu em utilizar essa mesma metodologia para a regeneração de vírus recombinantes expressando insertos de patógenos humanos de interesse, no caso o DIII de DENV-3, a fim de construir uma possível vacina combinada contra esses dois *Flavivírus* que compartilham uma ampla área de transmissão. Embora o uso de vírus quimérico tenha a vantagem de que a imunidade prévia contra o vetor não é fator limitante, uma vez que a proteína E contém todos os epítomos de neutralização viral (Guirakhoo *et al.*, 2006), o uso do vírus vacinal de FA como vetor, e não apenas como quimera, aumenta o número de patógenos humanos que podem ser utilizados para construção de vacinas combinadas, incluindo aqueles que não pertencem ao gênero *Flavivírus*.

O vírus recombinante FA17D/Esa/DIII_{DENV-3} foi regenerado a partir de transfecção do seu cDNA molde em monocamada de células Vero, mostrando que essa metodologia de inserção gera vírus viáveis, mesmo quando o inserto heterólogo é proveniente de um patógeno humano e não apenas de uma proteína repórter.

O DIII de DENV-3 e a proteína E de FA foram detectados em ensaios de imunofluorescência indicando que os antígenos de ambos os patógenos estavam sendo expressos corretamente. Esse ensaio sugere que esses antígenos localizam-se na região perinuclear, muito provavelmente no RER das células hospedeiras. Entretanto, estudos mais elaborados de co-localização com traçadores de RER, além de imunoprecipitação com produtos de marcação metabólica são necessários para verificar a correta localização do DIII de DENV-3 associado a compartimentos celulares ou no meio extracelular.

Contudo, este resultado é concordante com o previamente obtido por nosso grupo, nos quais as construções que expressavam GFP entre E/NS1 fusionada a HA completa ou truncada de FA ou de DENV-4 (Bonaldino *et al.*, 2007; Mello, 2007; Oliveira, 2008) mostraram, em ensaios de imunofluorescência, que a GFP encontrava-se no RER das células infectadas, possivelmente devido ao ancoramento de sua região HA à membrana dessa organela. Além disso, marcação metabólica de células Vero infectadas com o vírus

expressando a GFP fusionada a HA completa de FA mostrou que essa proteína estava nos extratos celulares e não no sobrenadante das células infectadas (Bonaldo *et al.*, 2007).

O vírus recombinante mostrou-se menos replicativo do que os controles FA 17DD e FA 17D/G1.2/T3, mas essa diferença não pode ser diretamente correlacionada ao CPE observado em células infectadas nos mesmos tempos p.i.: o vírus parental e o recombinante tiveram CPE semelhantes e capacidade de replicação distintas. Experimentos medindo o nível de morte celular por apoptose ao longo da infecção desses vírus seriam interessantes para esclarecer se a queda abrupta na replicação do vírus recombinante ocorre devido à intensa morte celular.

Algumas hipóteses podem ser sugeridas para explicar essa diferença na cinética de replicação do vírus FA17D/D3. A primeira delas é que o DIII do inserto heterólogo acumulado ao longo do tempo no RER atrapalhe as interações entre as proteínas estruturais C, prM e E do vírus vetor durante a montagem da partícula viral. Isso porque existe uma coordenação espacial e temporal na montagem do nucleocapsídeo e seu envelopamento pelo heterodímero prM/E que é regulado por clivagens tanto no lúmen do RER como no lado do citoplasma (Lobigs & Lee, 2004).

Lorenz *et al.* (2002) observaram que a maturação e o envelamento correto de E só ocorre na presença de prM, com a formação do heterodímero prM/E no lúmen do RER. A associação entre prM e E é vital para formação de heterodímeros intracelulares, na proporção 1:1 dessas proteínas, a fim de garantir a correta formação do envelope viral e maturação dos vírions. Logo, a segunda hipótese é que o DIII de DENV-3 acumulado no lúmen do RER perturbe a interação entre prM/E, atrapalhando a correta formação do envelope viral e maturação do vírion o que levaria a formação de recombinantes menos viáveis e mais instáveis (Stiasny *et al.*, 1996; Lorenz *et al.*, 2002).

A terceira hipótese é que o DIII de DENV-3 estaria interagindo com a própria proteína E de FA presente no vírus vetor, mais precisamente com o DIII dessa proteína já que o DIII de DENV-3 16562 e o presente no vírus FA 17DD possuem conservação entre seus resíduos de aminoácidos de aproximadamente 44 %. A interação entre esses dois domínios dentro do RER poderia atrapalhar a heterodimerização de E com prM perturbando a montagem da partícula viral.

A última hipótese refere-se a uma possível toxicidade do DIII de DENV-3 presente no RER. Essa característica apareceu pela primeira vez no momento da subclonagem do cassete de interesse no plasmídeo pT3, quando a expressão do DIII em bactérias só foi possível com a diminuição pela metade da concentração de antibiótico utilizada. Uma elevada toxicidade do

DIII aliado ao seu acúmulo no RER levaria a um estresse no RER e a célula morreria por apoptose.

Estudos mostraram que o RER responde ao estresse causado pelo acúmulo de proteínas com enovelamento incorreto em seu lúmen ativando vias transdutoras de sinais chamadas de *unfolded protein response* ou resposta à proteína com enovelamento incorreto que tenta aliviar o estresse causado por esse acúmulo de proteínas no RER e, em último caso, aciona vias pró-apoptóticas (Rutkowski & Kaufman, 2004; Ron & Walter, 2007). A grande morte de células por apoptose seria uma explicação para a queda abrupta na replicação do vírus em tempos tardios da infecção.

A estabilidade genética das construções virais é um parâmetro importante para determinar a influência da inserção na replicação e no *fitness* do vírus, além de determinar se esse vírus pode ser produzido em larga escala em Boas Práticas de Fabricação (BPF). Para ser produzido em BPF, o vírus atenuado precisa ser estável pelo menos até a 10^a passagem em monocamada de células (Galler R, comunicação pessoal). A perda da inserção em algumas populações do vírus recombinante poderia levar a imunização menos eficiente contra o antígeno heterólogo presente no vírus vetor.

O estudo da estabilidade genética do vírus recombinante foi realizado por meio da infecção com MOI 0,02 de células Vero em duas passagens independentes. Essa MOI, embora considerada baixa, é utilizada por permitir um maior número de replicação dos vírus, de modo que eventos de recombinação, deleção, mutação ou inserção, que poderiam levar à perda da inserção, possam ocorrer. Além disso, uma MOI baixa é mais próxima da utilizada para a produção de lotes vacinais que geralmente é de 0,002 (Freire M, comunicação pessoal).

O vírus recombinante estava intacto na 2^a passagem em cultura de células, mas mostrou perda do inserto em algumas populações verificada na 5^a passagem, com a perda total da inserção verificada na 10^a passagem. Esse tipo de perfil em que há uma perda gradual do inserto do vírus é comum e explica-se pelo fato de que os vírus que perdem o inserto durante a replicação têm uma vantagem replicativa sobre aqueles com inserto. Assim, ao longo de vários eventos replicativos, eles passam a predominar poucas passagens após terem aparecido.

A estabilidade de FA 17D/D3 foi próxima à encontrada no vírus expressando a GFP fusionada à HA truncada de FA entre E/NS1 (Mello, 2007), mas teve um resultado bastante inferior se comparado ao vírus que expressava GFP fusionada à HA truncada de DENV-4, cuja estabilidade foi relativa até a 20^a passagem (Oliveira, 2008). Logo, se a estratégia escolhida de fusionar o inserto de interesse à HA truncada de DENV-4 foi bem sucedida para uma proteína repórter, por que não seria para o DIII de DENV-3? Algumas especulações podem ser feitas quanto aos possíveis motivos.

A primeira hipótese, descrita anteriormente para tentar explicar a queda na replicação do vírus em tempos tardios p.i., é que o DIII de DENV-3 pode estar pareando com o DIII de FA uma vez que eles possuem alta homologia entre si, o que diminuiria a estabilidade do vírus. Estudos em nosso laboratório mostram que pode haver perda da inserção por pareamento entre estruturas complementares não alélicas durante a replicação do vírus (Bonaldo *et al.*, 2007). Além disso, o DIII do inserto poderia parear-se com regiões já descritas de contato com a proteína E, facilitando a formação de fragmentos inespecíficos que levariam à perda da inserção heteróloga (Bonaldo *et al.*, 2006).

A segunda hipótese refere-se mais uma vez à possível toxicidade do DIII. Essa toxicidade aumentaria o *fitness* e a capacidade de seleção das populações virais que por ventura viessem a perder o inserto em eventos de replicação. Assim, ao invés de uma perda mais demorada do inserto por parte das populações virais, logo que aparece o primeiro vírus sem esse inserto, rapidamente ele é selecionado e sua progênie aparece como final do processo seletivo após poucas passagens em cultura celular.

O desenvolvimento do vírus FA vacinal como vetor de expressão de antígenos heterólogos justifica-se pelas boas propriedades vacinais do vírus FA 17D (Poland *et al.* 1981; Monath & Nasidi, 1993; Monath, 2001). Entretanto, esta abordagem requer uma minuciosa análise das estratégias utilizadas na inserção desse antígeno de modo que não haja comprometimento da replicação e da estrutura do vírus recombinante, aumentando assim a estabilidade genética da inserção no vírus vetor.

Outra característica importante é a geração de vírus não patogênico que mantenha o caráter atenuado do 17D e, ao mesmo tempo, expresse o antígeno heterólogo e seus próprios antígenos levando a uma resposta imune apropriada por parte do hospedeiro. É importante ainda que esse vírus recombinante seja capaz de replicar-se em cultura de células certificadas para a produção de vacinas.

Bredenbeek *et al.* (2006) também elegeram a região intergênica E/NS1 como alvo da clonagem de antígenos heterólogos, mais precisamente a glicoproteína (GPC) de vírus de Lassa, um arenavírus que compartilha sua área de transmissão com o vírus FA na África. Entretanto, a estratégia adotada diverge da apresentada neste trabalho, pois o inserto de interesse não tem nenhuma seqüência flanqueando o seu N-terminal e está fusionado no seu C-terminal apenas à região TM2 de FA, de modo a garantir a correta translocação da proteína NS1 no RER.

O trabalho reporta que foram obtidos vírus viáveis, expressando a GPC de Lassa e estes vírus foram capazes de elicitar resposta imune específica contra o vetor e contra a GPC de Lassa, além de proteger 80% das cobaias após desafio (Bredenbeek *et al.*, 2006). No

entanto, nenhum dado quanto à capacidade do vírus de replicação em cultura de células (cinética de replicação) ou sobre a sua estabilidade genética foram apresentados.

A estratégia proposta neste trabalho é inovadora e promissora quando comparada com dados presentes na literatura que utilizam o vírus vacinal de FA como vetor de expressão de antígenos heterólogos (Bonaldo *et al.*, 2000; 2002; 2005; McAllister *et al.*, 2000; Tao *et al.*, 2005; Barba-Spaeth *et al.*, 2005; Bredenbeek *et al.*, 2006). Neste trabalho, foi construído um vírus recombinante expressando o DIII de DENV-3 na região intergênica E/NS1 fusionado no seu N-terminal aos nove primeiros aa de NS1 de FA e no seu C-terminal à HA truncada de DENV-4. O vírus foi estável apenas até a 5ª passagem em cultura de células, mas este fato não limita seu uso como modelo para verificar a dosagem de anticorpos neutralizantes em cobaias por meio de ensaios de PRNT com soro de animais imunizados. Dosagens de anticorpos contra o vírus vetor e o inserto heterólogo também podem ser feitas por ELISA.

Antígenos heterólogos de DENV ou de outros patógenos podem ser clonados no vírus vacinal de FA utilizando essa mesma metodologia ou variações dela. A inserção de seqüências sinais no cassete heterólogo com o objetivo de secretar a proteína de interesse está sendo realizada (Bonaldo, M.C. comunicação pessoal), o que possibilitaria uma melhor apresentação desse antígeno ao sistema imune do hospedeiro.

7. CONCLUSÕES

- A análise da seqüência de aminoácidos e da estrutura tridimensional do DIII de DENV-3 16562 e sua comparação com outros genótipos do mesmo sorotipo revelou e localizou tridimensionalmente diferenças que estavam relacionadas a características importantes do vírus. A variabilidade encontrada entre os genótipos de DENV-3 não impossibilita a criação de uma vacina contra esse sorotipo a partir de um único vírus.
- A construção do vírus recombinante expressando o DIII de DENV-3 16562 na região intergênica E/NS1 do vírus vacinal de FA originou vírus viáveis e que expressam o inserto heterólogo nas células infectadas em uma região perinuclear que corresponde, muito provavelmente, ao RER das células hospedeiras.
- O vírus recombinante apresentou título de $6 \log_{10}$ PFU/mL e teve uma cinética de replicação diferente do vírus vacinal, porém próxima do vírus parental. Embora os títulos do vírus recombinante e dos controles tenham divergido bastante, em todos os casos.
- O vírus construído era absolutamente estável na sua 2ª passagem em células Vero, porém, já na 5ª passagem apresentou populações virais que não possuíam mais o inserto. Na 10ª passagem celular, não havia mais população viral contendo o inserto heterólogo.

8. PERSPECTIVAS

- Estudos de co-localização do DIII DENV-3 com o RER e de imunoprecipitação com produtos de marcação metabólica de células infectadas com o vírus recombinante devem ser realizados para verificar a correta localização de DIII associado a compartimentos celulares ou no meio extracelular.
- Estudos de quantificação de morte celular por apoptose ao longo da infecção do vírus recombinante em células Vero também devem ser realizados para tentar explicar o declínio na replicação desse vírus nos tempos tardios da infecção.
- Ensaio de imunogenicidade em camundongos a fim de medir a indução de anticorpos neutralizantes contra o DIII de DENV-3 e contra o vetor de FA estão sendo realizados.
- A inserção de seqüências sinais no cassete heterólogo com o objetivo de secretar a proteína de interesse está sendo realizada, o que possibilitaria uma melhor apresentação do antígeno ao sistema imune do hospedeiro.
- Um aperfeiçoamento deste trabalho no que diz respeito à localização do cassete de expressão nas células infectadas e à estabilidade do vírus, pode levar a um futuro candidato a uma vacina combinada contra dengue e febre amarela.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allison SL, Schalich J, Stiasny K, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J Virol.* 1995a; 69:695–700.
- Allison SL, Stadler K, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. Synthesis and secretion of recombinant tick-borne encephalitis virus protein E in soluble and particulate form. *J Virol.* 1995b; 69(9):5816-5820.
- 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; 73:5605-5612.
- Allison SL, Schalich J, Stiasny K, Mandl CW, Heinz FX. Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. *J Virol.* 2001; 75(9):4268-4275.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Anang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped Blast and PSI-BLAST: a new generation of protein database programs. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(17):3389-3402.
- ATCC. Cell Catalog. Associated Press, 1994
- Barba-Spaeth G, Longman RS, Albert ML, Rice CM. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. *J Exp Med.* 2005; 202(9):1179-1184.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, *et al.* The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28:235-242.
- Blaney JE Jr, Durbin AP, Murphy BR, Whitehead SS. Development of a live attenuated dengue virus vaccine using reverse genetics. *Viral Immunol.* 2006; 19(1):10–32.
- Bonaldo MC, 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 (1):215-223.
- Bonaldo MC, Garratt RC, Caufour PS, Freire MS, Rodrigues MM, Nussenzweig RS, Galler R. Surface expression of an immunodominant malaria protein B cell epitope by yellow fever virus. *J Mol Biol.* 2002; 315(4):873-885

- Bonaldo MC, Galler R. Método para a produção de vírus como vetor de seqüências de nucleotídeos codificantes do todo ou parte de proteínas heterólogas, constructos de DNA, vírus recombinantes resultantes e composições vacinais contendo tais vírus recombinantes para imunizar contra *Flavivírus* e/ou outros patógenos. 2005; depósito 20050121605 realizado em 31/10/2005.
- Bonaldo MC, Garratt RC, Marchevsky RS, Coutinho ES, Jabor AV, Almeida LF *et al.* Attenuation of recombinant yellow fever 17D viruses expressing foreign protein epitopes at the surface. *J Virol.* 2005; 79(13):8602-8613.
- Bonaldo MC, Garratt RC, Freire MF, 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 and Biophys.* 2006; 44:313-324.
- Bonaldo MC, Mello SM, Trindade GF, Rangel A, Duarte AS, Oliveira, PJ *et al.* Constructions and characterization of recombinant flaviviruses bearing insertions between E and NS1 genes. *Virology.* 2007; 4:115-130.
- Bredenbeek PJ, Molenkamp R, Spaan WJM, Deubelb V, Marianneau P, Salvato MS *et al.* A recombinant Yellow Fever 17D vaccine expressing Lassa virus glycoproteins. *Virology.* 2006; 345(2):299-304.
- Brinton MA. Replication of flaviviruses. In: Schlesinger R, Schlesinger MJ, editores. *The Togaviridae and Flaviviridae.* Plenum: Nova Iorque; 1986. p. 327-365.
- Burke DS, Monath TP. Flaviviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editores. *Fields Virology.* Lippincott-Raven: Filadélfia; 4ª ed; 2001. p. 1043-1124.
- Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, Brandt WE. Antigenic relationships among flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol.* 1989; 70:37-43.
- Cardosa MJ. Dengue vaccine design: issues and challenges. *Br Med Bull.* 1998; 54(2):395-405.
- Caufour PS, Motta MC, Yamamura AM, Vazquez S, Ferreira, II, Jabor AV *et al.* Construction, characterization and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 viruses. *Virus Res.* 2001; 79:1-14.

- CDC, CENTER OF DISEASE CONTROL. Dengue 3 in Central America. Dengue surveillance. Summary. Dengue Branch San Juan, Puerto Rico. Division of Vector-borne Infectious Diseases, 1995. 70p.
- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu Rev Microbiol.* 1990; 44:649-688.
- Chambers TJ, Tsai TF, Pervikov Y, Monath TP. Vaccine development against dengue and Japanese encephalitis. Report of a World Health Organization Meeting. *Vaccine.* 1997; 15(14):1494-1502.
- Chen Y, Maguire T, Marks RM. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *J Virol.* 1996; 70:8765-8772.
- Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, Marks RM. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med.* 1997; 3:866-871.
- Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques.* 1993; 15:532-537.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162:156-159.
- Chu JJ, Ng ML. Interaction of West Nile Virus with $\alpha\beta 3$ integrin mediates virus entry into cells. *J Biol Chem.* 2004; 279 (52): 54533–54541.
- Chu JJH, Rajamanonmani R, Li J, Bhuvanankantham R, Lescar J, Ng ML. Inhibition of West Nile virus entry by using a recombinant domain III from the envelope glycoprotein *J Gen Virol.* 2005; 86: 405–412.
- CIVES, CENTRO DE INFORMAÇÃO EM SAÚDE PARA VIAJANTES, UFRJ. [citado em 07/05/2008] Disponível em: <http://www.cives.ufrj.br/informacao/dengue/den-Rio2008.html>.
- Co MD, Terajima M, Cruz J, Ennis FA, Rothman AL. Human cytotoxic T lymphocyte responses to live attenuated 17D yellow fever vaccine: identification of HLA-B35-restricted CTL epitopes on nonstructural proteins NS1, NS2b, NS3, and the structural protein E. *Virology.* 2002; 293 (1):151-163.

- Costa SM, Azevedo AS, Paes MV, Sarges FS, Freire MS, Alves AM. DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: the influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. *Virology*. 2007; 358(2):413-423.
- Crill WD, Roehrig JT. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J Virol*. 2001; 75(16):7769-7773.
- DeLano WL. The PyMOL Molecular Graphics System. 2002. [citado em 10/04/2008] Disponível em: <http://www.pymol.org>.
- De Madrid AT, Porterfield JS. A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. *Bull World Health Organ*. 1969; 40(1):113-121.
- Edelman R. Dengue vaccines approach the finish line. *Clin Infect Dis*. 2007; 45 (1):56-60.
- Edelman R, Wasserman SS, Bodison SA, Putnak RJ, Eckels KH, Tang D *et al*. Phase I trial of 16 formulations of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine. *Am J Trop Med Hyg*. 2003; 69(6):48-60
- Falgout B, Miller RH, Lai C. Deletion analysis of Dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: identification of a domain required for NS2B-NS3 proteinase activity. *J Virol*. 1993; 67:2034-2042.
- Fan W, Mason PW. Membrane association and secretion of the Japanese encephalitis virus NS1 protein from cells expressing NS1 cDNA. *Virology* 1990; 177:470-476.
- Figueiredo LTM. History, present and future of dengue fever in Brazil. In: Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS, editores. *An Overview of arbovirology on Brazil and neighboring countries*. Instituto Evandro Chagas: Belém, 1998. p. 154-163.
- Figueiredo LTM. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect*. 2000; 2(13):1643-1649.
- Franco O. A erradicação do *Aedes aegypti* do Brasil. *Rev Bras Malariol Doenças Trop*. 1961; 13:43-48.
- Franco O. História da febre amarela no Brasil. Ministério da Saúde: Rio de Janeiro, 1976.

- Freire MS. Estudo sobre a propagação de vírus da febre amarela vacinal 17D e produção de vacina em culturas primárias de fibroblastos [tese]. Rio de Janeiro: Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária, IOC/FIOCRUZ; 2004.
- Galler R, Post PR, Santos CND, Ferreira I. Genetic variability among yellow fever virus 17D substrains. *Vaccine*. 1998. 16(9/10):1024-1028.
- Galler R, Marchevsky RS, Caride E, Almeida LF, Yamamura AM, Jabor AV *et al*. Attenuation and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 virus for rhesus monkeys. *Braz J Med Biol Res*. 2005; 38(12):1835-1846.
- Germi R, Crance JM, Garin D, Guimet J, Lortat-Jacob H, Ruigrok RW *et al*. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology*. 2002; 292(1):162-168.
- Gromowski GD, Barrett ADT. Characterization of an antigenic site that contains a dominant type-specific neutralization determinant on the envelope protein domain III (ED3) of dengue 2 virus. *Virology*. 2007; 366:349-360.
- Gubler DJ. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990s: top down or bottom up. *Am J Trop Med Hyg*. 1989; 40:571-578.
- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11(3):480-496.
- Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as public health social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol*. 2002; 10:100-103.
- Gubler DJ, Clark GG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis*. 1995; 1(2):55-57.
- Gubler DJ, Reed D, Rosen L, Hitchcock JC. Epidemiological, clinical and virologic observations on dengue in The Kingdom of Tonga. *Am J Trop Med Hyg*. 1978; 37:581-589.
- Gubler DJ, Trent DW. Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as public health problem in the Americas. *Infect Agents Dis*. 1994; 2:383-393.
- Guirakhoo F, Heinz FX, Mandl CW, Holzmann H, Kunz C. Fusion activity of flaviviruses: comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne encephalitis virions. *J Gen Virol*. 1991; 72:1323-1329.

- Guirakhoo F, Arroyo J, Pugachev KV, Miller C, Zhang ZX, Weltzin R *et al.* Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. *J Virol.* 2001; 75(16):7290-7304.
- Guirakhoo F, Kitchener S, Morrison D, Forrat R, McCarthy K, Nichols R *et al.* Live attenuated chimeric yellow fever dengue type 2 (ChimeriVax-DEN2) vaccine: phase I clinical trial for safety and immunogenicity: effect of yellow fever pre-immunity in induction of cross neutralizing antibody responses to all 4 dengue serotypes. *Hum Vaccin.* 2006; 2(2):60–67.
- Guzmán MG, Kourí G, Martínez E, Bravo J, Riverón R, Soler M *et al.* Clinical and serologic study of Cuban children with dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Bull Pan Am Health Organ.* 1987; 21:270-279.
- Halstead SB, Deen J. The future of dengue vaccines. *Lancet.* 2002; 360:1243-1245.
- Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med.* 1970; 42:311-328.
- Halstead SB, Shotwell H, Casals J. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. I. Clinical, laboratory responses to primary infection. *J Infect Dis.* 1973; 128(1):7–14.
- Heinz FX. Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Adv Virus Res.* 1986; 31:103-168.
- Heinz FX, Mandl CW, Holzmann H, Kunz C, Harris BA, Rey F, Harrison SC. The flavivirus envelope protein E: isolation of a soluble form from tick-borne encephalitis virus and its crystallization. *J Virol.* 1991; 65(10):5579-5583.
- Hilgard P, Stockert R. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology* 2000; 32 (5):1069-1077.
- Hiramatsu K, Tadano M, Men R, Lai CJ. Mutation analysis of a neutralization epitope on the dengue type 2 virus (DEN2) envelope protein: monoclonal antibody resistant DEN2/DEN4 chimeras exhibit reduced mouse neurovirulence. *Virology.* 1996; 224:437-445.
- Holden KL, Harris E. Enhancement of dengue virus translation: role of the 3' untranslated region and the terminal 3' stem-loop domain. *Virology.* 2004; 329(1):119-133.

- Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol.* 2003; 3:19-28.
- Hombach J. Vaccines against dengue: a review of current candidate vaccines at advanced development stages. *Pan Am J Public Health.* 2007; 21(4):254-260.
- Huang CY, Butrapet S, Tsuchiya KR, Bhamarapavati N, Gubler DJ, Kinney RM. Dengue 2 PDK-53 virus as a chimeric carrier for tetravalent dengue vaccine development. *J Virol.* 2003; 77(21):11436-11447.
- Hung J, Hsieh M, Young M, Kao C, King C, Chang W. An External Loop Region of Domain III of Dengue Virus Type 2 Envelope Protein Is Involved in Serotype-Specific Binding to Mosquito but Not Mammalian Cells. *J Virol.* 2004; 78:378-388.
- Jabor, AV. Manipulação genética do clone infeccioso do vírus da febre amarela da cepa vacinal 17D [dissertação]. Rio de Janeiro: Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária, IOC/Fiocruz; 2001.
- Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Gibson DG, Higgins, T. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci.* 1998; 23: 403-405.
- Kliks SC, Nimmannitya S, Nisalak A, Burke DS. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg.* 1988; 38:411-419.
- Konishi E, Fujii A. Dengue type 2 virus subviral extracellular particles produced by a stably transfected mammalian cell line and their evaluation for a subunit vaccine. *Vaccine.* 2002; 20(7-8):1058-1067.
- Koonin EV. Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. *J Gen Virol.* 1993;74 (4):733-740.
- Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E *et al.* Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell.* 2002; 108(5):717-725.
- Kurane I, Ennis FA. Immunopathogenesis of dengue virus infections. In: Gubler DJ, Kuno G, editores. *Dengue and dengue hemorrhagic fever.* CAB International: Londres; 1997. p. 273-290.

- Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol.* 1994; 75:65-75
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst.* 1993; 26:283-291.
- Lee JW, Chu JJ, Ng ML. Quantifying the specific binding between West Nile virus envelope domain III protein and the cellular receptor alphaVbeta3 integrin. *J Biol Chem.* 2006; 281(3):1352-1360.
- Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, VillaLobos de Chacon I, Ramos C, Rico-Hesse R. Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. *J Virol.* 1999; 73:4738-4747.
- Leung JY, Pijlman GP, Kondratieva N, Hyde J, Mackenzie JM, Khromykh AA. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *J Virol.* 2008; 82(10):4731-4741.
- Li H, Clum S, You S, Ebner KE, Padmanabhan R. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J Virol.* 1999; 73(4):3108-3116.
- Li L, Barrett ADT, Beasley DWC. Differential expression of domain III neutralizing epitopes on the envelope protein of West Nile virus strains. *Virology.* 2005; 335:99-105.
- Li L, Lok S, Yu I, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J, Rossmann, MG. The flavivirus precursor Membrane-Envelope Protein complex: structure and maturation. *Science* 2008; 319:1830-1834.
- Lin B, Parrish CR, Murray JM, Wright PJ. Localization of a neutralizing epitope on the envelope protein of dengue virus type 2. *Virology.* 1994; 202(2):885-890.
- Lindenbach BD, Rice CM. *Flaviviridae: The Viruses and their Replication.* In: Knipe DM, Howley PM, editores. *Fields Virology.* Lippincott-Raven: Filadélfia; 4^a ed; 2001. p. 991-1041.
- Lisova O, Hardy F, Petit V, Bedouelle H. Mapping to completeness and transplantation of a group-specific, discontinuous, neutralizing epitope in the envelope protein of dengue virus. *J Gen Virol.* 2007; 88:2387-2397.

- Liu WJ, Chen HB, Wang XJ, Huang H, Khromykh A. Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. *J Virol.* 2004; 78(22):12225-12235.
- Lobigs M, Lee E. Inefficient signalase cleavage promotes efficient nucleocapsid incorporation into budding flavivirus membranes. *J Virol.* 2004; 78:178-186.
- 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.
- Lorenz IC, Kartenbeck J, Mezzacasa A, Allison SL, Heinz FX, Helenius A. Intracellular assembly and secretion of recombinant subviral particles from Tick-Borne Encephalitis Virus. *J Virol.* 2003; 77(7):4370-4382.
- 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.
- Mackenzie JM, Khromykh AA, Jones MK, Westaway EG. Subcellular localization and some biochemical properties of the Flavivirus Kunjin nonstructural protein NS2A and NS4A. *Virology.* 1998; 245:203-215.
- Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med.* 2004; 10(12):98-109.
- Mateu GP, Marchevsky RS, Liprandi F, Bonaldo MC, Coutinho ES, Dieudonné M *et al.* Construction and biological properties of yellow fever 17D/dengue type 1 recombinant virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007; 101(3):289-298.
- McAllister A, Arbetman AE, Mandl S, Peña-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):9197-9205.
- Megret F, Hugnot JP, Falconar A, Gentry MK, Morens DM, Murray JM *et al.* Use of recombinant fusion proteins and monoclonal antibodies to define linear and discontinuous antigenic sites on the dengue virus envelope glycoprotein. *Virology.* 1992; 187:480-491.

- Mello SM. Clonagem e expressão da proteína EGFP na região intergênica E/NS1 da cepa vacinal 17D do vírus da Febre Amarela [dissertação]. Rio de Janeiro: Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, IOC/Fiocruz; 2007.
- Mercado-Curiel RF, Esquinca-Avilés HA, Tovar R, Díaz-Badillo A, Camacho-Nuez M, Muñoz ML. The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *Ae. albopictus* cells. *BMC Microbiol.* 2006; 6:85-94.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(12):6986-6991.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature.* 2004; 427(6972):313-319.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. *J Virol.* 2005; 79:1223-1231.
- Monath TP. Yellow fever : an update. *Lancet Infect Dis.* 2001; 1:11-20.
- Monath TP, Nasidi A. Should yellow fever be included in the expanded program of immunization in Africa? A cost-effectiveness analysis for Nigeria. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; 48:274-290.
- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the *Flaviviruses* life cycle. *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3:13-22.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986; 51(1):263-273.
- Munoz-Jordan J L, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia- Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100:14333-14338.
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, Lampe E, Souza RW, Zagne SMO, Schatzmayr HG. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1991: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. *Epid Infec.* 1993; 111:163-170.
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, Filippis AMB, Pereira MAS, Schatzmayr HG. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96:925-926

- Nogueira RM, de Araújo JM, Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica*. 2007; 22(5):358-363.
- Nybakken GE, Oliphant T, Johnson S, Burke S, Diamond M, Fremont DH. Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody. *Nature*. 2005; 437:764-769.
- Oliveira MF. Construção e caracterização de vírus da Febre Amarela 17D expressando a proteína EGFP na região intergênica E/NS1 [dissertação]. Rio de Janeiro: Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária, IOC/Fiocruz; 2008.
- OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva. 1997.
- OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Strengthening implementation of the global strategy for dengue fever/dengue haemorrhagic fever prevention and control. Report of the Informal Consultation, 18-20 de Outubro 1999. Geneva, 2000a.
- OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Development of dengue vaccine. *Dengue Bull*. 2000b; 24 [citado em 10/04/2008]. Disponível em: www.searo.who.int/en/section332/section5222515.htm
- OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Report of the meeting of the WHO Task Force on Clinical Trials of Dengue Vaccine. Geneva. Department of Immunization, Vaccines and Biologicals.: WHO; 2006. (WHO/ IVB/06.10) [citado em 10/04/2008]. Disponível em: <http://www.who.int/vaccines-documents/>
- Op De Beeck A, Molenkamp R, Caron M, Younes AB, Bredenbeek P, Dubuisson J. Role of the transmembrane domains of prM and E proteins in the formation of Yellow Fever Virus Envelope. *J Virol*. 2003; 77:813-820.
- Op De Beeck A, Rouillé Y, Caron M, Duvet S, Dubuisson J. The transmembrane domains of the prM and E proteins of Yellow Fever Virus are endoplasmic reticular localization signals. *J Virol*. 2004; 78:12591-12602.
- Osani CH, Travassos da Rosa APA, Tang AT. Surto de dengue em Boa Vista em Roraima. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1993; 25:53-54.
- Patkar CG, Kuhn RJ. Yellow Fever virus NS3 plays an essential role in virus assembly independent of its known enzymatic functions. *J Virol*. 2008; 82(7):3342-3352.

- Pedro A. O dengue em Nictheroy, Brazil. *Médico*. 1923; 37:173-177.
- 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.
- Pinheiro FP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue hemorrhagic fever and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q*. 1997; 50:161-169.
- Poland JD, Calisher CH, Monath TP, Downs WG, Murphy K. Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bull World Health Organ*. 1981; 59:895-900.
- Putnak RJ, Collier BA, Voss G, Vaughn DW, Clements D, Peters I *et al*. An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. *Vaccine*. 2005; 23(35):4442-4452.
- Ramachandran GN, Ramakrishnan C, Sasisekharan V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Bio*. 1963; 7:95-99.
- Raviprakash K, Ewing D, Simmons M, Porter KR, Jones TR, Hayes CG *et al*. Needle-free Biojector injection of a dengue virus type 1 DNA vaccine with human immunostimulatory sequences and the GM-CSF gene increases immunogenicity and protection from virus challenge in Aotus monkeys. *Virology*. 2003; 315(2):345-352.
- Rego JP. Esboço histórico das epidemias que têm grassado na cidade do Rio de Janeiro. 1872.
- Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison, SC. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*. 1995; 375:291-298.
- Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for Flavivirus gene expression and evolution. *Science*. 1985; 229:726-733.
- Rice CM, Grakoui A, Galler R, Chambers TJ. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. *New Biol* 1989; 1:285-296.
- Roehrig JT. Antigenic structure of flavivirus proteins. *Adv Virus Res*. 2003; 59:141-175.

- Roehrig JT, Hunt AR, Johnson AJ, Hawkes RA. Synthetic peptides derived from the deduced amino acid sequence of the E-glycoprotein of Murray Valley encephalitis virus elicit antiviral antibody. *Virology*. 1989; 171(1):49-60.
- Roehrig JT, Volpe KE, Squires J, Hunt AR, Davis BS, Chang GJ. Contribution of disulfide bridging to epitope expression of the dengue type 2 virus envelope glycoprotein. *J Virol*. 2004; 78:2648-2652.
- Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews*. 2007; 8:519-529.
- Rosen L. Sur le mechanism de la transmission verticale du virus de la dengue chez le moustiques. *CR Acad Sci Paris*. 1987; 304:347-350.
- Rosen L, Gubler DJ. The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg*. 1974; 23:1153-1160.
- Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest*. 2004; 113(7):946-951.
- Russel PK, Nisalaki A. Dengue virus identification by the plaque reduction neutralization test. *J Immunol*. 1967; 99:291-296.
- Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to ER: coping with stress. *Trends in Cell Biol*. 2004; 14(1):20-28.
- Sabin AB. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg*. 1952; 1:30-50.
- Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casadémont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, Kajaste-Rudnitski A *et al*. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet*. 2005; 37:507-513.
- Sanchez IJ, Ruiz BH. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. *J Gen Virol*. 1996; 77:2541-2545.
- Sanchez V, Gimenez S, Tomlinson B, Chan PK, Thomas GN, Forrat R *et al*. Innate and adaptive cellular immunity in flavivirus-naive human recipients of a live-attenuated dengue serotype 3 vaccine produced in Vero cells (VDV3). *Vaccine*. 2006; 24(23):4914-4926.

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1977; 74(12): 5463–5467.
- Sali A, Blundell TL. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*. 1993; 234:779-815.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: EUA, 1989.
- Schatzmayr HG, Nogueira RMN, Travassos da Rosa APA. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro -1986. *Mem Ins Oswaldo Cruz*. 1986; 81:245-246.
- Schlesinger JJ, Brandiss MW, Walsh EE. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J Gen Virol*. 1987; 68:853-857.
- Serafin IL, Aaskov JG. Identification of epitopes on the envelope (E) protein of dengue 2 and dengue 3 viruses using monoclonal antibodies. *Arch Virol*. 2001; 146:2469-2479.
- Siler JF, Hall MW, Kitchens AP. Dengue: its history, epidemiology, mechanisms of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. *Philippine J Sci*. 1926; 29:1-304.
- Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol*. 1997; 71:8475–8481.
- Stephenson JR. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Public Health Reviews. Bull World Health Organ*. 2005; 83(4):308-314.
- Stiasny K, Allison SL, Marchler-Bauer A, Kunz C, Heinz FX. Structural requirements for low-pH-induced rearrangements in the envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus. *J Virol*. 1996; 70(11):8142-8147.
- Stiasny K, Heinz FX. Flavivirus membrane fusion. *J Gen Virol*. 2006; 87(10):2755-2766.
- Stokes A, Bauer JH, Hudson JH. Transmission of yellow fever to Macaus rhesus, preliminary note. *JAMA*. 1928; 90: 253-254.

- Sukupolvi-Petty S, Austin SK, Purtha WE, Oliphant T, Nybakken GE, Schlesinger JJ, Roehrig JT, Gromowski GD, Barrett AD, Fremont DH, Diamond MS. Type- and subcomplex-specific neutralizing antibodies against domain III of dengue virus type 2 envelope protein recognize adjacent epitopes. *J Virol.* 2007; 81(23):12816-12826.
- Sun W, Edelman R, Kanesa-Thanan N, Eckels KH, Putnak JR, King AD *et al.* Vaccination of human volunteers with monovalent and tetravalent live-attenuated dengue vaccine candidates. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 69(6):24-31.
- Tan BH, Fu J, Sugrue RJ, Yap EH, Chan YC, Tan YH. Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. *Virology.* 1996; 216(2):317-325.
- Tao D, Barba-Spaeth G, Rai U, Nussenzweig V, Rice CM, Nussenzweig RS. Yellow fever 17D as a vaccine vector for microbial CTL epitopes: protection in a rodent malaria model. *J Exp Med.* 2005; 201(2):201-209.
- Theiler M, Smith HH. The use of the yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. *J Exp Med.* 1937; 65:787-800.
- Twiddy SS, Holmes EC, Rambaut A. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. *Mol Biol Evol.* 2003; 20:122-129.
- 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(9):2605-2614.
- Vasconcelos PFC, Menezes DB, Melo LP, Pessoa ETP, Rodrigues SG, Travassos da Rosa ES *et al.* A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1995; 37:253-255.
- Vaughn DW, Green S, Kalayanaraj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S *et al.* Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis.* 2000; 181(1):2-9.
- Volk DE, Lee Y, Li X, Thiviyanathan V, Gromowski GD, Li L *et al.* Solution structure of the envelope protein domain III of dengue-4 virus. *Virology.* 2007; 364:147-154.
- Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich SY, Horzinek MC, Igarashi A, Kääriäinen L *et al.* *Flaviviridae.* *Intervirology.* 1985; 24:183-192.

- Whitehead SS, Falgout B, Hanley KA, Blaney Jr JE Jr, Markoff L, Murphy BR. A live, attenuated dengue virus type 1 vaccine candidate with a 30-nucleotide deletion in the 3' untranslated region is highly attenuated and immunogenic in monkeys. *J Virol.* 2003; 77(2):1653-1657.
- Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev.* 2007; 5:518-528.
- Yu I, Zhang W, Holdaway HA, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Kuhn RJ *et al.* Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* 2008; 319:1834-1837.
- Zhang Y, Zhang W, Ogata S, Clements D, Strauss JH, Baker TS *et al.* Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure.* 2004; 12(9):1607-1618.
- 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(11):907-912.
- Zulueta A, Martín J, Hermida L, Alvarez M, Valdés I, Prado I *et al.* Amino acid changes in the recombinant Dengue 3 Envelope domain III determine its antigenicity and immunogenicity in mice. *Virus Res.* 2006; 121(1):65-73.

10. ANEXOS

10.1 Soluções e Reagentes – ordem alfabética

Acetato de amônio 7,5 M: dissolver 28,87 g de acetato de amônio em água bidestilada q.s.p. para 50 mL e estocar a -20° C.

Agarose para análise em eletroforese: misturar 0,8 g (0,8 %) ou 1,0 g (1 %) de agarose (Promega) a 100 mL de tampão TAE 1 X. Aquecer em aparelho de microondas até toda a agarose dissolver.

Bicarbonato de sódio 4,4% gaseificado (NaHCO₃): misturar 44 g de NaHCO₃ com 1 mL de vermelho de fenol 1 % e água bidestilada q.s.p. 1000 mL. Adicionar gelo seco com agitação até a solução atingir pH de 7,0-7,2. Fazer alíquotas de 20 mL, esterilizar por autoclavação a 121° C por 15 min e estocar a 4° C.

Carboximetilcelulose (CMC)

Solução 3 %: homogeneizar 3 g de CMC em água bidestilada q.s.p. para 100 mL batendo a mistura no liquidificador. Autoclavar por 20 min a 121° C e armazenar à temperatura ambiente.

CMC 3 % com meio 199/Earle completo 0,22 % de NaHCO₃: para cada 100 mL, adicionar a 90 mL de CMC 3 % estéril, 10 mL de meio 199 com sais de Earle 10 X, 5 mL de soro fetal bovino inativado, 1 mL de sulfato de gentamicina (4 mg/mL), 100 µL de fungizona (500 mg/mL) e 5 mL de NaHCO₃ 4,4 %.

Cristal Violeta

Solução estoque 2 %: misturar 10 g de cristal violeta em pó, 100 mL de metanol e água destilada q.s.p. 500 mL.

Solução de uso 0,02%: misturar 10 mL da solução estoque em 1 L de água.

DEPC: adicionar DEPC em água bidestilada para uma concentração de 0,01 %. Autoclavar a mistura por 15 min a 121° C.

EDTA 0,5 M pH 8,0: dissolver 18,61 g de EDTA em água bidestilada q.s.p. para 100 mL, ajustar a pH 8,0 com NaOH 1 N e estocar a 4° C.

Formol 10 %: misturar 1 L de formaldeído a 36 % com 2,6 L de água.

Meio 199 com sais de Earle

199/Earle completo: meio 199 com sais de Earle, 0,11 % (sistema fechado) ou 0,22 % (sistema aberto) de NaHCO₃, fungizona e gamicina. Para cada 100 mL de meio, adicionar a 90 mL de água bidestilada, 10 mL de meio 199 com sais de Earle 10 X, 5 mL de soro fetal bovino inativado (Cutilab), 1 mL de sulfato de gentamicina (4 mg/mL), 100 µL de fungizona (500 mg/mL) e 2,5 mL (0,11 %) ou 5 mL (0,22 %) de NaHCO₃ 4,4 % pH 7,0.

Meio BHI (*Brain Heart Infusion*) comercial (BD)

Para 1 litro: dissolver 37 g do pó pronto em 900 mL de água destilada e aquecer com agitação constante até que todo o pó tenha se dissolvido. Completar com água destilada até 1 L e esterilizar por autoclavação por 15 min a 121° C. Cada litro possui, aproximadamente, 7,7 g de cérebro de bezerro; 9,8 g de coração de boi; 10,0 g de proteose de peptona; 2,0 g de dextrose; 5,5 g de cloreto de sódio; 2,5 g de fosfato dissódico.

Meio LB (*Luria-Bertani*) – (Sambrook *et al.*, 1989)

Líquido: dissolver 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 10 g de NaCl em 900 mL de água destilada. Agitar a solução até que os solutos tenham se dissolvido. Ajustar o pH para 7,0 com uma solução 5 N de NaOH e o volume final para um litro com água deionizada. Esterilizar a solução por autoclavação durante 20 min.

Sólido: este meio é idêntico ao LB líquido adicionando-se apenas 15 g de ágar a cada litro antes da autoclavação.

Paraformaldeído 4 % em tampão fosfato: dissolver 4 g de paraformaldeído em água destilada aquecida q.s.p. para 50 mL. Adicionar 1 ou 2 gotas de NaOH 1 N, deixar esfriar e adicionar 50 mL de tampão fosfato dibásico 2mM. Água e tampão fosfato devem estar sempre na proporção 1:1.

PBS 10 X pH 7,4: misturar 80 g de NaCl, 20 g de KCl, 14,4 g de Na₂HPO₄.H₂O e água bidestilada q.s.p. para 1 L. Ajustar pH para 7,4, esterilizar por autoclavação por 15 min e armazenar à temperatura ambiente (Sambrook *et al.*, 1989).

Solução de permeabilização 0,5% Triton X-100 em PBS: para cada 50 mL de PBS pH 7,4 estéril adicionar 1 g de Triton X-100.

Soro Fetal Bovino/SFB (Cultilab): inativar a 56° C por 30 min, aliquotar (50 mL) e armazenar a 4° C.

Sulfato de gentamicina (Garamicina) 5 mg/mL: misturar cinco ampolas (2 mL cada na concentração de 50 mg/mL) de garamicina a 90 mL de água bidestilada.

TAE (Sambrook *et al.*, 1989)

Solução de estoque 50 X: dissolver 242 g de Tris base em 57,1 mL de ácido acético glacial, 100 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0 e água destilada q.s.p. para 1 L. Estocar à temperatura ambiente.

Solução de uso 1X: misturar 40 mL da solução estoque em água destilada q.s.p. para 2 L.

TE pH 7,6: para 1 L do tampão deve-se colocar 10 mM de Tris HCl (10 mL Tris 1M pH 7,6), 1mM de EDTA (2 mL EDTA 0,5M pH 8,0) e água bidestilada q.s.p. para 1 L. Autoclavar a solução por 20 min a 121° C e estocar a -20° C (Sambrook *et al.*, 1989).

Tris HCl 1 M (pH 7,6): dissolver 12,11 g de tris base em água bidestilada q.s.p. para 100 mL, ajustar o pH para 7,6 com HCl e estocar a 4° C (Sambrook *et al.*, 1989).

Tripsina/verseno: preparar imediatamente antes do uso misturando 0,5 ml de tripsina estoque (5 mg/mL) a 50 mL de verseno.

Verseno

Solução estoque 5 %: misturar 50 g de EDTA, 0,1 mL de vermelho de fenol 1 % e água bidestilada q.s.p. para 1000 mL. Acertar a pH 7,6 com NaOH e estocar à temperatura ambiente.

Solução de uso 0,1 %: misturar 20 mL da solução estoque 5 %, 0,1 mL de vermelho de fenol 1 % e PBS pH 7,6 q.s.p. para 1000 mL.

10.2 Lista de aminoácidos

Aminoácido	Abreviação de três letras	Abreviação de uma letra
Alanina	Ala	A
Cisteína	Cys	C
Aspartato	Asp	D
Glutamato	Glu	E
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Lisina	Lys	K
Leucina	Leu	L
Metionina	Met	M
Asparaina	Asn	N
Prolina	Pro	P
Glutamina	Gln	Q
Arginina	Arg	R
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Valina	Val	V
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y

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](#)