

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**

**MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

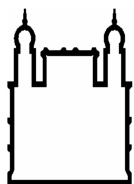
**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DOS VÍRUS  
QUIMÉRICOS FEBRE AMARELA / DENGUE CANDIDATOS A UMA  
VACINA TETRAVALENTE RECOMBINANTE CONTRA DENGUE**

**LUIZ GUSTAVO ALMEIDA MENDES**

**RIO DE JANEIRO**

**2013**

**MPTI**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**  
**Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

**LUIZ GUSTAVO ALMEIDA MENDES**

Caracterização fenotípica e molecular dos vírus quiméricos febre amarela / dengue candidatos a uma vacina tetravalente recombinante contra dengue

Dissertação apresentada ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos.

**Rio de Janeiro**  
**2013**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca de  
Ciências Biomédicas/ ICICT/ FIOCRUZ - RJ

M538 Mendes, Luiz Gustavo Almeida

Caracterização fenotípica e molecular dos vírus quiméricos febre amarela / dengue candidatos a uma vacina tetravalente recombinante contra dengue / Luiz Gustavo Almeida Mendes. – Rio de Janeiro, 2013  
xvi, 108 f. ; 30 cm.

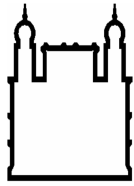
Dissertação (Mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Pós-graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2013.

Bibliografia: f. 78-89

1. Virologia. 2. Dengue 3. Vacina Recombinante

CDD 615.372

Trabalho realizado no Instituto de  
Tecnologia em Imunobiológicos, na Vice-  
Diretoria de Desenvolvimento  
Tecnológico, Laboratório de Tecnologia  
Viológica - LATEV, sob a orientação da  
Dra. Márcia Christina Vasconcelos  
Archer da Motta e Dra. Elena Cristina  
Caride Siqueira Campos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**  
**Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

**Luiz Gustavo Almeida Mendes**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DOS VÍRUS  
QUIMÉRICOS FEBRE AMARELA / DENGUE CANDIDATOS A UMA  
VACINA TETRAVALENTE RECOMBINANTE CONTRA DENGUE**

**Orientadores:** Dra. Márcia Christina Vasconcelos Archer da Motta

Dra. Elena Cristina Caride Siqueira Campos

Dissertação realizada em 27 de maio de 2013

**Examinadores:**

Dr Ricardo Galler (Presidente)  
Fiocruz

Dra Ada Maria de Barcelos Alves  
Fiocruz

Dra Luciana Barros de Arruda  
UFRJ

**Rio de Janeiro**  
**2013**

À minha família – Minha mãe Leila,  
meu pai Luiz Carlos, meus irmãos  
Eduardo e Fernando, meus avós  
Antônio e Jandyra – e a minha  
namorada Monique dedico esta  
dissertação.

## AGRADECIMENTOS

À Fiocruz, Bio-Manguinhos e Fiotec, pelo financiamento e todo suporte técnico-científico.

Agradeciementos especiais aos meus pais Luiz Carlos Hingel Mendes e Leila Maria de Almeida, meus irmãos Luiz Eduardo Mendes e Luiz Fernando Mendes, meus avós Antônio Almeida e Jandyra Fonseca, familiares que são sem dúvida o meu alicerce, minha inspiração de caráter e sucesso, meu motivo de vida. A Monique C. S. M. Z. Cardoso, que sem dúvida está sendo a direção do meu caminho nesta jornada, é a incentivadora, amiga, namorada e companheira fiel do meu dia-a-dia.

Aos amigos do LATEV: Elena Caride e a Márcia Archer que abriram as portas do laboratório, para que eu pudesse aprender e me desenvolver como pessoa e profissional; ao Idevaldo Inácio Ferreira amigo de bancada em todos os momentos da dissertação, com apenas palavras fica impossível descrever a gratidão e o carinho que eu tenho por ele e espero que possamos continuar a trabalhar juntos por muito tempo. Ao meu amigo Luiz Fernando Carvalho pela amizade dentro e fora do laboratório, que sem dúvida me ajudou a superar momentos difíceis. A Anna Maya Yoshida que sempre me deu carona, ótimos conselhos e suporte emocional. Ao Gérson um amigo incondicional; Marisol Simões uma grande amiga conquistada ao longo do tempo. A Ana Paula Yorio, ao André Tavares e a Andréa Rangel pelo auxílio na correção do trabalho. Aos amigos do LATEV em geral pelo carinho...

Ao Alfredo Jabor pela amizade e pelos ensinamentos e discussões de algumas técnicas de biologia molecular.

A amiga Cristiane Pestana que fez todo o sequenciamento nucleotídico e me ajudou em vários momentos difíceis dessa dissertação e ao Marco Alberto Medeiros por disponibilizar o LATER para a realização do sequenciamento.

À coordenadora do mestrado Dr<sup>a</sup> Sheila Farage, a secretária Zaíra Antunes e ao José Antônio Pinto pela ajuda na formatação deste trabalho.

Aqueles que por ventura não foram citados aqui e que participaram neste trabalho, muito obrigado.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein



## ÍNDICE

<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>XIII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XV</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XVI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1- Família Flaviviridae .....	1
1.2- Dengue .....	9
1.2.1 - Dados epidemiológicos da Dengue .....	11
<b>1.2.2- Manifestações Clínicas do Dengue .....</b>	<b>13</b>
1.2.3 - Prevenção e controle da doença .....	14
<b>1.2.3.1 – Vacina contra Dengue em Desenvolvimento.....</b>	<b>15</b>
<b>2- OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
2.1- Geral .....	24
2.2- Objetivos Específicos.....	24
<b>3- METODOLOGIA .....</b>	<b>25</b>
3.1- Cultivo e Manutenção de Células Vero.....	25
3.2- Produção de Estoques Virais .....	26
3.3-Titulação Viral.....	26
3.4- Ensaio de Fenótipo de Placa de Lise por Imunofocus .....	27
3.5- Cinética de Replicação Viral em Cultura de Células Vero .....	28
3.6- Determinação da Estabilidade Genética dos Vírus Quiméricos .....	28
3.7- Sequenciamento Nucleotídico.....	28
3.8- Testes em Animais.....	29
3.8.1- Teste de Neurovirulência .....	29
3.8.2- Teste de Proteção .....	29
3.9- Purificação dos Clones Virais .....	30
3.10- Cálculos e Gráficos.....	31
<b>4- RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>

<b>4.1- Caracterização Biológica dos Vírus Quiméricos.....</b>	<b>32</b>
4.1.1- Produção de Estoques Virais .....	32
4.1.2- Cinética de Replicação dos Vírus Recombinantes.....	33
4.1.3- Cinética de Replicação dos Vírus Quiméricos Escala de Produção .....	36
4.1.4- Fenótipo de Placa de Lise Viral.....	38
<b>4.2- Estabilidade Genética de vírus não clonado.....</b>	<b>39</b>
<b>4.3- Purificação Viral e Caracterização Biológica dos Vírus Clonados .....</b>	<b>42</b>
4.3.1- Seleção dos Clones.....	42
4.3.2- Produção de Estoques Virais Clonados .....	46
4.3.3- Cinética de Replicação dos Vírus Clonados .....	46
4.3.4- Estabilidade Genética dos vírus clonados.....	49
4.3.5- Fenótipo de Placa de Lise Viral.....	51
4.3.6- Neurovirulência em Camundongos .....	54
<b>4.3.6.1- Neurovirulência em Camundongos com Três semanas</b> .....	<b>55</b>
<b>4.3.6.2- Neurovirulência em Camundongos Neonatos</b> .....	<b>61</b>
4.3.7- Imunogenicidade de vírus quimérico YFV/DENV2 e seus derivados em camundongos.....	64
<b>5- DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>5.1- O desenvolvimento de vírus quiméricos.....</b>	<b>66</b>
<b>5.2- Propagação de vírus YFV/DENV quiméricos. ....</b>	<b>67</b>
<b>5.3- Análise da variabilidade genética dos vírus YFV/DENV quiméricos.....</b>	<b>68</b>
5.3.1- Variabilidade genética populacional e seleção de clones virais.....	69
5.3.2- Acúmulo de mutações em regiões genômicas.....	70
5.3.3- Origem das mutações.....	71
5.3.4- Consequências de mutações .....	73
<b>5.4- Caracterização fenotípica de vírus YFV/DENV recombinantes.....</b>	<b>75</b>
5.4.1- O uso de tamanho de placa de lise como indicador de estabilidade genética. ....	75
5.4.2- Atenuação dos clones virais em modelo murino. ....	76
5.4.3- Imunogenicidade do vírus quimérico YFV/DENV2.....	77
<b>5.5- Considerações finais .....</b>	<b>78</b>
<b>6- CONCLUSÕES.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>
<b>7- ANEXO .....</b>	<b>92</b>
<b>7.1- Preparo de meio e soluções .....</b>	<b>92</b>
<b>7.2- Figura dos pontos de mutação encontradas pela Sanofi-Pasteur na candidata a vacina contra Dengue ChimeriVax YFV/DENV1, 2, 3 e 4. ....</b>	<b>95</b>
<b>7.3- Símbolos e siglas dos aminoácidos .....</b>	<b>96</b>
<b>7.4- Imagens do fenótipo de placa de lise em tamanho real .....</b>	<b>97</b>
<b>7.5- Resultados de forma resumida da dissertação .....</b>	<b>108</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

~ - Aproximadamente  
 10° - Não diluído  
 AC - Acre  
 AL - Alagoas  
 AM - Amazonas  
 ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
 AP - Amapá  
 ATCC – *American Type Culture Collection*  
 BA - Bahia  
 BSC-1 - Célula De Rim de Macaco Verde Africano  
 C - Capsídeo  
 C6/36 – Célula de mosquito *Aedes albopictus*  
 CCL – Certified Cell Line  
 cDNA - ácido desoxiribonucleico complementar  
 CE - Ceará  
 CECAL - Centro de Criação de Animais de Laboratório  
 CGLAB - Coordenação-Geral de Laboratórios de Saúde Pública  
 CIGB - Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia  
 CMC - Carboximetilcelulose  
 CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono  
 CORREL - correlação  
 CP2 - Clones passagem 2  
 CP20 - Clones passagem 20  
 CPE - efeito citopático  
 DENV - Dengue  
 DESVPAD.P - Desvio-padrão de uma população  
 DNA - Ácido desoxiribonucleico  
 E - Envelope  
 E. - *Escherichia*  
 ELISA - Ensaio imunoenzimático (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)  
 ES - Espírito Santo  
 EUA - Estados Unidos da América  
 FA - Febre Amarela  
 FA17D - Vírus Vacinal da Febre Amarela  
 FD - Febre do Dengue  
 FHD - Febre Hemorrágica do Dengue  
 FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz  
 FRhI - Células Pulmonares de Macacos rhesus  
 GO - Goiás  
 GSK - Glaxo-SmithKline  
 i.c. - Intracerebral  
 IgM – Anticorpo tipo M  
 IOC- Instituto Oswaldo Cruz  
 IPK - Kourí Pedro Instituto de Medicina Tropical  
 JE - Encefalite Japonesa  
 KDa – kilo Dalton  
 L# - Large  
 LAEAN - Laboratório de Experimentação Animal  
 LATER - Laboratório de Tecnologia Recombinate  
 LATEV – Laboratório de Tecnologia Viroológica

**LLC-MK2** - Célula de Rim de Macaco rhesus  
**LOG** - Logaritmo  
**M** - Membrana  
**M#** - Medium  
**MA** - Maranhão  
**MG** - Minas Gerais  
**MOI** - Multiplicidade de Infecção  
**MS** - Mato Grosso do Sul  
**MS** - Ministério da Saúde  
**MT** - Mato Grosso  
**NaHCO<sub>3</sub>** - Bicarbonato de sódio  
**NIH** - *National Institutes of Health*  
**NMRC** - National Medical Research Council  
**NS1** - Não estrutural 1  
**NS2** - Não estrutural 2  
**NS3** - Não estrutural 3  
**NS4** - Não estrutural 4  
**NS5** - Não estrutural 5  
**nt** - Nucleotídeo  
**ORF** - Fase de Leitura Aberta (do inglês *Open Reading Frame*)  
**P** - Passagem  
**PA** - Pará  
**PB** - Paraíba  
**PDK** - Células de Rim de Cachorro  
**PE** - Pernambuco  
**PFU** - Unidade Formadora de Plaque  
**pH** - Potencial Hidrogeniônico  
**PI** - Piauí  
**PNH** - Primatas não-humanos  
**Pol** – Polimerase  
**PR** - Paraná  
**PrM** - Pré-membrana  
**PRNT** - Teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise (do inglês *Plaque Reduction Neutralization Test*)  
**RE** - Retículo Endoplasmático Rugoso  
**RJ** - Rio de Janeiro  
**RN** - Rio Grande do Norte  
**RNA** – Ácido ribonucléico (do inglês *Ribonucleic Acid*)  
**RO** - Rodônia  
**Rpm** - Rotações por minuto  
**RR** - Roraima  
**RS** - Rio Grande do Sul  
**RT - PCR** - Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (do inglês *Reverse transcription polymerase chain reaction*).  
**S#** - Small  
**S.** - *Saccharomyces*  
**SC** - Santa Catarina  
**SCD** - Síndrome do Choque Do Dengue  
**SE** - Sergipe  
**SLE** - Encefalite de St. Louis  
**SP** - São Paulo  
**SVS** – Secretaria de Vigilância em Saúde

**TBE** - Tick-Borne Encephalitis  
**TO** - Tocantins  
**UTR** - Região não traduzida  
**v/v** - Volume/volume  
**VEE** - Vírus Da Encefalite Equina Venezuelana  
**Vero** - Célula De Rim De Macaco Verde Africano *Cercopithecus aethiops*  
**VLPs** - *Virus-like particles*  
**VVA** - Vacina de vírus vivo atenuado  
**W** - Triptofano  
**WHO/ OMS** – *World Health Organization/ Organização Mundial da Saúde*  
**WNV** - *West Nile vírus*  
**WRAIR** - *Walter Reed Army Institute of Reseach*  
**WT** - *Wild type*  
**Y** - Tirosina  
**Δ** - Deleção

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.2:</b> Estrutura de uma partícula viral da família Flaviviridae-----	<b>2</b>
<b>Figura 1.2:</b> Estrutura do genoma dos flavivírus e sua expressão-----	<b>3</b>
<b>Figura 1.3:</b> Representação conformacional da proteína E do dengue-----	<b>5</b>
<b>Figura 1.4:</b> Esquema das etapas do ciclo de replicação dos <i>Flavivirus</i> .-----	<b>8</b>
<b>Figura 1.5:</b> Esquema das etapas do ciclo de transmissão dos <i>Flavivirus</i> .-----	<b>10</b>
<b>Figura 1.6:</b> Incidência dos sorotipos do dengue no Brasil 2012.-----	<b>12</b>
<b>Figura 3.1:</b> Esquema do ensaio de purificação dos clones virais ( <i>plaque pick</i> ).-----	<b>30</b>
<b>Figura 4.1:</b> Curvas de replicação dos vírus recombinantes YFV/DENV1 (PE).-----	<b>34</b>
<b>Figura 4.2:</b> Curvas de replicação dos vírus recombinantes YFV/DENV2(PE)-----	<b>34</b>
<b>Figura 4.3:</b> Curvas de replicação dos vírus recombinantes YFV/DENV3 H87-----	<b>35</b>
<b>Figura 4.4:</b> Curvas de replicação dos vírus recombinantes YFV/DENV4-----	<b>35</b>
<b>Figura 4.5:</b> Curvas de replicação em <i>Cell factory</i> -----	<b>36</b>
<b>Figura 4.6:</b> Fenótipo de placa com os vírus P2 YFV/DENV1(PE), YFV/DENV2(PE), YFV/DENV3 H87, YFV/DENV4-----	<b>38</b>
<b>Figura 4.7:</b> Pontos de mutação dos clones virais P2 x CP2-----	<b>44</b>
<b>Figura 4.8:</b> Curvas de replicação dos vírus recombinantes purificados YFV/DENV1 (PE)-----	<b>47</b>

<b>Figura 4.9:</b> Curvas de replicação dos vírus recombinantes purificados YFV/DENV2(PE)-----	<b>47</b>
<b>Figura 4.10:</b> Curvas de replicação dos vírus recombinantes purificados YFV/DENV3 H87 -----	<b>48</b>
<b>Figura 4.11:</b> Curvas de replicação dos vírus recombinantes purificados YFV/DENV4 -----	<b>48</b>
<b>Figura 4.12:</b> Pontos de mutação dos clones virais CP2 x CP10 -----	<b>51</b>
<b>Figura 4.13:</b> Fenótipo de placa de lise YFV/DENV1(PE)-----	<b>52</b>
<b>Figura 4.14:</b> Fenótipo de placa de lise YFV/DENV2 (PE)-----	<b>52</b>
<b>Figura 4.15:</b> Fenótipo de placa de lise YFV/DENV3 H87 -----	<b>53</b>
<b>Figura 4.16:</b> Fenótipo de placa de lise YFV/DENV4-----	<b>53</b>
<b>Figura 4.17:</b> Teste de neurovirulência com animais com 3 semanas $10^3$ PFu YFV/DENV1(PE)-----	<b>55</b>
<b>Figura 4.18:</b> Teste de neurovirulência com animais com 3 semanas $10^3$ PFu YFV/DENV2 (PE) -----	<b>56</b>
<b>Figura 4.19:</b> Teste de neurovirulência com animais com 3 semanas $10^3$ PFu YFV/DENV3 H87-----	<b>56</b>
<b>Figura 4.20:</b> Teste de neurovirulência com animais com 3 semanas $10^3$ PFu YFV/DENV4 -----	<b>57</b>
<b>Figura 4.21:</b> Teste de neurovirulência com animais com 3 semanas $10^0$ YFV/DENV1(PE)-----	<b>58</b>
<b>Figura 4.22:</b> Teste de neurovirulência com animais com 3 semanas $10^0$ YFV/DENV2 (PE)-----	<b>59</b>
<b>Figura 4.23:</b> Teste de neurovirulência com animais com 3 semanas $10^0$ YFV/DENV3 H87 -----	<b>59</b>
<b>Figura 4.24:</b> Teste de neurovirulência com animais com 3 semanas $10^0$ YFV/DENV4 -----	<b>60</b>
<b>Figura 4.25:</b> Teste de neurovirulência com animais neonatos $10^3$ PFu YFV/DENV1(PE)-----	<b>61</b>
<b>Figura 4.26:</b> Teste de neurovirulência com animais neonatos $10^3$ PFu YFV/DENV2 (PE)-----	<b>62</b>

<b>Figura 4.27:</b> Teste de neurovirulência com animais neonatos 10 <sup>3</sup> PFu YFV/DENV3 H87 -----	<b>62</b>
<b>Figura 4.28:</b> Teste de neurovirulência com animais neonatos 10 <sup>3</sup> PFu YFV/DENV4 -----	<b>63</b>
<b>Figura 4.29:</b> Esquematização do desenho experimental do teste de proteção -----	<b>64</b>
<b>Figura 4.27:</b> Teste proteção DENV2 -----	<b>65</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1:</b> Principais fabricantes de vacina contra dengue, o tipo de cada vacina e os estágios de desenvolvimento. -----	<b>15</b>
<b>Tabela 1.2:</b> Vírus recombinantes e as cepas utilizadas no processo de construção das quimeras -----	<b>22</b>
<b>Tabela 4.1:</b> Título dos estoques virais -----	<b>33</b>
<b>Tabela 4.2:</b> Cell factory quatro camadas -----	<b>37</b>
<b>Tabela 4.3:</b> Cell factory dez camadas. -----	<b>37</b>
<b>Tabela 4.4:</b> Nível de significância entre o tamanho de placa de lise dos vírus P2 x parietal -----	<b>38</b>
<b>Tabela 4.5:</b> Estabilidade genética do vírus quimérico YFV/DENV2 (PE) P2 x P20. -	<b>40</b>
<b>Tabela 4.6:</b> Estabilidade genética do vírus quimérico YFV/DENV3 H87 e YFV/DENV4 P2 x P20 -----	<b>41</b>
<b>Tabela 4.7:</b> Sequenciamento das regiões prM/E dos clones virais de YFV/DENV1(PE) -----	<b>43</b>
<b>Tabela 4.8:</b> Sequenciamento das regiões prM/E dos clones virais de YFV/DENV4.	<b>43</b>
<b>Tabela 4.9:</b> Sequenciamento das regiões prM/E dos clones virais de YFV/DENV3 H87 -----	<b>44</b>
<b>Tabela 4.10:</b> Pontos de mutação e as consequências destas nas passagens CP2	<b>45</b>
<b>Tabela 4.11:</b> Vírus selecionados a partir do sequenciamento nucleotídeo -----	<b>46</b>
<b>Tabela 4.12:</b> Estabilidade genética dos clones -----	<b>50</b>

<b>Tabela 4.13:</b> Nível de significância entre o tamanho de placa de lise CP2 x CP10 -	<b>54</b>
<b>Tabela 4.14:</b> Títulos virais após a inoculação dos camundongos -----	<b>57</b>
<b>Tabela 4.15:</b> Títulos virais após a inoculação dos camundongos -----	<b>60</b>
<b>Tabela 4.16:</b> Titulação viral pós-inoculação -----	<b>63</b>
<b>Tabela 4.17:</b> Títulos virais utilizados nas imunizações e no desafio-----	<b>64</b>
<b>Tabela 5.1:</b> Diferença entre as cepas virais utilizadas pela Fiocruz e a Sanofi Pasteur-----	<b>71</b>



## RESUMO

A infecção pelo vírus da dengue é um problema de saúde pública mundial, com epidemias recorrentes nas regiões tropicais da Ásia, África e Américas. O desenvolvimento de vacinas contra dengue é de suma importância, já que até o momento não existem vacinas licenciadas. Nossa intenção final é a de podermos desenvolver uma vacina mista recombinante contra dengue a partir do clone infeccioso do vírus da febre amarela, linhagem vacinal 17D. Isso foi realizado através da troca dos genes estruturais prM/E do vírus da febre amarela pelos respectivos genes do vírus dengue dos sorotipos 1, 2, 3, e 4. Neste trabalho descrevemos as características genotípicas e fenotípicas dos vírus recombinantes Febre Amarela/Dengue construídos anteriormente. Esta caracterização consiste em observar o comportamento desse vírus quanto ao fenótipo de placa de lise, crescimento em cultura de células Vero em meio sem soro, replicação em *Cell Factory* (média escala), estabilidade genética, seleção clonal, teste de neurovirulência e proteção em modelo murino. As construções dos vírus recombinantes YFV/DENV prM/E são viáveis, produzindo vírus que replicam eficientemente em garrafas estacionárias T-175cm<sup>2</sup> e Cell Factory, com propriedades de replicação similares aos vírus dengue selvagens parentais, sugerindo que a troca da prM/E de febre amarela pela mesma região de dengue é capaz de afetar esta característica fenotípica do vírus YFV17D. Após a etapa de purificação clonal os clones foram sequenciados e comparados com o lote de trabalho P2. Esta comparação revelou algumas alterações de aminoácido entre as passagens P2 e CP2 em todos os clones, exceto para os clones YFV/DENV4. Os clones CP2 foram propagados por mais oito vezes em célula Vero para determinar se os vírus eram geneticamente estáveis. Após as passagens observamos que muitas alterações foram de caráter adaptativo à célula Vero. Os clones foram caracterizados pela morfologia de placa de lise e revelados por imunofocus. Os clones YFV/DENV1 (PE), YFV/DENV2 (PE), YFV/DENV4 demonstram ser homogêneos e o clone YFV/DENV3 H87 heterogêneo. Com o objetivo de avaliar o neurotropismo dos clones virais, foram realizados dois experimentos com camundongos de três semanas de idade com input viral de 10<sup>3</sup> PFU/30µl no primeiro experimento e no segundo com input viral não diluído e um com camundongos neonatos com input viral de 10<sup>3</sup> PFU/20µl. Os resultados não mostraram nenhuma diferença entre os dois testes com camundongos de três semanas, entretanto com os neonatos foram neurovirulentos. Seguimos com o teste de imunogenicidade com os clones virais de YFV/DENV2 (PE) em modelo murino com input viral 10<sup>4</sup> PFU/100µl. O clone YFV/DENV2C alcançou 93% de sobrevivência, YFV/DENV2A 81% e YFV/DENV2B 75%. Os resultados obtidos, são de grande importância, para a formulação de uma vacina tetravalente, a ser testada para imunogenicidade em primatas não-humanos.

## ABSTRACT

Dengue virus infection is a public health problem worldwide, with recurrent epidemics in tropical regions of Asia, Africa and the Americas. The development of vaccines against dengue is of paramount importance, since to date there are no licensed vaccines. Our ultimate intention is to be able to develop a vaccine against dengue based on recombinant yellow fever 17D vaccine virus. Recombinant viruses were constructed by exchanging structural genes prM / E of yellow fever virus by the respective genes of dengue virus serotypes 1, 2, 3, and 4. This study describes the genotypic and phenotypic characteristics of such Yellow Fever / Dengue recombinant viruses built previously. This characterization was focused on plaque size phenotype, growth in Vero cell culture in serum free medium, replication in Vero cells grown in Cell Factory (medium scale), genetic stability, clonal selection and protection against a lethal challenge in a murine model. The constructions of the recombinant viruses YFV/DENV prM/E produced viruses that replicate efficiently in stationary T-175cm<sup>2</sup> flasks and Cell Factory with replication and plaque morphology similar to parental wild dengue virus, suggesting that the exchange of prM/E of yellow fever virus for the same region of dengue can affect this phenotypic trait. . After clonal purification steps viral clones had their genome sequenced and compared with the genome of the P2 virus in the working seed lot. Some changes were observed between the amino acid sequences of passages P2 and CP2 in all clones except for clones from YFV/DENV4. Clones CP2 were further passed through eight passages in Vero cell to determine whether the virus was genetically stable. After the passages we noted that many changes were of adaptive nature to Vero cell. The clones were characterized with respect to plaque morphology as revealed by immunofocus. Clones YFV/DENV1 (PE), YFV/DENV2 (PE), YFV/DENV4 were shown to be homogeneous and YFV/DENV3 H87 was rather heterogeneous, even after cloning. Aiming to evaluate the neurotropism (attenuation) of viral clones, two experiments were conducted with three week-old mice with viral input of 10<sup>3</sup> PFU/mouse in the first experiment and the second with undiluted viral stock. Suckling mice received a viral input of 10<sup>3</sup> PFU/mouse. The results showed no difference between the two tests with three week-old mice, in which none of the chimeric viruses were neurovirulent. However, in suckling mice a significant degree of neurovirulence was noted. We studied the immunogenicity of the YFV/DENV2 (PE) viruses in a murine model and immunized animals challenged with an otherwise lethal dose of neurotropic DENV2 virus. Clone YFV/DENV2C provided 93% protection whereas YFV/DENV2A and YFV/DENV2B reached 81% and 75%, respectively. The results are of great importance for the development of a tetravalent vaccine.

# 1. INTRODUÇÃO

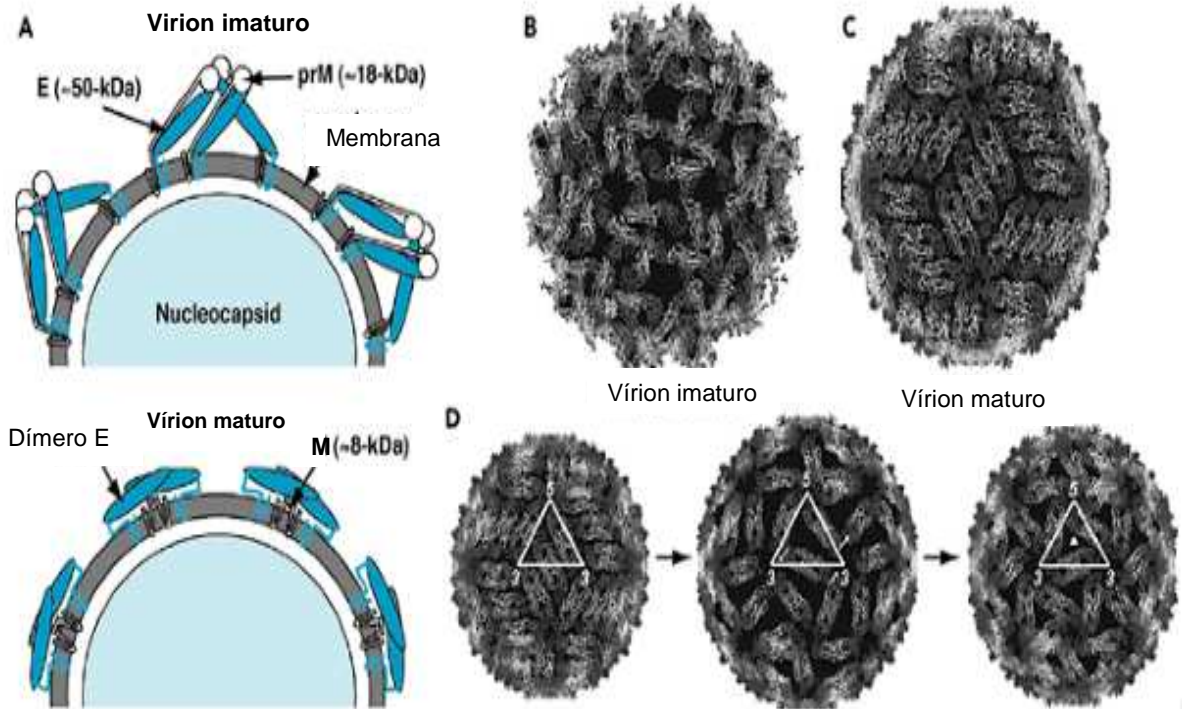
## 1.1- Família Flaviviridae

A família *Flaviviridae* é constituída por quatro gêneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pestivirus* e *Pegivirus*. O nome *Flaviviridae* (do latim flavus, que significa amarelo) se refere à icterícia provocada pelo protótipo da família o vírus da febre amarela (YFV). Atualmente, é composta por cerca de 60 vírus, dos quais 29 estão associados a doenças em humanos, tais como encefalites e febres hemorrágicas (ICTV, 2012). A maioria dos flavivírus é transmitida por vetores artrópodes (Arbovírus – *arthropod-borne viruses*), dentre os mais importantes estão o (YFV), o vírus dengue (DENV) com os sorotipos 1, 2, 3 e 4, o vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV), vírus da encefalite do Vale de Murray (MVEV) e o vírus do Oeste do Nilo (WNV) (Mackenzie et al. 2004).

Os vírus do gênero *Flavivirus*, bem como os da família *Flaviviridae* possuem morfologia esférica com diâmetro que pode variar entre 40 e 60nm. Apresentam um nucleocapsídeo de aproximadamente 30nm, o qual é envolto por uma bicamada lipídica derivada de membranas da célula hospedeira (Ray e Shi, 2006; Lindenbach et al. 2007). O nucleocapsídeo possui estrutura icosaédrica e é formado pela proteína do capsídeo (C). Na bicamada lipídica se inserem duas proteínas estruturais, a proteína de envelope (E) e a proteína de membrana (M) em sua forma madura.

O precursor da proteína M (prM) está presente na forma intracelular da partícula viral. A partícula do vírus dengue imaturo é coberta com 60 trímeros assimétricos de prM-E, que se destacam como picos a partir da sua superfície (Figura 1.1.A). A proteína prM protege a proteína E da fusão prematura ao passar pelo meio ácido do aparelho de Golgi durante a morfogênese (Kuhn et al. 2002). Durante a maturação que ocorre na passagem pelo sistema de Golgi, a parte N-terminal da proteína prM é clivada da superfície viral para que o arranjo estrutural das 180 moléculas na superfície do vírus se reorganizem na forma dimérica, conferindo infectividade ao vírus. No vírus maduro, as proteínas E existem como

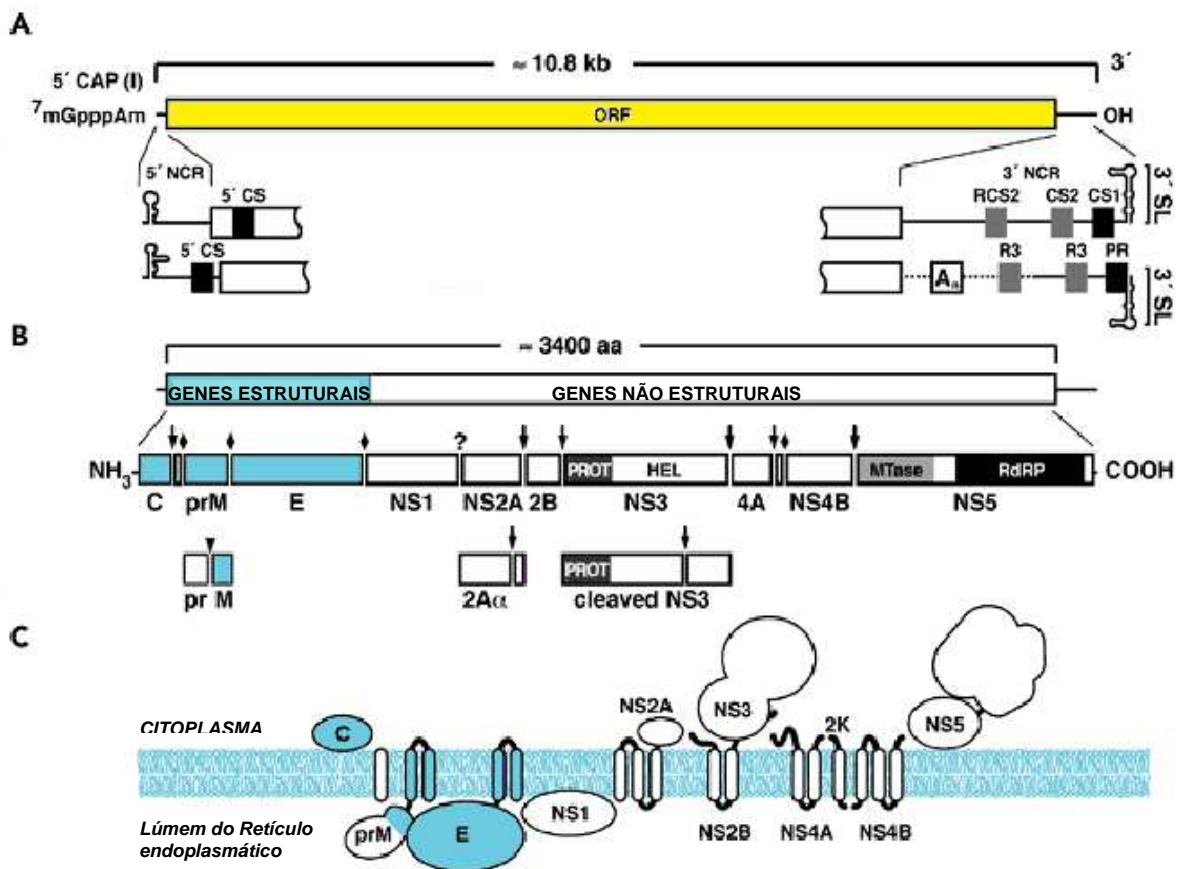
homodímeros que se encontram na membrana viral sob a forma de 30 "balsas". Cada balsa contém três dímeros paralelos dispostos em simetria icosaédrica e organizados em zigue-zague (Kuhn et al. 2002; Zhang et al. 2003) (Figura 1.1.C). A glicoproteína (E) é o principal determinante antigênico da partícula viral e é responsável pelo reconhecimento do receptor celular e fusão com a membrana do endossomo na entrada do vírus na célula hospedeira (Figura 1.1) (Kimura e Ohyama, 1988).



**Figura 1.1.** Estrutura da partícula viral de Flavivirus. A: Proteínas do envelope de vírus maduro e imaturos. B: Crio-microscopia eletrônica da partícula imatura de DENV-2 mostrando a conformação da proteína E. C: Crio-microscopia eletrônica da partícula madura de DENV-2 mostrando a conformação da proteína E. D: Estágio fusogênico induzido por pH baixo. (Modificado de Lindenbach et al. 2007.)

O genoma dos *Flavivirus* é constituído de RNA fita simples polaridade positiva de aproximadamente 11 kb e contém uma fase aberta de leitura (ORF) que codifica para uma poliproteína precursora com cerca de 3.400 aminoácidos (Figura 1.2). Esta poliproteína é clivada em eventos co- e pós-traducionais, por enzimas celulares e viral, resultando em 10 proteínas virais denominadas: C, prM/M, E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. As proteínas C, M e E são proteínas estruturais do vírus, enquanto que as proteínas NS são proteínas não estruturais requeridas na replicação do genoma e na tradução, e podem exercer papel, também, na montagem e liberação das partículas e evasão do sistema imune (Ray e Shi, 2006; Lindenbach et al. 2007).

Além da ORF, o genoma possui regiões 5' e 3' não traduzidas (UTR's) com cerca de 90 a 130 nucleotídeos (nt) e 430 a 760 nt, respectivamente. Essas regiões contêm estruturas secundárias que são essenciais para a tradução, replicação do genoma e montagem da partícula viral. A extremidade 5' do genoma possui, ainda, uma estrutura de "cap" tipo 1 (m7GpppAmN2) e, ao contrário dos RNAs mensageiros celulares, a extremidade 3' não exibe uma cauda poli(A) (Figura 1.2) (Ray e Shi, 2006; Lindenbach et al. 2007).



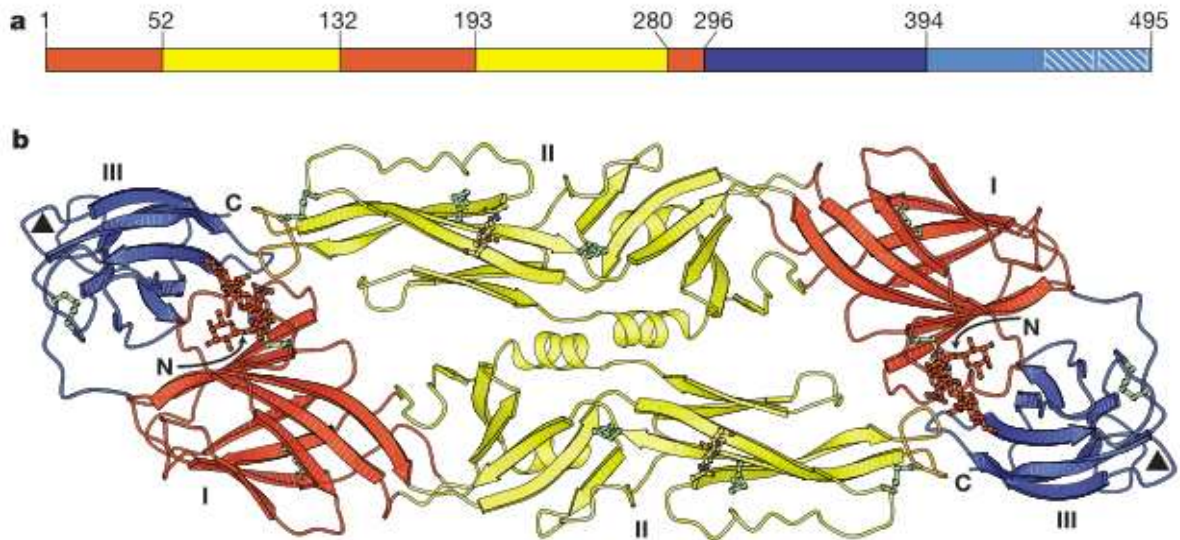
**Figura 1.2.** Estrutura do genoma dos flavivírus e sua expressão de proteínas. A: Estrutura do RNA genômico. O genoma viral é representado por regiões codificantes de proteínas estruturais e não estruturais, a extremidade 5' cap e regiões 5' e 3' não codificantes (NCR). B: Produtos do processamento e clivagem da poliproteína. Os sítios de clivagem estão indicados: protease serina através da seta para baixo ( $\downarrow$ ), furina ou proteases relacionadas ( $\diamond$ ) e proteases desconhecidas por (?). C: Topologia proposta para os produtos de clivagem da poliproteína dos flavivírus em relação à membrana do retículo endoplasmático (ER). As proteínas estão aproximadamente em escala (áreas são proporcionais ao número de aminoácidos) e dispostas na ordem (da esquerda para a direita) da sua tradução. Proteínas estruturais maduras estão sombreadas e as porções C-terminais das proteínas M e E que atravessam a membrana são indicados (modificado de Lindenbach et al. 2007).

A proteína C, com peso molecular de 11 kDa, forma juntamente com o RNA, o nucleocapsídeo viral. Contém resíduos básicos de lisina e arginina nas regiões N e C-terminal, que estão envolvidos no empacotamento do RNA genômico. Além disso, a porção central da proteína C contém um domínio hidrofóbico que interage com membranas celulares e pode ter papel na montagem do vírus. Outra região hidrofóbica, na porção C-terminal, é encontrada na proteína C nascente e, provavelmente, serve como peptídeo sinal para a translocação da proteína prM através do retículo endoplasmático (RE). A proteína C madura é clivada, nesta região do domínio hidrofóbico, por uma serina-protease viral. Além disso, a proteína madura é encontrada na forma de dímeros, sendo cada monômero formado por 4  $\alpha$ -hélices (Henchal e Putnak, 1990; Lindenbach et al. 2007).

A glicoproteína precursora da proteína M (prM) possui peso molecular aproximado de 26kDa . É uma precursora glicosilada da proteína de membrana (M) e situa-se na superfície viral na forma imatura. A clivagem de prM e, conseqüente, liberação do segmento pr e da proteína madura M (8 kDa) ocorre tardiamente na via de secreção e é mediado pela protease celular furina, antes da liberação do vírus de dentro da célula. Acredita-se que a clivagem da proteína prM é essencial para a liberação de partículas virais infectivas (Chambers et al. 1990a; Lindenbach et al. 2007). A prM tem como função estabilizar a proteína E, impedindo a sua exposição prematura ao pH reduzido na via exocítica (Stadler et al. 1997; Heinz F, et al. 1994a e 1994b). Estudos sugerem que a prM atua como uma chaperona, cuja função é evitar erros de dobramentos na proteína E, durante o processo de maturação viral (Rodenhuis-Zybert et al. 2010).

A glicoproteína E é a principal proteína do envelope viral (53-54 kDa), sendo responsável por importantes processos como ligação ao receptor celular, fusão da membrana viral com a endossomal e morfogênese, além de ser o principal alvo da resposta imuno-protetora no hospedeiro vertebrado (Nowak e Wengler, 1987). A glicoproteína E é sintetizada como proteína de membrana tipo I, contendo 12 resíduos conservados de cisteína que formam pontes dissulfeto. Cada subunidade desta proteína é composta por três domínios: I, II, III e uma região hidrofóbica de 53 aminoácidos (Figura 1.3).





**Figura 1.3.** Representação conformacional da proteína E. Em (A) observamos a disposição da proteína E linearizada e a localização de cada domínio através dos genes. (B) Estrutura tridimensional da proteína E com os domínios I (vermelho), II (amarelo), III (azul) e um resíduo, hidrofóbico, de 53 aminoácidos (azul claro). O N (abreviação de asparagina) é o sítio de glicosilação (Modis et al.2004).

O domínio I compreende a parte central da molécula e contém aproximadamente 120 aminoácidos. Este domínio está associado a uma resposta imune predominantemente de anticorpos não-neutralizantes tipo-específico (Lee et al. 1997). Entretanto, alguns estudos demonstraram que anticorpos gerados contra esse domínio também podem ter atividade neutralizante (Roehrig et al. 1998). O domínio II possui aproximadamente 180 aminoácidos e é responsável pelo processo de dimerização dos monômeros da proteína E. Neste domínio existe uma região denominada alça de fusão, com uma sequência hidrofóbica altamente conservada entre os sorotipos e que se expõe apenas na presença de pH ácido. Essa região tem um papel importante na mediação da fusão das membranas virais e endossômica, durante a infecção da célula hospedeira. O domínio II induz a produção de anticorpos neutralizantes e não-neutralizantes, e ambos reagem cruzadamente com outros sorotipos de vírus de dengue (Modis et al. 2003; Modis et al. 2004). O domínio III se localiza na porção C-terminal da proteína E e contém aproximadamente 98 aminoácidos. Este domínio atua na interação vírus-célula, apresentando sítios que se ligam a receptores presentes na superfície das células hospedeiras (Modis et al. 2003; Modis et al. 2005; Guzman et al. 2010). Esta interação é responsável pela endocitose da partícula viral. Alguns epítomos presentes neste domínio induzem anticorpos neutralizantes tipo e subtipo-específicos (Modis et al. 2003; Modis et al. 2005).

O domínio III é considerado um importante alvo para a produção de anticorpos monoclonais e vacinas para uso terapêutico e profilático, respectivamente (Guzman et al. 2010).

A proteína NS1 é uma glicoproteína (46 kDa) não estrutural conservada entre os quatro sorotipos de DENV. No interior das células infectadas a expressão da NS1 parece ser essencial para a replicação do vírus (Khromykh et al. 1999; Watanabe et al. 2012). NS1 é sintetizada numa célula infectada como um monómero solúvel em água e rapidamente é dimerizada no lúmen do retículo endoplasmático (ER), seguido pelo transporte para a superfície celular e a secreção para o meio extracelular, predominantemente como um hexâmero (Flamand et al. 1999). Atualmente, o mecanismo pelo qual a secreção da NS1 contribui para a patogênese permanece obscura. Altos níveis de secreção da NS1 foram encontrados no soro de pacientes infectados com DENV durante infecções agudas (Alcon et al. 2002). Assim, a secreção de NS1 pode estar relacionada com a patogênese da infecção pelo vírus do DENV e tem sido proposto como um parâmetro de prognóstico para a gravidade da doença (Somnuk et al. 2011).

A proteína não estrutural 3 (NS3) é uma proteína bastante conservada multifuncional de aproximadamente 69 kDa que está envolvida no processamento da poliproteína e na replicação do RNA. A NS3 contém um domínio de serina-protease, que é responsável pelo processamento proteolítico da poliproteína viral em sítios que a protease celular não atua (Chambers et al. 1990b; Falgout et al. 1991; Yamshchikov e Compans, 1995; Yamshchikov e Trent, 1997; Stocks & Lobigs, 1998), localizada na porção N-terminal, e uma helicase que está associada ao processo de replicação (Costa et al. 2011), além das funções de NTPase (hidrolisa ATP para fornecer energia durante os processos de replicação); e de RTPase (atua provavelmente removendo o grupo fosfato da região 5' N-terminal que parece estar envolvido no processo de adição da estrutura cap na extremidade 5' UTR do genoma viral) (Lindenbach et al. 2007). A infecção por dengue induz respostas imunes diferentes para as proteínas virais. Os anticorpos são produzidos principalmente contra as proteínas E e NS1 (Rothman, 2004), enquanto que a maioria dos epitopos de células T estão concentrados no interior da proteína NS3, o alvo principal para CD4 e CD8 de resposta de células-T (Appanna et al. 2007; Rothman, 2004).

A proteína NS5 possui peso molecular de aproximadamente 100-103 kDa e é a maior e a mais conservada das proteínas virais constituindo-se na RNA polimerase



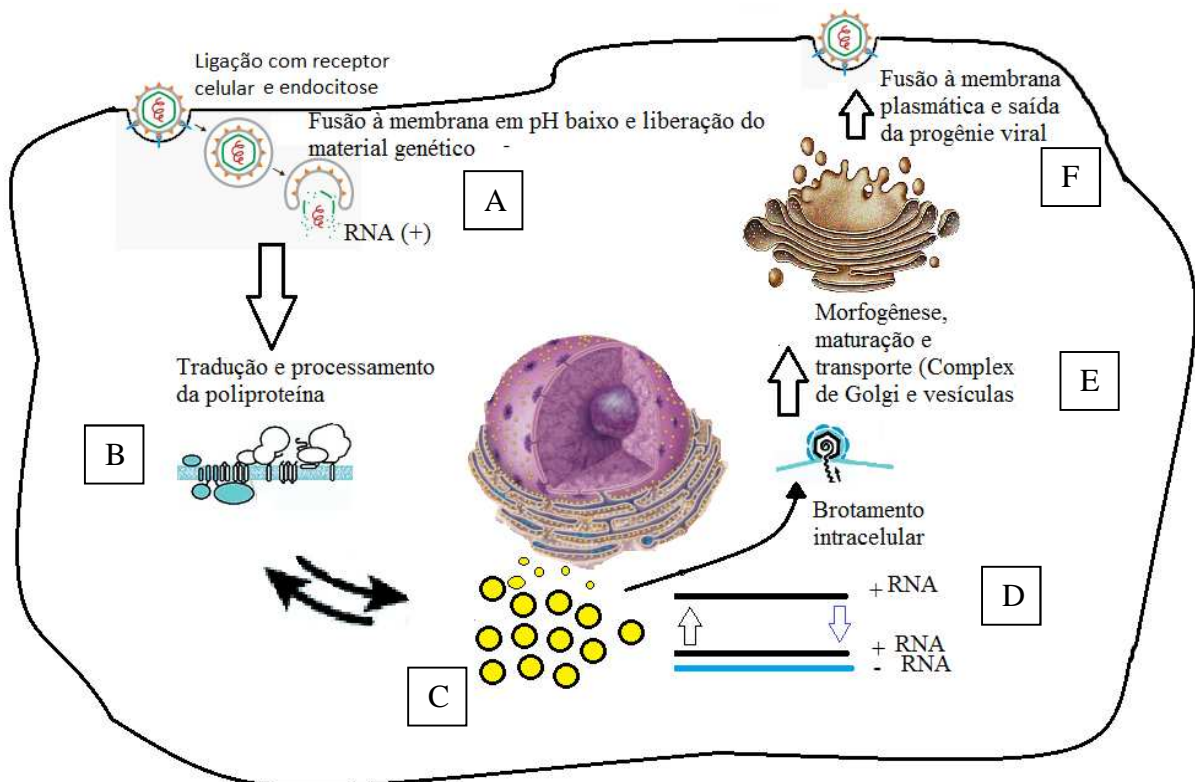
viral já que sua sequência contém vários elementos estruturais próprios de RNA polimerases (Welsch et al. 2009). A porção C-terminal da NS5 possui uma sequência com atividade de RNA polimerase dependente de RNA que é responsável pela replicação, sintetizando cópias negativas e positivas do RNA viral. As fitas negativas servem de molde para a transcrição das fitas positivas de RNA que serão utilizadas para a tradução de novas poliproteínas e/ou seguirão para a montagem do nucleocapsídeo das partículas virais. A parte N-terminal da NS5 é responsável pela adição do *cap* e pela metilação da extremidade 5' (Qi et al. 2008).

As quatro pequenas proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B possuem sequências de aminoácidos pouco conservadas, mas contém múltiplos trechos hidrofóbicos cuja distribuição ao longo de cada proteína é conservada entre os Flavivirus. Foram relacionadas, até o momento, a alguns processos da propagação viral: NS2A parece ser necessária ao processamento correto da NS1 e na maturação viral em si (Kummerer E Rice, 2002); NS2B encontra-se associada com NS3, atuando como co-fator do complexo proteolítico viral (Falgout et al. 1991; Chambers *et al.*, 1995; Jan et al. 1995); NS4A interage com NS1 permitindo a sua interação no processo citoplasmático da replicação do RNA. A NS4B parece modular a replicação viral através da interação com outra proteína não estrutural a NS3. Além disso, a NS4B pode estar associada à inibição da resposta de interferons (IFN do tipo 1) em indivíduos infectados. (Lindenbach e Rice, 1999).

Considerando-se que a síntese de RNA viral ocorre no citoplasma celular em associação com membranas do retículo endoplasmático (RE), postula-se que estas proteínas hidrofóbicas virais estariam embebidas em membranas e através de interações com NS3 e NS5 estariam participando com estas de processos na replicação viral (Welsch et al. 2009).

O ciclo de multiplicação dos flavivírus ocorre no citoplasma e se inicia com a adsorção da partícula viral à célula alvo. Após a adsorção, acredita-se que os vírus penetrem na célula num processo de endocitose mediado por receptor, provavelmente pela ligação da proteína E do vírion e receptores da membrana plasmática da célula hospedeira. O vírus presente em vesículas endocíticas sofre rearranjos estruturais, com as proteínas E dos dímeros passando a formar trímeros, processo este catalizado por pH baixo, permitindo a fusão do envelope do vírion com a membrana endossomal e a liberação do capsídeo no citoplasma celular (Gollins e Porterfields, 1985). O RNA viral dá origem, uma vez traduzido à poliproteína viral que por sua vez após as clivagens proteolíticas origina as três proteínas estruturais

(C-prM-E), seguida das sete proteínas não estruturais (NS1-NS2A-NS2B-NS3,NS4A,NS4B,NS5) (Rice et al.1985). O RNA serve ainda como molde para a síntese de uma fita complementar negativa, que servirá de molde para síntese de mais fitas positivas a serem utilizadas no empacotamento de novas partículas virais (Cleaves et al.1981) (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Ciclo de replicação viral. A entrada da partícula viral ocorre através da via de endocitose mediada por receptor. No pH ácido do endossoma a proteína E sofre mudanças conformacionais que levam a fusão das membranas viral e endossômica (a). O RNA viral é traduzido e inicia-se o processo de replicação(b). A montagem das partículas virais ocorre no RE (c,d), e as novas partículas imaturas recém formadas, seguem pela via de secreção e completam a maturação na rede trans-Golgi (e). Posteriormente os vírus são liberados pela célula hospedeira (f). Adaptado de Fields, 2007.

A montagem das partículas virais ocorre em associação com o retículo endoplasmático (RE) das células hospedeiras. Para formar o nucleocapsídeo precursor, durante a montagem do vírion, o domínio citoplasmático altamente básico da proteína C interage com o RNA genômico viral. As proteínas prM e E são deslocadas para o RE posicionando seus domínios carboxi terminal hidrofóbicos na bicamada lipídica. A clivagem de prM ocorre provavelmente próximo ou durante a liberação do vírus, já que não se detecta proteína M nas partículas intracelulares e está relacionada com o desencadeamento de mudanças no envelope que promovem a infecciosidade (Wengler e Wengler, 1989). Os vírus brotam para a luz do retículo endoplasmático adquirindo uma membrana lipídica (envelope) e assim as

partículas virais se mantêm nas cisternas do RE. A progênie viral é transportada em vesículas através do sistema de Golgi sendo liberadas por exocitose (Chambers et al. 1990a; Lindebach et al. 2007).

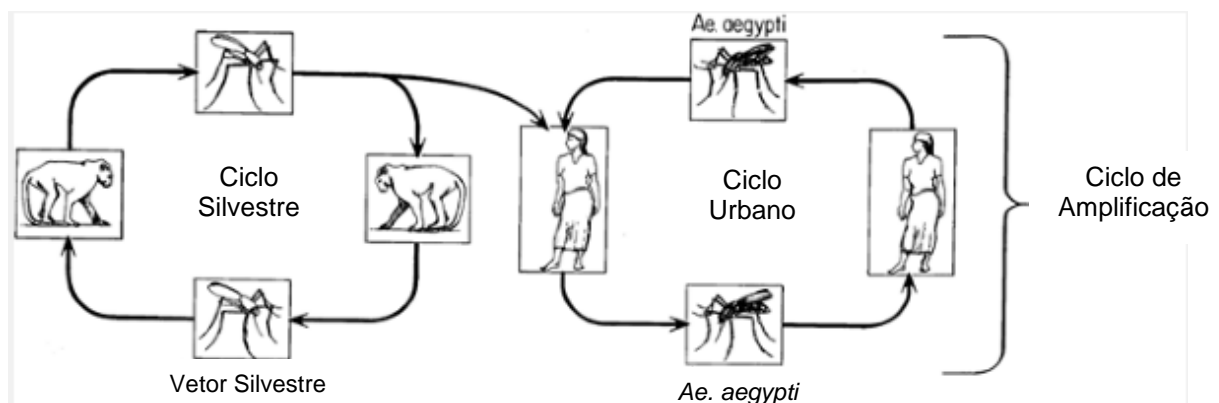
## 1.2- Dengue

O nome dengue significa "melindre", "manha", devido ao estado clínico que o indivíduo pode apresentar após a infecção pelo vírus. O primeiro surto do vírus Dengue ocorreu no final do século XVIII, no Sudoeste Asiático, em Java, e nos Estados Unidos, na Filadélfia. Entretanto, a Organização Mundial de Saúde, só a reconheceu como doença no século XX (WHO, 2012).

As primeiras notificações de febre hemorrágica do dengue aconteceram nos anos 50 nas Filipinas e Tailândia. Já na década de 60, a presença do vírus intensificou-se nas Américas. Foram identificados quatro sorotipos do DENV responsáveis por estas manifestações. Em 1977, o sorotipo 1 apareceu inicialmente na Jamaica, mas foi a partir de 1980 que foram notificadas epidemias em vários países. O sorotipo 2 ocorreu em Cuba causando o primeiro surto de febre hemorrágica fora do Sudoeste Asiático e Pacífico Ocidental. Em 1989 o segundo surto ocorreu na Venezuela. No Brasil, há evidências de epidemias desde 1916, em São Paulo, e em 1923, em Niterói, no Rio de Janeiro, sem comprovação laboratorial (Ministério da Saúde, 2013). Entretanto, a primeira epidemia, documentada clínica e laboratorialmente, ocorreu em 1981, com os sorotipos DENV-1 e DENV-4 em Boa Vista, Estado de Roraima (Osanaí, 1984). Após um período sem surtos, o sorotipo DENV1 invadiu o Sudeste (Rio de Janeiro) e Nordeste (Alagoas, Ceará, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais) em 1986-1987 (Schatzmayr et al. 1986; Donalísio e Glasser, 1999), alastrando-se pelo país desde então, com as entradas dos sorotipos DENV2 em 1990-1991 (Nogueira, 1991), e o DENV3 em 2001-2002 (Lourenco, 2002). O sorotipo DENV-4 foi reintroduzido no Brasil em 2010 no Estado de Roraima (Temporão, 2011). O vírus, então, se espalhou em diferentes regiões do Brasil no norte, nordeste e sudoeste (Ministério da Saúde, 2011). Isolados virais revelaram que o sorotipo 4 reintroduzido em 2010 pertence ao genótipo II (Nunes et al. 2012). No Rio de Janeiro, o primeiro caso detectado de DENV4 ocorreu em Niterói (Nogueira e Eppinghaus, 2011; Castro et al. 2012). Atualmente, os quatro sorotipos circulam simultaneamente no Brasil (Ministério da Saúde, 2011).

Um grande problema de saúde pública nas regiões subtropicais e tropicais, a dengue é provavelmente a mais importante doença viral transmitida por artrópodos em termos de morbidade humana (Henchal e Putnak, 1990). Existem quatro sorotipos distintos, mas estreitamente relacionados, do vírus que causa a dengue (DENV1, DENV2, DENV3, DENV4), com numerosas estirpes de vírus encontradas em todo o mundo (Henchal e Putnak, 1990). A recuperação da infecção por um sorotipo fornece imunidade vitalícia contra esse sorotipo em particular. No entanto, imunidade cruzada para os outros sorotipos após a recuperação é apenas parcial e temporária. Infecções subsequentes por outros sorotipos podem aumentar o risco de desenvolvimento de dengue grave.

A manutenção do vírus dengue ocorre em ciclos florestais envolvendo uma quantidade pequena de primatas e se instalando no mosquito do gênero *Aedes* (Figura 1.5). O vírus dengue, entretanto, são os únicos arbovírus que estão adaptados em humanos e ambientes domésticos, não sendo mais importante o ciclo florestal para a manutenção do vírus (Gubler, 2002).



**Figura 1.5.** Ciclos de transmissão do vírus dengue. Esse vírus possui ciclo de manutenção enzoóticas envolvendo mosquitos e primatas não humanos. Vírus da dengue são transmitidos principalmente entre os seres humanos e o mosquito *Aedes aegypti* que se reproduzem em recipientes de água em ambientes peridomésticos em áreas urbanas e um ciclo silvestre tem sido documentado no sudeste da Ásia e na África Ocidental, mas atualmente é incerto até que ponto esse ciclo contribui para infecções humanas. (adaptado de Burke & Monath, 2001).

No ciclo urbano, a transmissão do vírus para os humanos é intermediada pelos mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente o *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Durante a estação seca o vírus é mantido através da transmissão transovariana entre os mosquitos. Ovos contendo vírus sobrevivem em buracos de árvores secas e dão origem a mosquitos contendo vírus quando eclodem após o retorno das chuvas (Monath, 2001). O *Aedes aegypti* é o principal vetor de transmissão, mas outros

mosquitos da mesma família tal como o *Ae. albopictus* e o *Ae. polynesiensis* também estão associados na propagação do vírus. Dengue ocorre principalmente nas áreas tropicais da Ásia, Oceania, Austrália, África e nas Américas, mas também são descritas nas áreas sub-tropicais na época do verão.

### 1.2.1 - Dados epidemiológicos da Dengue

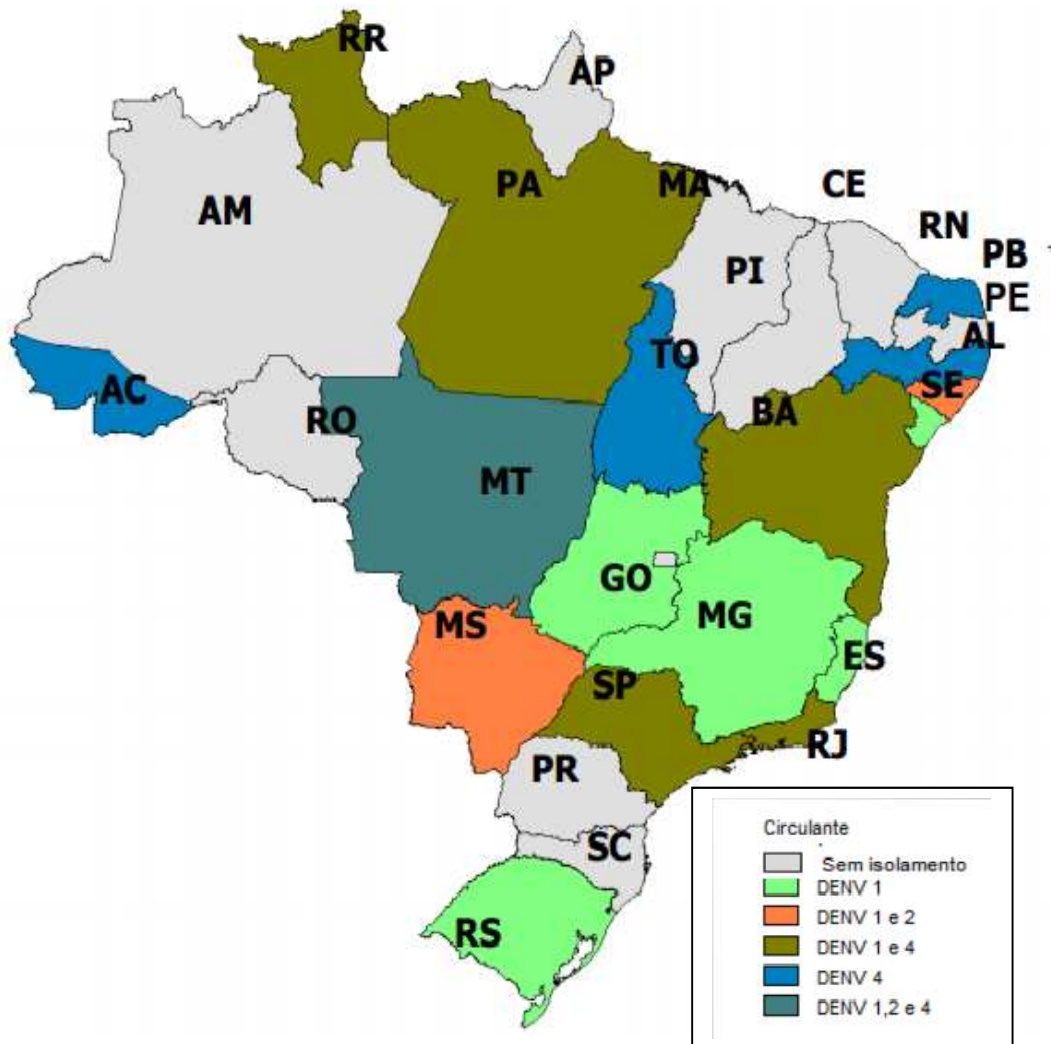
O vírus dengue possui uma distribuição geográfica principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Porém, devido ao aumento dos fatores relacionados ao aquecimento global, aumento na migração populacional e a ineficiência no controle do vetor, proporciona a expansão da distribuição do vírus pelo mundo (Perng, 2011). Estudos epidemiológicos sugerem que cerca de 2,5 bilhões, ou 2/5 da população mundial está em regiões com risco de infecção pelo vírus da dengue, dos quais cerca de um bilhão vivem em regiões tropicais e subtropicais. Estima-se que cerca de 50 milhões de infecções ocorrem anualmente, causando cerca de 500.000 hospitalizações, principalmente em crianças. (Gubler, 1998; Wilder-Smith, 2008, DVI, 2013a-c).

A dengue é um dos maiores problemas de saúde pública do Brasil, onde o vírus da dengue tem como vetor o mosquito *Aedes aegypti*. Este mosquito está adaptado a se reproduzir nos ambientes doméstico e peridoméstico, utilizando-se de recipientes que armazenam água potável e recipientes descartáveis que acumulam água de chuva, comumente encontrados nas cidades (Tauil, 2001; Thammapalo, 2008). A prevenção e controle sustentável da dengue provavelmente vai exigir uma abordagem integrada que inclui vacinação, controle do mosquito e gestão clínica (Gubler, 2011).

A dengue encontra-se hoje presente em todos os 27 Estados do Brasil, distribuída por 3.794 municípios, sendo responsável por cerca de 60% das notificações nas Américas. Na figura 1.6, observa-se os riscos em cada estado brasileiro para apresentar transmissão por um determinado sorotipo de vírus do dengue (SVS, 2012a). A Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde registrou um total de 565.510 casos de dengue no País de janeiro a 17 de novembro de 2012. A Região Sudeste registrou o maior número de casos (241.902 casos; 42,7%), seguida da Região Nordeste (222.432 casos; 39,3%), da Centro-Oeste (58.441 casos; 10,3%), da Norte (38.391 casos; 6,8%) e da Sul (4.344 casos; 1%).

Na análise comparativa em relação ao ano de 2011, observa-se redução de 44% dos casos no País. Apesar da redução da doença, alguns Estados apresentaram aumento na incidência em 2012, como em Roraima variação de 56%, Sergipe 34%, Bahia 30%, Alagoas 239%, Pernambuco 75%, Rio Grande do Norte 19%, Tocantins 17%, Piauí 20%, Rio de Janeiro 11%, Mato Grosso 479%, que também apresentam aumento no número absoluto de casos (Portal Saúde, 2012).

A proporção das amostras positivas por sorotipo viral demonstra o predomínio nos isolamentos do sorotipo DENV4 (59,3%). O sorotipo DENV1 foi isolado em 36,4% das amostras; DENV2, em 4,1%; e o DENV3, em 0,2%. Nas regiões Norte e Nordeste observam-se na amostra um maior predomínio do DENV4. Na Região Sudeste, existe um equilíbrio entre os sorotipos DENV4 e DENV1. Já nas regiões Centro-Oeste e Sul, o predomínio é do DENV1 (SVS, 2012b).



**Figura 1.6.** Incidência dos sorotipos do dengue no Brasil 2012.

Fonte: CGLAB/DEVIT/SVS/MS

### 1.2.2- Manifestações Clínicas do Dengue

Segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde (Henchal & Putnak, 1990) a infecção com o vírus dengue pode ser assintomática ou pode resultar em duas formas de doença: a Febre do Dengue (FD) e a Febre Hemorrágica do Dengue (FHD), que pode evoluir para a Síndrome de Choque do Dengue (SCD). A FD é uma doença febril e geralmente associada a uma infecção primária, muito conhecida como febre dos ossos quebrados (Stephenson, 2005). A FHD é uma síndrome que se caracteriza pelo extravasamento vascular e manifestações hemorrágicas, podendo ser letal. Outras publicações demonstraram que hemorragias, danos no fígado e neurológicos estão associados tanto em FD quanto em FHD (Murgue, 2010). Entretanto, há evidências de que a FHD está mais associada a infecções secundárias do que a infecções primárias, provavelmente devido à pré-existência de anticorpos específicos não neutralizantes contra dengue, o que facilita a entrada de vírus em células da linhagem monocítica (Halstead, 1988). Outra possível explicação para o agravamento da doença em casos de infecções secundárias seria a reatividade cruzada de linfócitos T de memória gerados em uma primeira infecção, que teriam uma ativação preferencial em detrimento de células T virgens. Tal fenômeno tem sido denominado “pecado antigênico original” (Mongkolsapaya, 2003).

Na forma clássica (FD), a febre pode aparecer de forma inesperada ou após alguns sintomas característicos, como mal-estar, calafrios e dor de cabeça. Os sintomas da FHD são parecidos com a forma clássica, diferenciando-se apenas no extravasamento difuso de plasma pelos capilares, hemorragias e trombocitopenia. Esse aumento da permeabilidade vascular resulta na diminuição do volume efetivo de sangue, resultando em hipóxia, podendo levar ao choque e a hipotensão, em alguns casos chegando ao óbito, caracterizando a SCD (Henchal e Putnak, 1990).

Entretanto, uma nova classificação foi postulada em 2009 pela WHO, diferenciando em alguns aspectos para facilitar o diagnóstico de uma infecção viral pelo vírus dengue e pela observação de casos de dengue grave que não se enquadravam às descrições anteriores prescritas anteriormente. Esse novo guia (WHO, 2009 *Apud* Srikiatkachorn et al. 2011) classifica dengue de duas formas: a primeira como dengue e a segunda como dengue grave. A definição de dengue não grave é similar ao que era proposto na antiga classificação de FD: a combinação de dois sinais mais febre. Alguns sinais foram incluídos na nova classificação tal como

dor, náusea, vômito e erupção cutânea. Além disso, dor abdominal, vômito persistente, acúmulo de fluidos, sangramento na mucosa, letargia, inquietação e aumento do fígado estão incluídos nesta lista de sugestões para o diagnóstico de dengue e também como sinal de alerta para um potencial caso de dengue grave. Dengue grave é classificada por qualquer um dos seguintes casos: extravazamento do plasma levando ao choque, dificuldade respiratória, hemorragia grave, trombocitopenia forte, falha de órgãos, níveis elevados de enzimas do fígado, alterações da consciência ou insuficiência cardíaca (Srikiatkachorn, 2009).

O diagnóstico laboratorial do dengue depende do isolamento viral ou de testes sorológicos, já que os sinais clínicos da doença são confundidos com influenza, sarampo, rubéola, malária, leptospirose, outras hemorragias virais e infecção por rickettsia. O isolamento viral pode ser feito com linhagens celulares de mosquitos, por exemplo, células de mosquitos *Aede albopictus* C6/36. Para isso culturas de C6/36 são infectadas e examinadas por imunofluorescência. A técnica de RT-PCR também vem sendo utilizada, com iniciadores sorotipo específicos e análise em gel de agarose das sequências amplificadas. O teste sorológico pode ser testado por inibição da hemaglutinação, fixação do complemento e ELISA. O ELISA é o teste de escolha, devido a sua alta especificidade e sensibilidade, que identifica o anticorpo IgM que aparece logo após o fim da febre e desaparece dentro de dois meses. A identificação do sorotipo é difícil devido às reações cruzadas. (WHO, 2009).

### **1.2.3 - Prevenção e controle da doença**

Devido a fatores como crescimento populacional e urbano, efeito estufa, a incidência e propagação do mosquito *Aedes*, torna-se cada vez mais difícil o controle do mosquito, o qual é o único método de prevenção atualmente. No entanto, este é um artifício caro e ineficiente, uma vez que o *Aedes* está bastante habituado a meios urbanos e a climas tropicais (Chaturvedi, 2005). Para atender de forma mais eficiente à população, o desenvolvimento de uma vacina torna-se muito importante. Existem algumas plataformas de desenvolvimento de vacina contra dengue e algumas delas serão apresentadas nas seções que se seguem (Perng, 2011).



Atualmente, existem seis vacinas tetravalentes candidatas em teste clínico de fase I-III (Swaminatha, 2010; DVI, 2013a).

### 1.2.3.1 – Vacina contra Dengue em Desenvolvimento

Durante o desenvolvimento de uma vacina contra dengue alguns critérios devem ser considerados. A segurança e eficácia da vacina estão intimamente relacionadas à proteção ampla e duradoura contra os quatro sorotipos simultaneamente, ou seja, a vacina deve ser tetravalente e funcional a fim de evitar o risco de sensibilizar o vacinado para as formas graves da doença. É também desejável que a vacina seja econômica e, se possível, induza a imunidade completa com apenas uma dose.

Atualmente, existem vacinas candidatas em estágio de testes clínicos resultantes dos esforços para o desenvolvimento de uma vacina contra dengue focado em vacinas de vírus vivo atenuado, vacinas de vírus inativados, vacina de subunidade e vacinas que utilizam vetores virais ou plasmidiais (Schmitz et al. 2011).

A tabela 1.1 mostra vacinas contra dengue que estão sendo submetidas à testes clínicos e pré-clínicos com possibilidade de chegar à licenciamento.

**Tabela 1.1:** A tabela mostra as principais abordagens e estágios de desenvolvimento de vacina contra dengue (Modificado de Galler et al., 2011).

Vacina	Abordagem	Laboratórios	Andamento
1	Vivo atenuado, células PDK	Mahidol University/Sanofi-Pasteur	Até a fase II/descontinuado
2	Vivo atenuado, células FRhL e PDK	WRAIR/GSK	Até a fase II/descontinuado
3	Vivo atenuado, vetores baseados na cepa YFV-17D	Acambis/Sanofi-Pasteur	Fase III
		FIOCRUZ	Pré-clínico
4	Vivo atenuado, vetor baseado DENV-4Δ30	NIH/Biotec/Butatan/Vabiotech	Fase I e II
5	DENV-2 atenuado, células PDK53	Inviragem	Fase I
6	Sarampo como vetor de expressão	Pasteur Institute	Pré-clínico
7	Vírus inativado	WRAIR/GSK/Fiocruz	Pré-clínico
8	Vacina de sub-unidade	Merck/Hawaii Biotech	Pré-clínico
9	DNA	Naval Medical Research Center.	Fase I

Vacina de vírus vivo atenuado (VVA) tende a mimetizar uma infecção natural, visto que os vírus atenuados replicam-se em células do indivíduo, induzindo resposta humoral e celular, as quais conferem proteção duradoura, geralmente com uma única dose vacinal. O potencial para o desenvolvimento de uma VVA usando cepas atenuadas para os quatro sorotipos do dengue tem sido amplamente utilizado, considerando que este método obteve sucesso para Febre Amarela e Encefalite Japonesa. O primeiro a desenvolver o processo de atenuação para dengue foi Sabin em 1945 passando o vírus DENV-1 em células de cérebro de camundongo (Sabin, 1952 *apud* Raviprakash et al. 2009). Entretanto, o grau de atenuação variava de acordo com a cepa utilizada e alguns voluntários que receberam a vacina desenvolveram reação em forma de erupção cutânea, assim o seu processo foi descontinuado (revisado por Raviprakash et al.2009).

Em 1971 a Universidade do Hawai em colaboração com o WRAIR (Walter Reed Army Institute of Reseach) descobriram que o vírus dengue pode ser propagado em diluições seriadas em células de rim de cachorro (PDK) e uma passagem terminal em células pulmonares de macacos rhesus (FRhL) para atenuar o vírus dengue. (Halstead e Marchette, 2003). Em paralelo, a Universidade de Mahidol (Bangkok, Tailândia), com apoio da OMS seguiu os mesmos passos do primeiro grupo e produziu uma VVA por passagem em células PDK (revisado por Guy e Almond, 2008; Raviprakash et al. 2009).

Estes estudos envolvendo esta metodologia de atenuação por passagem seriada foram descontinuados nos testes clínicos de fase II, devido às complicações envolvendo alta reatogenicidade do vírus tipo 3, além de interferência viral entre os componentes da mistura viral tetravalente (Murphy e Whitehead, 2011; DVI a, 2013).

O desenvolvimento de vacinas inativadas contra dengue utiliza principalmente agentes químicos, como formol ou betapropillactona, para “matar” a partícula viral. Essa metodologia é eficaz devido a propriedade que essas substâncias possuem de degradação do material genético, proporcionando a perda da sua capacidade replicativa. Esta característica gera a necessidade de concentrar os materiais contendo vírus, o que dificulta e encarece muito a produção em massa de vacinas inativadas (Chambers et al. 1997; Murphy e Whitehead, 2011). Entretanto, caso a vacina proporcione boa resposta imunológica estes problemas aventados são ignorados.

Uma vacina inativada está sendo desenvolvida pela Glaxo-SmithKline (GSK), em colaboração com o Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR) e Bio-

Manguinhos (FIOCRUZ) (Putnak, 2005). Diferentes abordagens para inativação de vírus, purificação e vários sistemas adjuvantes estão atualmente em fase de avaliação. Um estudo piloto foi realizado em primatas não humanos (PNH) para testar a vacina candidata tetravalente juntamente com diferentes sistemas adjuvantes (AS01, AS03, AS04). Duas doses de vacina com adjuvante foram dadas com 30 dias de intervalo, seguido por desafio viral quatro meses mais tarde. Todos os animais imunizados foram considerados protegidos contra o desafio viral. As melhores respostas de anticorpos neutralizantes foram obtidas com o sistema adjuvante AS03 (Schmitz et al. 2011).

Desde a descoberta nos anos 90 da habilidade de DNA plasmidial ativar resposta imune celular e humoral contra determinado produto codificado por um gene, alguns grupos têm estudado essa abordagem para o desenvolvimento de vacinas (Danko, 2011). Vacinas de DNA não apresentam as desvantagens associadas com a replicação de vírus vivos, problemas de combinação de formulações monovalentes para formar vacinas tetravalentes, não induzindo assim a concorrência entre sorotipo ou dominância. Dentre as desvantagens associadas às vacinas de DNA destaca-se baixa imunogenicidade em humanos (Murrell et al. 2011). Vacinas de DNA têm tido sucesso limitado devido à absorção inadequada pelas células, resultando em baixa expressão de antígenos. No entanto, algumas vacinas de DNA obtiveram bons resultados em primatas (Raviprakash et al. 2009).

Existem grupos de pesquisa trabalhando no desenvolvimento de vacinas para dengue usando a tecnologia de naked-DNA. Pretende-se criá-las para dengue, seguindo modelo já utilizado para vírus da encefalite de St. Louis (SLE). A estratégia para o preparo dessa vacina consiste em clonar DNA complementar, da região prM e E, do vírus do dengue em plasmídios, produzir esses genes em grande quantidade, purificar o produto e utilizá-los como imunógenos. Camundongos que receberam os genes desenvolveram imunidade com uma ou duas imunizações. Essa imunidade, que, acredita-se, ser de longa duração, é independente de anticorpos, devendo-se principalmente a linfócitos citotóxicos (Chambers et al. 1997).

Outra pesquisa com vacina de DNA para dengue está sendo realizada na FIOCRUZ desenvolvida pela doutora Ada Maria de Barcelos Alves. Este grupo utiliza como alvo algumas proteínas virais, tais como proteína NS1 (Costa et al. 2007), proteína E (Azevedo et al. 2011) e a proteína NS3 (Costa et al. 2011) como indutores de resposta imune em camundongos. Estas vacinas de DNA

encontram-se em fase de desenvolvimento pré-clínico. A Hawaii Biotec em cooperação com a Merck, iniciou testes clínicos fase 1 de uma vacina de subunidade contra dengue. A vacina candidata é composta de proteína E (subunidade 80E) do vírus dengue recombinante que é eficientemente expressa utilizando sistema de expressão *Drosophila Schneider*. A formulação consiste de subunidades 80%E de cada um dos quatro sorotipos de dengue com adjuvante específico resultando em elevadas respostas de anticorpos neutralizantes e proteção em ambos os sistemas estudados, camundongo e PNH (Clements et al. 2010).

Vacina de vírus quiméricos tem sido originada pela substituição de genes que codificam proteínas estruturais, prM e E, de vírus atenuados pelos genes que codificam as proteínas equivalentes de dengue. A hipótese é que a atenuação característica do vírus vetor atenuado garantirá também a atenuação do vírus quimerico, porém mantendo o caráter imunogênico da proteína E de dengue, a qual apresenta um papel dominante na geração de anticorpos neutralizantes e indução de resposta imune protetora.

O desenvolvimento do cDNA infeccioso para DENV4 (Lai et al.1991) permitiu a construção de novos vírus quimericos. Os genes prM/E de DENV1, DENV2 e DENV3 foram inseridos em clone infeccioso de DENV4 resultando em vírus recombinantes com reduzida virulência para camundongo e macaco (Lai et al.1998). O principal risco para o desenvolvimento de vírus recombinantes com o cDNA infeccioso de DENV4 é o fato de que o DENV4 originou-se de um vírus selvagem. Atualmente, a atenuação é realizada através da introdução de uma mutação específica no genoma do vírus que interfere na replicação viral, com esta tecnologia os vírus DENV1 e DENV4 são clones infecciosos gerados por esta mutação, entretanto os vírus DENV2 e DENV3 são vírus quiméricos utilizando o clone infeccioso DENV4 como vetor de expressão das suas proteínas prM/E. (Durbin et al. 2001; Halstead e Marchette, 2003). Essa abordagem esta sendo desenvolvida pelo NIH (National Institute of Health) em parceria com o Instituto Butantan e encontra-se em teste clínico de fase II. Neste trabalho, foi observado que o vírus recombinante foi capaz de induzir resposta trivalente ou mais de anticorpo neutralizante em 75-90% em voluntários com apenas uma dose vacinal (Murrell et al. 2011; Durbin et al. 2013).

Vírus vivos atenuados de sarampo (ie Schwarz / Moraten, AIK-C, e cepas vacinais EZ) têm mostrado excelentes resultados na indução à imunidade de longa duração de crianças após uma ou duas doses de imunização. O vírus vivo atenuado

da cepa da vacina Schwarz de sarampo foi utilizado para codificar o domínio III e/ou ectodomínio M de DENV. A imunização utilizando o vetor viral do sarampo e o reforço com proteína recombinante foi capaz de induzir anticorpos neutralizantes específicos de longo prazo em ratos (Brandler et al.2007). Esta abordagem tem a vantagem de desenvolver uma vacina de combinação de dose única contra infecção com os vírus do sarampo e DENV.

Modificar geneticamente um vírus permite, não apenas, que se possa estudar a estrutura e função dos genes virais, mas também, construir vírus recombinantes que expressem sequências heterólogas. O vírus YFV17D é uma das vacinas utilizadas para construção de vírus recombinantes, até o momento, de maior sucesso, com vários pontos positivos para o desenvolvimento de vacinas em geral. A metodologia de produção é bem definida e eficiente, a qual inclui um rígido controle de qualidade e teste de neurovirulência em macacos. Esta vacina é conhecida também por induzir uma resposta imune duradoura e por ter um custo de produção reduzido. Estima-se que seu uso está acima de 400 milhões de doses com excelentes índices de segurança. Com estas características o vírus YFV17D tornou-se muito atrativo como vetor de expressão para antígenos heterólogos, o que pode levar ao desenvolvimento de novas vacinas vivas atenuadas (Monath, 1999; Bonaldo et al. 2000).

Para o desenvolvimento de flavivírus que expressem antígenos heterólogos é necessário (1) estratégias que permitam a introdução de genes sem que a expressão dos mesmos comprometa a estrutura e replicação do vírus; (2) assegurar que a construção do cDNA e os seus transcritos de RNA produzam um vírus não patogênico, sem o potencial de reversão para forma patogênica; (3) garantir que o vírus da febre amarela recombinante, além de ser atenuado, manterá as suas propriedades imunológicas, expressando o antígeno heterólogo inserido, de modo que o mesmo induza uma resposta imune apropriada.

O primeiro vírus recombinante desenvolvido com o cDNA de 17D-204 (Rice et al. 1989) foi construída por Chambers (1999), onde o genoma do vírus da febre amarela 17D teve os genes prM/E substituídos pelos genes equivalentes derivados de uma cepa do vírus da encefalite japonesa (JE). Este vírus recombinante mostrou-se imunogênico, geneticamente estável e induziu uma proteção eficaz contra JE (Guirakhoo et al. 1999; Monath et al. 2000).

Utilizando esta mesma metodologia, diferentes grupos desenvolveram primeiramente um vírus recombinante 17D/DENV2 envolvendo também a

substituição dos genes prM/E do vírus YFV17D pelos mesmos genes de DENV2 e em seguida os demais vírus DENV1, DENV3 e DENV4. A regeneração dos vírus e passagens subsequentes foram feitas em células certificadas para a produção de vacinas Vero PM (um banco de células do Pasteur-Merriex). Estes vírus recombinantes demonstraram ser imunogênicos em primatas não humanos e camundongos. Esta vacina já foi testada em humanos em uma apresentação monovalente e atualmente está em estudo clínico de fase III em humanos com uma formulação tetravalente (DVI, 2013a).

As firmas Acambis/Sanofi Pasteur estão realizando estudo clínico de Fase 3 (estudo em humanos) com uma formulação tetravalente uma vez que no estudo clínico fase IIb, foi demonstrado que a eficácia difere entre os 4 sorotipos. Entre os sorotipos DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4 observou-se 90%, 94%, 95% e 93% de soroconversão, respectivamente, após 3 doses. Entretanto a quimera DENV2 não induziu proteção, com percentual de apenas 9,2 % de eficácia, após as três doses vacinais. Após um ano da terceira imunização, os níveis de anticorpos neutralizantes mantiveram-se acima dos 70%. (Sabchareon et al.2012).

Na mesma abordagem, Bio-Manguinhos em cooperação com o Instituto Oswaldo Cruz na Fundação Oswaldo Cruz desenvolveu uma vacina tetravalente recombinante contra dengue a partir do clone infeccioso do vírus da febre amarela, linhagem vacinal 17D, baseado na troca dos genes estruturais prM/E de febre amarela pelos de dengue dos diferentes sorotipos.

O primeiro vírus recombinante construído através da manipulação genética do clone infeccioso do vírus YFV17D, foi o vírus YFV/DENV 2 44/3 (Caufour et al. 2001) Este vírus foi obtido utilizando-se a região dos genes prM e E de duas cepas de dengue 2: uma cepa isolada de paciente (44/2) e o vírus protótipo New Guinea C (NGC). O segundo vírus obtido e caracterizado foi a quimera YFV/DENV1 Mir95 (Mateu et al. 2007). Nesse mesmo período obtivemos o vírus recombinante YFV/DENV4 Ven 88. Durante o curso do projeto uma das construções mais difíceis de obter foi o vírus YFV/DENV3.

Durante três anos diversas estratégias foram testadas sem nenhum sucesso. O clone era instável em sistema de clonagem bacteriano, mesmo testando-se diversas cepas de *E.coli*. Iniciou-se então uma colaboração com o grupo do Dr. Ernesto Marques do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz (CPqAM) para construção do vírus quimérico YFV/DENV3 utilizando um sistema de clonagem em levedura. O grupo construiu, não só o clone contendo o genoma do vírus quimérico

YFV/DENV3 BR95016 (PE), mas também 2 outros utilizando cepas de dengue 1 (YFV/DENV1 BR42735 PE) e dengue 2 (YFV/DENV2 BR3808 PE). Além disso foi realizada a construção de dois novos vírus quiméricos YF/DENV3 utilizando duas cepas de vírus dengue 3, H87 e 16562, ambos os vírus isolados de casos de dengue nas Filipinas. Esses resultados abriram uma nova perspectiva para o projeto, aumentando as possibilidades de formulações tetravalentes a serem testadas em PNH. Os vírus utilizados para estas construções e a forma de isolamento seguem descritos abaixo:

**DENV1 BR42735 (DENV-1 PE)** Foi isolado durante uma epidemia em 1997 em Recife (Estado de Pernambuco) de um paciente com caso de dengue clássica. Este vírus pertence ao genótipo V. O isolamento foi feito em uma passagem em cultura de células de mosquito C6/36 e o estoque de trabalho foi preparado em células Vero, alcançando título viral de  $6,75 \log_{10}$  PFU/mL.

**DENV2 NGC** (mouse adapted) - Dengue 2 New Guinea C (NGC, genotype I) genbank AF 038403 isolado em 1944. Vírus passado em cérebro de camundongo e uma passagem em Vero com título de  $5,56 \log_{10}$  PFU/mL.

**DENV2 BR3808 (DENV-2 PE)** originado de um caso humano de dengue clássica, durante uma epidemia em 1995 na cidade de Recife (Estado de Pernambuco). Foi isolado em células de mosquito (C6/36) e passada em células Vero para o preparo do lote de trabalho. Esse vírus pertence ao grupo genótipo III DENV-2 Sudoeste Asiático mais recentemente introduzido nas Américas (Rico-Hesse et al. 1997). O lote de trabalho foi estocado com um título de  $6,8 \log_{10}$  PFU/mL.

**DENV3 H87** é um protótipo isolado em 1956 de um paciente com dengue hemorrágica nas Filipinas (Hammon, 1960) e pertence ao genótipo Sudoeste Asiático/ Pacífico Sul. O número exato de passagens é desconhecido. Na Fiocruz, este foi propagado por três passagens seriadas em cérebro de camundongos e dez passagens sucessivas em células Vero. O lote semente de trabalho destes vírus foi preparado em células Vero ( $7,1 \log_{10}$  PFU/mL).

**DENV3 16562** foi isolado do soro de um caso de dengue hemorrágica nas Filipinas. Pertence ao grupo genótipo II (Sudoeste Asiático/ Pacífico Sul Rico-Hesse, 2003).

Esse vírus foi estabelecido depois de três passagens em BSC-1, quatro em LLC-MK2 e mais duas em *Toxorynchites amboinensis* (Halstead e Marchette, 2003). Este foi também passado em C6/36 cinco vezes. Em Bio-Manguinhos foi passado duas vezes em células Vero para o preparo do lote semente de trabalho ( $7,1 \log_{10}$  PFU/mL).

**DENV3 BR95016 (DENV-3 PE)** foi isolado em células de mosquito C6/36 de um caso de dengue clássica durante uma epidemia em 2002 em Recife. Esse vírus pertence ao genótipo III. O lote semente foi estocado com um título de  $6.9 \log_{10}$  PFU/mL, após passagem em células Vero.

**DENV4 Ven88** esse vírus é oriundo da Venezuela e chegou sob a forma de cDNA, visto que nesta época o DENV-4 não circulava no país.

A tabela 1.2 mostra quais foram as cepas utilizadas para construção dos vírus recombinantes que fazem parte da futura vacina.

A troca dos genes estruturais prM/E do vírus YFV e pelos respectivos genes dos vírus dengue dos 4 sorotipos, gerou uma coleção de 8 vírus quiméricos, dentre elas temos 2 cepas de DENV1, 2 cepas de DENV2, 3 cepas DENV3 e 1 DENV4.

**Tabela 1.2:** Coleção de quiméricos obtidos.

Vírus	Cepa	Genótipo	Sistema de Clonagem		Vírus Quiméricos
Dengue-1	Miranda 95	V	pACNR1180	<i>E. coli</i> DH5α	YFV/DENV1 MIR95
<b>Dengue-1</b>	<b>BR42735(PE)</b>	<b>V</b>	<b>pBSC</b>	<b><i>S. cerevisiae</i></b> <b>RFY206</b>	<b>YFV/DENV1 (PE)</b>
Dengue-2	44/2 e NGC	I	pACNR1180	<i>E. coli</i> XL1-blue	YFV/DENV2 (44/3)
<b>Dengue-2</b>	<b>BR3808(PE)</b>	<b>III</b>	<b>pBSC</b>	<b><i>S. cerevisiae</i></b> <b>RFY206</b>	<b>YFV/DENV2 (PE)</b>
Dengue-3	BR95016(PE)	III	pBSC	<i>S. cerevisiae</i> RFY206	YFV/DENV3 (PE)
<b>Dengue-3</b>	<b>H87</b>	<b>V</b>	<b>pBSC</b>	<b><i>S. cerevisiae</i></b> <b>RFY206</b>	<b>YFV/DENV3 H87</b>
Dengue-3	16562	II	pBSC	<i>S. cerevisiae</i> RFY206	YFV/DENV3 16562
<b>Dengue-4</b>	<b>Venezuela 88</b>	<b>II</b>	<b>pACNR1180</b>	<b><i>E. coli</i> DH5α</b>	<b>YFV/DENV4</b>

Os resultados dos testes monovalentes de imunogenicidade e proteção em PNH foram favoráveis para os vírus: YFV/DENV1 (BR42735), YFV/DENV2 (BR3808), YFV/DENV2 (44/3), YFV/DENV3 (H87) e YFV/DENV3 (16562) e YFV/DENV4 Ven 88. Os vírus YFV/DENV1 Mir95 e YFV/DENV3 (BR95016) não



produziram resultados satisfatórios quanto à imunogenicidade e proteção nos ensaios em primatas não humanos.

Baseados nos testes monovalentes em PNH, selecionamos, então, quatro vírus quiméricos (YFV/DENV1 BR42735, YFV/DENV2 BR3808, YFV/DENV3 H87 e YFV/DENV4 Vem 88) para compor uma formulação tetravalente, que foi testada em PNH com bons resultados de imunogenicidade e proteção. Com este ensaio foi finalizada a prova do princípio da vacina tetravalente recombinante candidata contra dengue.

Este trabalho discorre sobre a caracterização biológica e genética dos vírus quiméricos selecionados para a formulação tetravalente de uma vacina candidata contra dengue. Essa caracterização é de grande importância, considerando-se a necessidade de conhecer esses novos vírus oriundos do processo de construção das quimeras entre duas espécies distintas, porém pertencentes ao mesmo gênero viral, buscando avaliar características fundamentais para a produção de uma vacina, tais como: a viabilidade de produção desses vírus em cultura de células Vero e possibilidade de escalonamento; estabilidade do genoma viral através de passagens sucessivas em células Vero; clonagem viral com o objetivo de obter lotes vacinais mais homogêneos (lotes com caracterização genética e morfológica bem definidos). Todos esses dados serão importantes para decidirmos que vírus utilizar na produção de lotes sementes em Boas Práticas de Fabricação.

## **2- OBJETIVOS**

### 2.1- Geral

Avaliar as características genéticas e biológicas de vírus quiméricos febre amarela/dengue, considerando que é um protótipo vacinal tetravalente contra a dengue.

### 2.2- Objetivos Específicos

O objetivo geral proposto pode ser desmembrado em objetivos específicos, a saber:

1. Avaliar a cinética de produção dos vírus alvo de estudo em células Vero e possibilidade de escalonamento dessa produção;
2. Selecionar os clones virais para produção;
3. Identificar o perfil fenotípico das placas de lise viral provocadas pela infecção dos vírus quiméricos e dos clones derivados;
4. Examinar a estabilidade genética dos vírus quiméricos e clones virais, através do sequenciamento de passagens sucessivas em células Vero;
5. Avaliar a atenuação dos vírus quiméricos, e dos clones virais derivados, através de teste de neurovirulência camundongos;
6. Avaliar proteção dos vírus quimérico YFV/DENV2 (PE) e clones derivados.

### 3- METODOLOGIA

#### 3.1- Cultivo e Manutenção de Células Vero

Vero é uma linhagem certificada (CCL – Certified Cell Line) de células epiteliais de rim de macaco verde africano *Cercopithecus aethiops* adulto normal. Foi obtida da Coleção Americana de Culturas e Depósitos (ATCC, 1994) e pertencem à linhagem CCL-81. Esta linhagem celular é aceita como adequada para a produção e padronização de vacinas e não produz interferon do tipo I, devido a uma deleção cromossomal (ATCC, 2012).

Para a manutenção de células Vero foram utilizados frascos descartáveis de 175 cm<sup>2</sup> em meio de manutenção 199 com sais de Earle completo e incubação em estufa à 37°C. As culturas foram submetidas a passagens semanais e uma parte dessas culturas era destinada ao nosso trabalho. O mesmo procedimento foi realizado para células Vero cultivadas em meio de cultura livre de soro fetal bovino. Para isto, foi utilizado meio sem soro VP-SFM da invitrogen, desenvolvido para essa finalidade. Os procedimentos para confecção dos meios e soluções utilizados nesta dissertação estão no anexo 8.1.

As células foram preparadas para os ensaios com 24 e 48 horas de antecedência dependendo do procedimento a ser realizados. As monocamadas confluentes em frascos de manutenção de 175 cm<sup>2</sup> foram lavadas levemente duas vezes com 5 ml de verseno/tripsina e dissociadas com 0,5 ml dessa solução, após incubação a 37°C por 3 a 5 minutos. As células foram então ressuspensas em 5 a 10ml de cultura 199/Earle completo quando utilizado meio com soro ou inibidor de tripsina para cultura sem soro. O número de células foi estimado por contagem da suspensão celular em câmara de Neubauer. A densidade celular, o meio de cultura, e o tipo de suporte foram definidos pela necessidade de cada experimento. As culturas foram mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.2- Produção de Estoques Virais

Os estoques virais de trabalho (P2 - passagem 2) foram preparados em frascos de 175cm<sup>2</sup> em culturas de células Vero com densidade de 60.000 células/cm<sup>2</sup>. As culturas foram infectadas com a passagem 1 (P1), originada do sobrenadante de transfecção, com m.o.i. (multiplicidade de infecção) de 0,002 e permaneceram em estufa a 37°C por 120 a 144h quando o vírus era recolhido, o que coincidia com a observação do efeito citopático (CPE) moderado. O meio sobrenadante das culturas foi mantido em gelo até que fosse centrifugado a 2.000 rpm por 10 minutos para clarificação (retirada dos fragmentos de degradação celular e células em suspensão). Adicionamos 8% final de sorbitol e as suspensões foram separadas em alíquotas de 0,5 ml e armazenadas em freezer -70°C, devidamente identificadas.

### 3.3-Titulação Viral

A quantificação do título viral foi realizada pela contagem do número de placas de lise produzidas em monocamadas de células Vero, sob meio semi-sólido (199/Earle completo/CMC). Foram utilizadas placas de 24 poços em testes como cinética de crescimento viral e placas de 6 poços em testes mais precisos, como fenótipo de placa, título do inoculo, imunofocus e titulação de estoques virais. Estes suportes foram semeados com células Vero na densidade de 60.000 células/cm<sup>2</sup>, 24h antes do uso. Para a infecção foram feitas diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) da suspensão viral e inoculação da monocamada com 0,1ml de cada diluição com incubação a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub> por 1 hora. Em seguida o inoculo foi aspirado e adicionado 1ml de meio 199/Earle/CMC para placa de 24 poços e 3ml placa de 6 poços para uma incubação de 7 dias em estufa de 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as monocamadas foram fixadas com formaldeído 10% e coradas com cristal violeta 0,04%. As placas de lise presentes em cada diluição foram contadas e o número de unidades formadoras de placa (PFU) por ml de amostra foi calculado. Esse cálculo do título viral foi feito da seguinte forma:

Média do número de placas de lise x diluição correspondente x fator de correção
---

### 3.4- Ensaio de Fenótipo de Placa de Lise por Imunofocus

O ensaio de imunofocus foi utilizado para analisar o fenótipo de placa de lise viral. Placas de 6 poços foram infectadas, para cada vírus, com concentração celular de 60.000cels/cm<sup>2</sup> com 30 PFU por poço e em duplicata. O cálculo para infecção baseou-se nos títulos obtidos da produção dos estoques virais.

A infecção ocorreu com o inoculo de 100 µl da suspensão viral e adsorção por um período de 1h a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Após este tempo o inóculo foi aspirado e a cultura recoberta com meio de cultura semissólido contendo CMC. As culturas foram incubadas por sete dias em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram fixadas com 3mL de solução de formaldeído a 4% por orifício. Após 1 hora à temperatura ambiente, as placas foram lavadas em água corrente até a retirada total do CMC e do formaldeído. Em seguida, foi adicionado 1mL do tampão de bloqueio (2,5% de leite em pó; 0,05% de Tween 20; 0,5% de Triton X-100 diluídos em PBS q.s.p.) em cada orifício e as placas foram deixadas à temperatura ambiente por 15 minutos. O tampão de bloqueio foi então descartado e foi adicionado 0,5mL da solução de anticorpo monoclonal específico para os quatro sorotipos de DENV [(Anti-DENV-1 (D2-1F1-3), Anti-DENV-2 (3H5-1-21), Anti-DENV-3 (D6-8A1-12), Anti-DENV-4 (H241)(1H10-6-7)], provenientes do laboratório de Tecnologia de Anticorpo Monoclonal (LATAM). Os monoclonais foram previamente diluídos em tampão de bloqueio (DENV1-1:50, DENV2-1:100, DENV3-1:200 e DENV4-1:50). As placas foram incubadas por 30 minutos à 37°C e posteriormente foram realizadas três lavagens de cada orifício com 1 ml de PBS T (0,05% de Tween 20 diluído em PBS q.s.p.). O volume de 0,5mL de anticorpo secundário IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase (HRP) previamente diluído em tampão de bloqueio (diluição 1:100) foi adicionado à cada orifício e as placas foram incubadas à 37°C por 30 minutos. Novamente, cada orifício foi lavado três vezes com 1mL de tampão PBS T. Após a lavagem foi preparado a solução de substrato (0,05% de diaminobenzidina; 0,03% de CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O diluídos em Tris-NaCl q.s.p., pH 7,4). Este foi adicionado logo após o seu preparo. As placas permaneceram à temperatura ambiente até a completa visualização dos focos de infecção. Após lavagem em água corrente, as placas foram secas em estufa para a contagem dos focos.

O tamanho de cada placa de lise foi medido no equipamento Biospot que confere uma constante contagem sobre os plaques. Foram calculados o tamanho

médio das placas (expressos em  $1E-3$  mm quadrados) e o desvio padrão para todos os vírus analisados.

### 3.5- Cinética de Replicação Viral em Cultura de Células Vero

Curvas de crescimento viral foram feitas pela infecção de monocamadas de células em frascos de  $175\text{cm}^2$ . A densidade celular utilizada nas culturas a serem infectadas foi de  $60.000$  células/ $\text{cm}^2$  e inoculadas 24hrs após semeadura com moi de  $0,002$ . Durante sete dias amostras de  $200\mu\text{l}$  foram coletadas a cada 24h após a infecção. As amostras colhidas durante a curva de crescimento foram congeladas a  $-70^\circ\text{C}$  e submetidas à titulação viral por ensaio de placa em células Vero. Para os ensaios utilizamos meio de cultura Earle's 199, suplementado com soro fetal bovino.

Para os experimentos realizados em condições livre de soro fetal bovino, utilizamos meio de cultura VP-SFM (Invitrogen), suplementado com Bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) e GLUTAMAX que é um dipeptídeo (L-alanil-L-glutamina).

As curvas de replicação viral em garrafas Cell Factory a densidade celular utilizada foi de  $40.000$  células/ $\text{cm}^2$  e inoculadas 48hrs após semeadura com moi de  $0,002$ .

### 3.6- Determinação da Estabilidade Genética dos Vírus Quiméricos

A determinação da estabilidade genética foi analisada através de passagens sucessivas em culturas de células Vero. Os vírus quiméricos do estoque de trabalho (P2) foram utilizados para infectar culturas de células Vero com densidade celular de  $60.000$  células/ $\text{cm}^2$  e  $\text{moi}=0,002$ . Os vírus obtidos no sobrenadante das culturas, após sete dias, foram utilizados para infectar novas culturas com a mesma densidade celular e  $0,1$  ml de suspensão viral (moi entre  $0,1$  a  $4,8$ ). Esse procedimento foi repetido por até 20 passagens sucessivas. Os vírus obtidos na passagem P2 e P20 tiveram seus genomas seqüenciados completamente.

### 3.7- Sequenciamento Nucleotídico

O sequenciamento nucleotídico foi realizado a partir da extração do material genético viral com kit de extração de RNA Viral Qiagen, segundo o fabricante. Os

procedimentos foram realizados pelo LATER (Laboratório de Tecnologia Recombinante) da VDTEC – BioManguinhos até a entrega dos resultados. O sequenciamento é realizado no equipamento 3500xL Genetic Analyzer utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing seguindo a recomendação do fabricante.

### 3.8- Testes em Animais

#### 3.8.1- Teste de Neurovirulência

Camundongos Suíços Webster (*Mus musculus*) fêmeas, foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da FIOCRUZ, com três semanas de idade e recém-nascidos (neonatos). Todos estes testes estão incluídos no protocolo CEUA (L-021/09) da FIOCRUZ.

Nos testes com camundongos, com três semanas de idade, 16 animais foram utilizados sendo divididos em quatro grupos com quatro animais, foram inoculados pela via intracerebral (i.c.) com  $10^3$  PFU/30 $\mu$ l em cada animal ou não diluído ( $10^0$ ) dependendo do experimento. Já com os camundongos neonatos 10 animais foram utilizados sendo divididos em dois grupos com cinco animais, foram inoculados pela via intracerebral (i.c.) com  $10^3$  PFU/20 $\mu$ l em cada animal. Após o desafio os animais foram observados por 21 dias quanto a presença de sintomas ou morte.

#### 3.8.2- Teste de Proteção

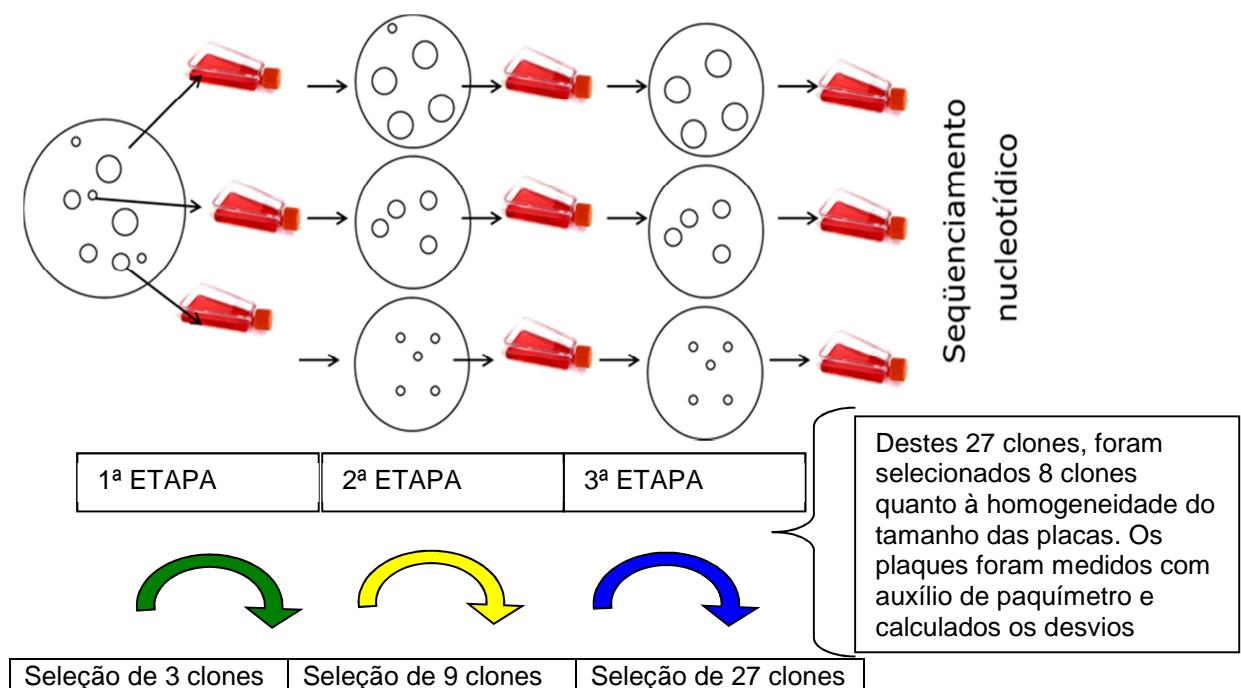
Grupos de 16 camundongos C57/Bl6 foram divididos em oito animais por caixa e imunizados com 100  $\mu$ l de inóculo via coxim-plantar (50 $\mu$ l em cada pata do animal) com seis grupos: G1 – Controle negativo (meio VP-SFM); G2 – YFV/DENV2 (P2); G3 – DENV2WT(PE); G4 – YFV/DENV2A; G5 – YFV/DENV2B; G6 – YFV/DENV2C.

Após 45 dias todos os grupos foram desafiados com o vírus D2 NGC neuroadaptado e observados durante 21 dias quanto à paralisia ou morte (Figura 4.27).

### 3.9- Purificação dos Clones Virais

Culturas de células Vero em placas de 6 poços com 100.00 células/cm<sup>2</sup> foram infectadas com 20 PFU para cada quimera (estoque de trabalho P2) e cobertas com meio sólido (agarose + meio de cultura). Após 7 dias de incubação a 37°C, as placas de lise virais foram evidenciadas com o corante vermelho de fenol, seu conteúdo aspirado (pinçado) com o auxílio de pipeta e colocado em garrafa (T-25cm<sup>2</sup>) contendo culturas de células Vero (60.000 células/cm<sup>2</sup>). O aparecimento de efeito citopático (CPE), entre o 5<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dia, indicava a presença de replicação viral nas culturas de células, quando, então, os sobrenadantes das culturas contendo os vírus replicados, foram recolhidos e estocados a -70°C.

Para todos os vírus quiméricos, foram feitas três etapas de purificação viral (figura 3.1) e em cada uma delas foram extraídos três clones virais, resultando na produção de três clones na primeira etapa, nove clones na segunda e 27 clones na terceira etapa, sendo 16 viáveis. Seleccionamos oito clones para a análise genética e após os resultados seleccionamos três para os estudos desta dissertação.



**Figura 3.1:** Esquema do ensaio de purificação dos clones virais (plaque pick).



### 3.10- Cálculos e Gráficos

Para a análise estatística dos experimentos foi utilizado o software EXCEL que está disponível no Windows. Foram utilizadas as fórmulas já existentes no programa como “CORREL”, para avaliar a correlação existente nas curvas de replicação; “LOG” para a transformação das unidades formadoras de plaque (PFU) em números mais elucidativos; “DESVPAD.P” para calcular o desvio padrão de uma população total determinada como argumento. No Excel também foram feitos os gráficos da curva de replicação viral, fenótipo de placa e do teste de neurovirulência.

O programa Biospot fez as análises do tamanho de plaque de lise dos vírus. Entretanto, o software traz como resultado os valores em LOG da área da circunferência em milímetros quadrados. O primeiro experimento do tamanho de plaque foi realizado anteriormente a aquisição do aparelho, e a unidade do diâmetro descrita em milímetro. Então, para que as medidas tivessem valores comparativos foi realizado um cálculo para achar o diâmetro dos plaques em milímetro. A fórmula criada no EXCEL para este fim foi:  $(=RAIZ((X/3,14)))^2*10)$ , onde x é o valor do anti-log. Entretanto, uma outra fórmula agora deverá ser empregada para calcular o desvio padrão. Embora o EXCEL possua a fórmula para a realização do desvio, tivemos que adicionar outra fórmula para se adequar aos dados que o programa Biospot dispõe. A fórmula foi:  $(=RAIZ((1/N-1)*(\sum(x^2*f)-(\sum(x*f)^2)/n)))$ , onde x é a amostra; f é a frequência que esta amostra se repete; N é o valor total da frequência.

Para a realização dos testes estatísticos do fenótipo de placa de lise foi utilizado o software SPSS para demonstrar a significância da diferença do tamanho entre a quimera P2 e o seu respectivo vírus parental e também dos clones CP2 e CP10. As amostra não são paramétricas e por isso foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para os valores abaixo de 0,05 considera-se que a diferença é significativa, não aceitando a hipótese nula (valores do tamanho de placa de lise são iguais).

## **4- RESULTADOS**

### **4.1- Caracterização Biológica dos Vírus Quiméricos.**

#### **4.1.1- Produção de Estoques Virais**

Nosso grupo obteve uma coleção de oito vírus YFV/DENV (quadro 3.1), os quais foram regenerados a partir de duas cepas de DENV1, duas cepas de DENV2, três de DENV3 e uma de DENV4. Todos esses vírus foram testados em formulações monovalentes quanto à sua imunogenicidade em primatas não humanos. Ao final desse experimento, foram selecionados os vírus quiméricos participantes da formulação tetravalente, a qual foi testada a seguir no mesmo modelo.

A formulação tetravalente contou com os vírus: YFV/DENV1 (PE), YFV/DENV2 (PE), YFV/DENV3 (H87), YFV/DENV4 (Ven88). Todos os vírus induziram algum grau de resposta imune com produção de anticorpos neutralizantes e proteção através da observação da inibição da viremia nos animais vacinados (dados não publicados).

Seguimos, então com caracterização mais detalhada dos vírus participantes da formulação tetravalente. Para garantir reprodutibilidade e continuidade dos nossos estudos, fizemos estoques semente (P1) e de trabalho (P2) dos vírus estudados usando garrafas estacionárias de 175cm<sup>2</sup>, como descrito anteriormente. Após a obtenção dos estoques de trabalho realizamos a titulação viral dos estoques P1 e P2 dos vírus recombinantes e dos vírus parentais. A tabela 4.1 descreve os títulos destes estoques.

**Tabela 4.1:** Título dos estoques virais produzidos em células Vero.

<b>VÍRUS</b>	<b>TÍTULO DO ESTOQUE VIRAL</b> (log <sub>10</sub> PFU/ml) P1	<b>TÍTULO DO ESTOQUE VIRAL</b> (log <sub>10</sub> PFU/ml) P2
YFV17DD	-	6,7
YFV/DENV-1 (PE)	5,75	5,6
YFV/DENV-2 (PE)	6,41	6,6
YFV/DENV-3 (PE)	5,30	5,6
YFV/DENV-3 (H87)	6,90	6,7
YFV/DENV-4 (Ven88)	5,30	5,6
DENV1 (PE)	7,16	7,16
DENV2 (PE)	6,7	6,7
DENV3 (PE)	7,74	7,74

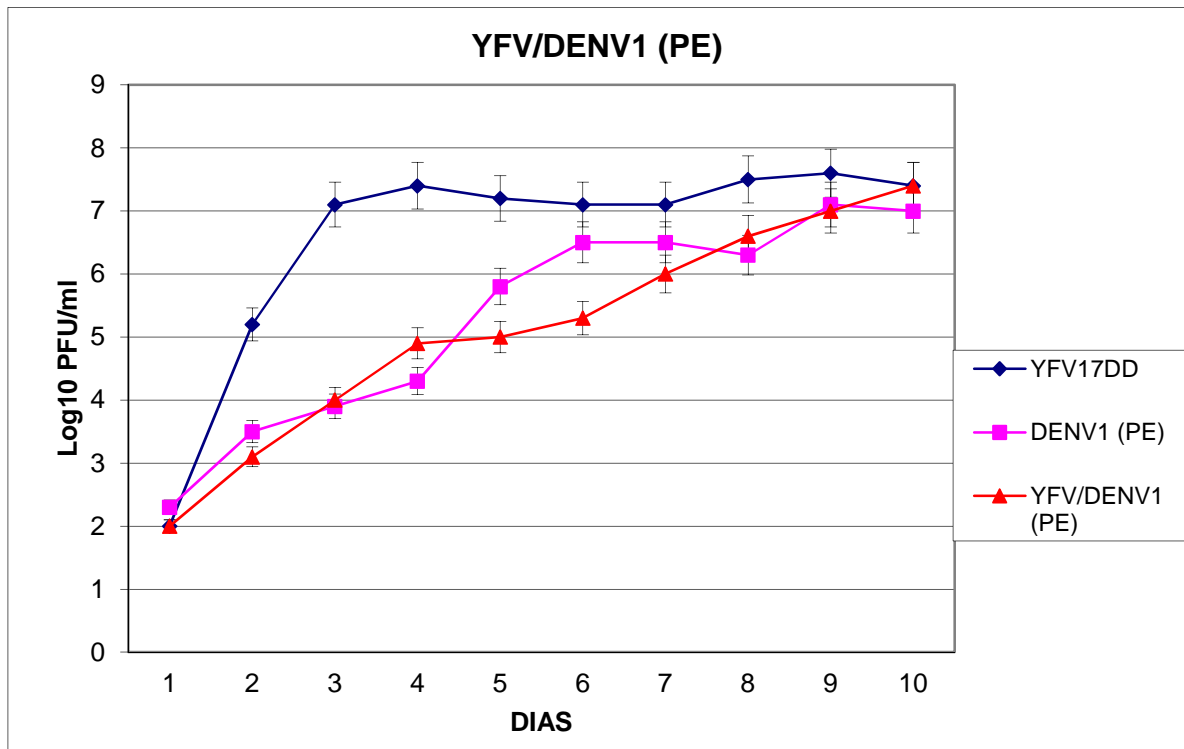
#### **4.1.2- Cinética de Replicação dos Vírus Recombinantes**

A capacidade replicativa dos vírus que se pretende utilizar como vacina viral atenuada, deve ser eficaz em célula certificada para a produção, sob o risco de inviabilizar a abordagem de desenvolvimento.

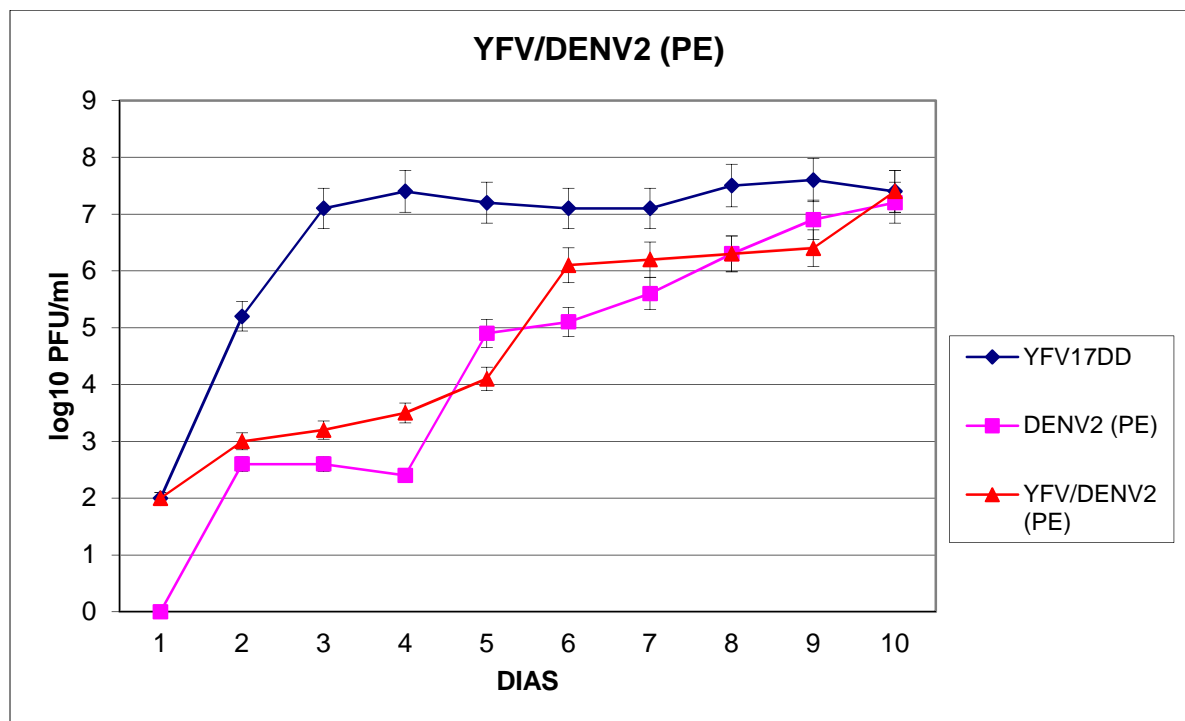
Com o objetivo de avaliar a capacidade replicativa dos vírus quiméricos foram realizadas cinéticas de replicação desses vírus em células Vero. Para tal finalidade, culturas de células Vero foram infectadas e, por dez dias, alíquotas de 200µl recolhidas para posterior titulação.

Os resultados apresentados nas figuras de 4.1 a 4.4 mostram que os vírus quiméricos apresentaram perfil replicativo semelhante ao vírus dengue parental correspondente. O vírus YFV17DD foi utilizado em todos os testes como controle e alcançou pico de crescimento com título de 7,4 log<sub>10</sub>pfu/ml no 4º dia pós-infecção e se manteve até o final do tempo analisado. Nos vírus quiméricos, YFV/DEN1 (PE), YFV/DEN2 (PE), YFV/DEN3 (H87), YFV/DEN4 (Ven88), os títulos encontrados no 4º dia foram de 4,9; 3,5; 6,2 e 4,7 log<sub>10</sub>pfu/ml respectivamente (Figuras 4.1 a 4.4).

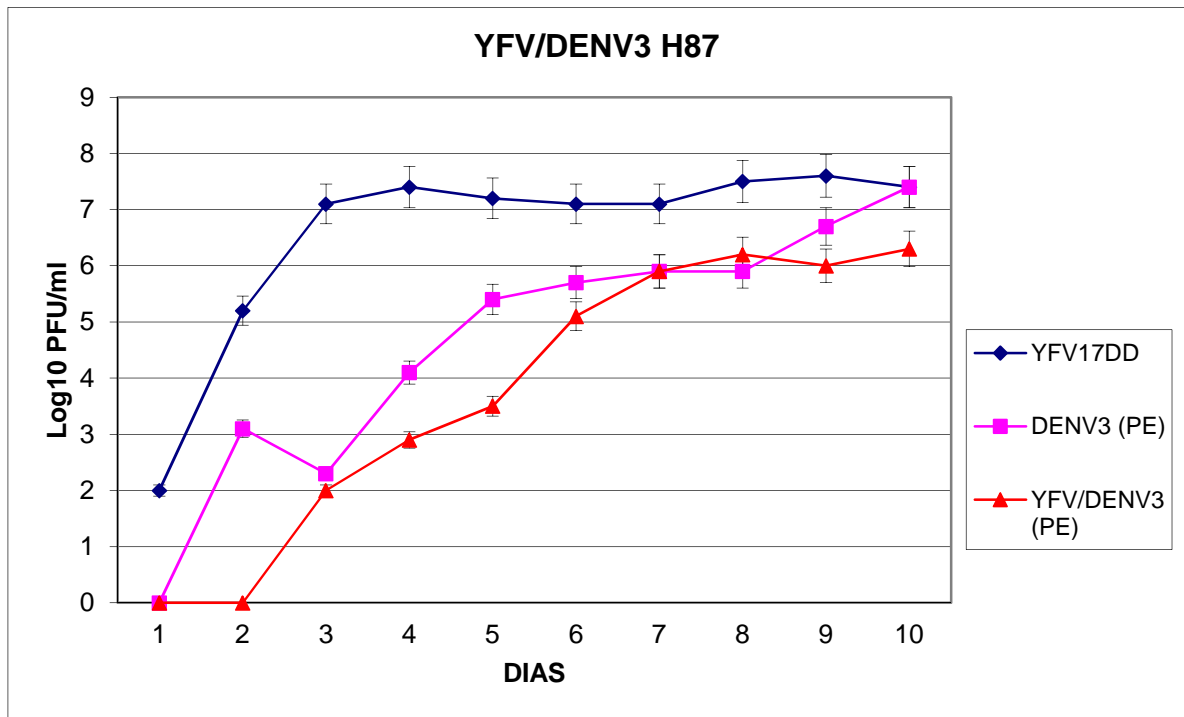
Os vírus quiméricos e os vírus de dengue selvagens têm taxa de replicação um pouco mais lenta quando comparado com o vírus YF17DD, alcançando títulos iguais ou superiores a 7 log<sub>10</sub>pfu/ml somente após o 9º dia pós-infecção (Figura 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4).



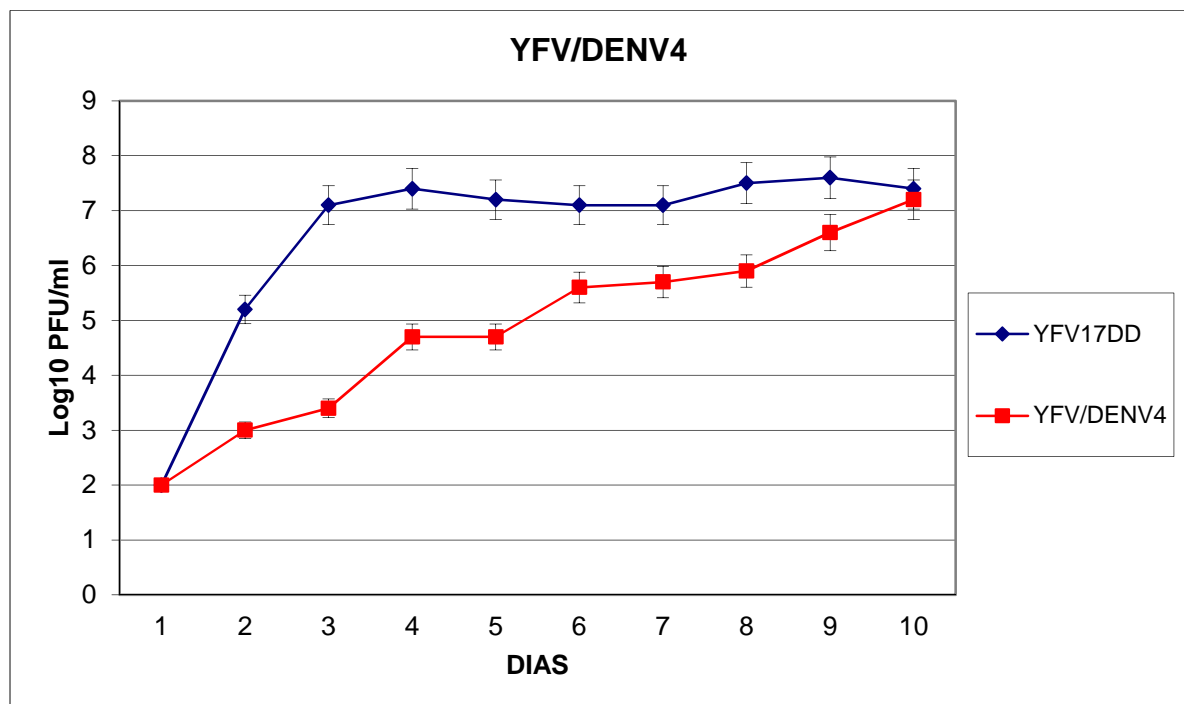
**Figura 4.1:** Cinética de replicação vírus quiméricos. Culturas de células Vero foram infectadas com os vírus: YFV17DD, DENV1 WT (PE), YFV/DENV1(PE). Aliquotas (0,2 ml) foram recolhidas em intervalos sucessivos de 24 h e as amostras congeladas para posterior titulação viral por ensaio de placa em células Vero.



**Figura 4.2:** Cinética de replicação vírus quiméricos. Culturas de células Vero foram infectadas com os vírus: YFV17DD, DENV2 WT (PE), YFV/DENV2(PE). Aliquotas (0,2 ml) foram recolhidas em intervalos sucessivos de 24 h e as amostras congeladas para posterior titulação viral por ensaio de placa em células Vero.



**Figura 4.3:** Cinética de replicação vírus quiméricos. Culturas de células Vero foram infectadas com os vírus: YFV17DD, DENV3 WT (H87), YFV/DENV3(H87). Alíquotas (0,2 ml) foram recolhidas em intervalos sucessivos de 24 h e as amostras congeladas para posterior titulação viral por ensaio de placa em células Vero.



**Figura 4.4:** Cinética de replicação vírus quiméricos. Culturas de células Vero foram infectadas com os vírus: YFV17DD e YFV/DENV4(Ven88). Alíquotas (0,2 ml) foram recolhidas em intervalos sucessivos de 24 h e as amostras congeladas para posterior titulação viral por ensaio de placa em células Vero.

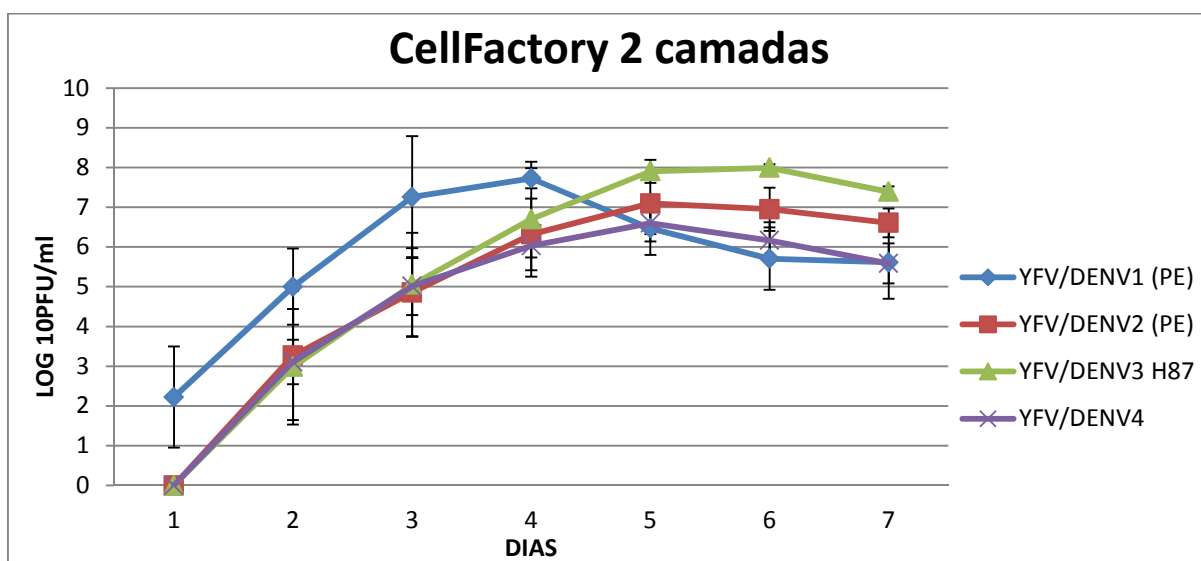
#### 4.1.3- Cinética de Replicação dos Vírus Quiméricos Escala de Produção

A avaliação do escalonamento para a produção de uma vacina é de suma importância para a determinação dos processos produtivos larga escala. O substrato proposto foi o sistema de produção em larga escala Cell Factory (NUNC). É um sistema linear no formato de multi-camadas que permite escalabilidade de cultura celular. Utilizamos Cellfactory de 2, 4 e 10 camadas com área de 632cm<sup>2</sup> por camada para realizar os experimentos de cinética de replicação viral.

Dentro da proposta de estabelecimento das condições de produção, utilizamos meio de cultura sem soro fetal bovino VP-SFM (Invitrogen) suplementado com Glutamax. A replicação dos vírus em células Vero foi acompanhada durante sete dias, com a remoção de alíquotas de 200µl diariamente para posterior titulação.

Para Cellfactory de duas camadas (Figura 4.5) os resultados mostram títulos virais altos, principalmente entre os vírus YFV/DENV1 (PE) e YFV/DENV3 (H87) que alcançaram pico de produção viral próximos a 8 log<sub>10</sub>pfu/ml, no 4º dia e 5 dia, respectivamente.

Os vírus YFV/DENV2 (PE) e YFV/DENV4 apresentaram perfil replicativo menor, quando comparados aos vírus YFV/DENV1 (PE) e YFV/DENV3 H87, tendo como pico máximo, no 5º dia, próximo a 7,0 e 6,5 log<sub>10</sub>pfu/ml para YFV/DENV2 (PE) e YFV/DENV4, respectivamente (Figura 4.5).



**Figura 4.5:** Curvas de replicação em Cell Factory dos vírus quiméricos em meio sem soro. Culturas de células Vero foram infectadas com os vírus YFV/DENV1 (PE), YFV/DENV 2 (PE), YFV/DENV3 H87 e YFV/DENV4. Alíquotas (0,2 ml) foram recolhidas em intervalos sucessivos de 24 h e as amostras congeladas para posterior titulação viral. Foi calculado o desvio padrão com base em três experimentos com os mesmos procedimentos.

Seguimos com o esquema de escalonamento e utilizamos Cell Factories de quatro e dez camadas. Baseado em resultados do ensaio anterior, demonstrando que os pontos do quarto e quinto dia como sendo o de maior título viral, neste ensaio foram colhidas amostras apenas neste período da infecção. Para a Cell Factory de quatro camadas (Tabela 4.2), obtivemos um perfil replicativo levemente superior ao obtido na Cell Factory de duas camadas. O vírus YFV/DENV1 (PE) alcançou pico viral no quarto dia com 7,75 log<sub>10</sub>pfu/ml; YFV/DENV2 (PE), YFV/DENV3 H87 e YFV/DENV4 alcançaram o máximo de produção viral entre o quinto e no sexto dia com títulos na faixa de 7,6; 8,0 e 6,6 log<sub>10</sub>pfu/ml, respectivamente (Tabela 4.2).

Com as Cell Factories de dez camadas (tabela 4.3), os títulos dos vírus quiméricos mostraram-se pouco abaixo dos títulos obtidos em garrafas de duas e quatro camadas. O vírus YFV/DENV1 (PE) ficou 1,0 log<sub>10</sub>pfu/ml menor, enquanto os vírus YFV/DENV2 (PE), YFV/DENV3 H87 e YFV/DENV4 mantiveram pouco menos de 1,0 log abaixo da faixa encontrada anteriormente e em todos os experimentos o *moi* de 0,002 foi mantido.

**Tabela 4.2:** Títulos dos vírus quiméricos em Cellfactory de 4 camadas\*.

Vírus	4º dia**	5º dia**	6º dia**
YFV/DENV1 (PE)	7,756	7,161	6,562
YFV/DENV2 (PE)	–	7,491	7,591
YFV/DENV3 H87	–	7,964	8,021
YFV/DENV4	–	6,574	6,875

\*Foram aliqüotados pontos específicos (4º, 5º e 6º dia pós infecção) das garrafas Cellfactory de quatro camadas dos vírus quiméricos em meio sem soro. Culturas de células Vero foram infectadas com os vírus YFV/DENV1 (PE), YFV/DENV2 (PE), YFV/DENV3 H87 e YFV/DENV4. Aliqüotas (0,2 ml) foram recolhidas diariamente e as amostras congeladas para titulação viral por ensaio de placa em células Vero.

\*\*Resultado representa média de três ensaios.

**Tabela 4.3:** Títulos dos vírus quiméricos em Cellfactory de 10 camadas\*.

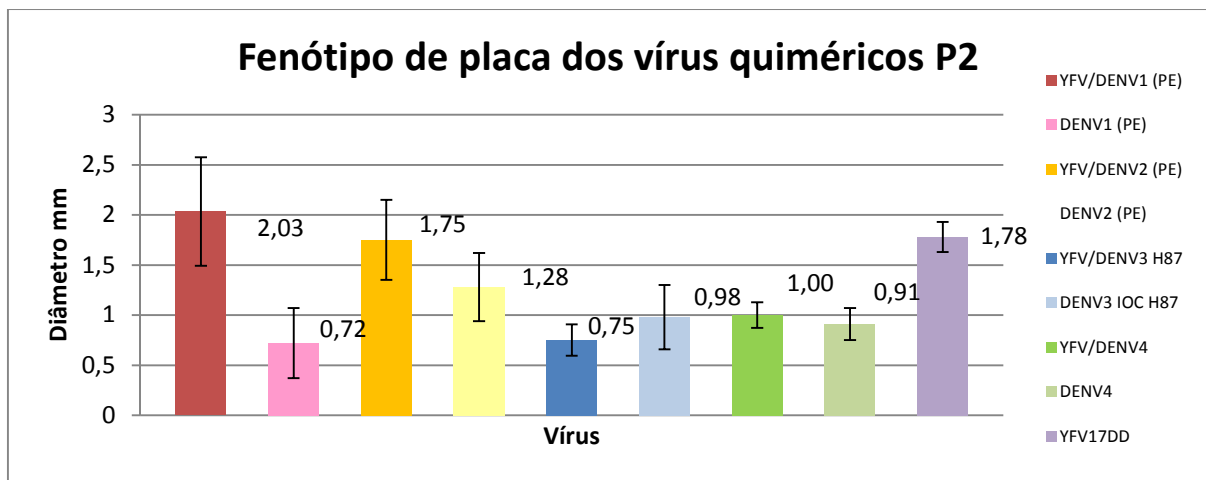
Vírus	4º dia**	5º dia**
YFV/DENV1 (PE)	6,35	4,70
YFV/DENV2 (PE)	6,70	7,20
YFV/DENV3 H87	–	7,10
YFV/DENV4	–	6,10

\* Foram aliqüotados pontos específicos (4º e 5º dia pós- infecção) das garrafas Cellfactory de dez camadas dos vírus quiméricos em meio sem soro. Culturas de células Vero foram infectadas com os vírus YFV/DENV1 (PE), YFV/DENV2 (PE), YFV/DENV3 H87 e YFV/DENV4. Aliqüotas (0,2 ml) foram recolhidas diariamente e as amostras congeladas para titulação viral por ensaio de placa em células Vero.

\*\*Resultado representa média de dois ensaios.

#### 4.1.4- Fenótipo de Placa de Lise Viral

Os vírus quiméricos foram caracterizados pelo tamanho de placa de lise produzida por infecção de células Vero em cultura cobertas com meio de cultura semi-sólido (CMC), após infecção com 20 PFU/placa. As placas de lise foram reveladas pela técnica de imunofocus (M&M 3.4). As quimeras foram comparadas com seus respectivos vírus parentais YFV e DENV. Os vírus YFV/DENV1 e YFV/DENV2 apresentam um fenótipo de placa grande em células Vero (~2,03 e ~1,75mm, respectivamente), enquanto que o vírus YFV/DENV4, DENV2 (PE), DENV3 (H87) e DENV4 com plaqueamento médio (~1,0; ~1,28; ~0,98 e ~0,91mm, respectivamente). Os vírus recombinantes YFV/DENV3 (H87) e DENV1 (PE) produziram tamanhos pequenos de placas de lise (~0,75 e ~0,72mm, respectivamente). Todos os resultados apontam para um valor significativo (<0,05) para a diferença dos tamanhos de placa de lise entre os vírus quiméricos e os respectivos vírus parentais (Tabela 4.4).



**Figura 4.6:** Fenótipo de placa de lise. Os vírus foram inoculados em placas de 6 poços com 20 PFU/poço e revelados por imunofocus. Para aferir os tamanhos dos plaques foi utilizado o equipamento Biospot. n=20.

**Tabela 4.4:** Significância estatística entre o tamanho de placa de lise dos vírus quiméricos e parentais.

Relação entre os Vírus		Teste Mann-Whitney
YFV/DENV1 (PE) P2	x DENV1 (PE)	<b>0,000</b>
YFV/DENV2 (PE) P2	x DENV2 (PE)	<b>0,000</b>
YFV/DENV3 H87 P2	x DENV3 IOC H87	<b>0,000</b>
YFV/DENV4	x DENV4	<b>0,001</b>



#### 4.2- Estabilidade Genética de vírus não clonado

A estabilidade do genoma viral ao longo de sucessivas passagens em células Vero foi avaliada.

Os vírus quimericos YFV/DENV1 (PE), YFV/DENV2 (PE), YFV/DENV3 (H87), YFV/DENV4 (Ven88), foram submetidos a 20 passagens sucessivas em culturas de células Vero a partir da passagem 2 (P2- estoque de trabalho), mantendo constante o volume do inóculo (0,1 ml). Os sobrenadantes das passagens foram estocados em freezer -70°C. O RNA foi extraído, seguido pelo RT-PCR e sequenciamento nucleotídico. O DNA complementar ao RNA genômico dos vírus presentes no sobrenadante da última passagem (P20) e do nosso estoque de trabalho (P2) foram sequenciados completamente. Não foi possível sequenciar o vírus YFV/DENV1 (PE) na passagem P20 devido ao não anelamento dos primers nas regiões de PrM e E. As sequências nucleotídicas obtidas foram analisadas para a identificação de eventuais mutações.

No vírus YFV/DENV2 (PE) foram encontradas 80 mutações nucleotídicas, nas quais predominam mutações silenciosas, nas regiões de prM e envelope. Entretanto, entre as 80 mutações, 16 geraram mudança de aminoácido como mostrado no quadro 4.1. Entre essas mutações, sete levam à mudança de aminoácido sem alterar o caráter de físico-químico<sup>1</sup> e nove causaram a troca de aminoácido alterando o caráter físico-químico do mesmo (grifadas na tabela 4.5 em amarelo) (Tabela 4.5).

No vírus YFV/DENV3 (H87) encontramos cinco mutações silenciosas, uma alteração que não altera o caráter do aminoácido (leucina – valina) e uma mutação que modifica o caráter polar com carga negativa (ácido aspártico) para polar sem carga (asparagina). Encontramos duas mutações, entre a passagem 2 e a passagem 20 no vírus YFV/DENV4, ambas na região prM. A alteração de Lisina para ácido glutâmico modifica a classificação do aminoácido, ou seja, de um aminoácido polar de carga positiva (básico) para um polar de carga negativa (ácido). A segunda alteração não modificou o caráter do aminoácido (Tabela 4.6).

---

<sup>1</sup> Segundo o caráter físico-químico os aminoácidos podem ser divididos em: hidrofóbicos, polares, apolares, de cadeia lateral pequena, ácidos e básicos.

**Tabela 4.5:** Estabilidade genética do vírus quimérico YFV/DENV2 (PE): comparação das sequências nucleotídicas e de aminoácido, entre as passagens P2 e P20\*.

YFV/DENV2 (PE)			
GENE	Posição SEQ	Alteração Nucleotídica	Alteração Aminoácido
prM	484	P2 C→T P20	-
prM	488	P2 T→C P20	-
prM	490	P2 A→G P20	-
prM	499	P2 T→C P20	-
prM	502	P2 T→C P20	-
prM	523	P2 T→C P20	-
prM	524	P2 G→A P20	G <sub>prM-14</sub> S
prM	529	P2 G→A P20	-
prM	574	P2 C→G P20	-
prM	583	P2 C→T P20	-
prM	598	P2 A→G P20	I <sub>prM-38</sub> M
prM	643	P2 C→T P20	-
prM	646	P2 C→T P20	-
prM	655	P2 A→G P20	-
prM	718	P2 A→G P20	-
prM	781	P2 T→A P20	-
prM	796	P2 A→G P20	-
prM	840	P2 T→C P20	V <sub>prM-120</sub> A
prM	841	P2 T→C P20	-
prM	856	P2 C→T P20	-
prM	881	P2 G→A P20	-
prM	934	P2 G→A P20	-
prM	938	P2 T→C P20	-
prM	985	P2 C→T P20	-
prM	1012	P2 C→T P20	-
prM	1066	P2 T→C P20	-
prM	1090	P2 T→C P20	-
E	1165	P2 A→G P20	-
E	1180	P2 T→C P20	-
E	1198	P2 T→C P20	-
E	1213	P2 G→A P20	-
E	1222	P2 T→C P20	-
E	1250	P2 A→G P20	I <sub>E-90</sub> V
E	1270	P2 A→G P20	-
E	1350	P2 G→A P20	S <sub>E-122</sub> N
E	1370	P2 T→A P20	L <sub>E-130</sub> Q
E	1371	P2 G→A P20	-
E	1381	P2 T→C P20	-
E	1382	P2 C→T P20	-
E	1396	P2 C→T P20	-
E	1417	P2 A→G P20	-
E	1426	P2 C→T P20	-
E	1429	P2 T→A P20	-
E	1432	P2 A→C P20	-
E	1435	P2 T→A P20	-
E	1457	P2 G→A P20	E <sub>E-159</sub> K
E	1501	P2 A→G P20	-
E	1502	P2 C→T P20	-
E	1571	P2 C→T P20	-
E	1579	P2 G→A P20	-
E	1586	P2 G→A P20	-

YFV/DENV2 (PE)			
GENE	Posição SEQ	Alteração Nucleotídica	Alteração Aminoácido
E	1588	P2 G→T P20	<b>E</b> <sub>E-202</sub> <b>Q</b>
E	1633	P2 A→G P20	-
E	1642	P2 A→G P20	-
E	1711	P2 C→T P20	-
E	1729	P2 C→T P20	-
E	1738	P2 A→G P20	-
E	1744	P2 T→C P20	-
E	1762	P2 C→T P20	-
E	1765	P2 G→A P20	-
E	1768	P2 G→A P20	-
E	1817	P2 A→M P20	<b>T</b> <sub>E-279</sub> <b>P/T</b>
E	2053	P2 G→A P20	-
E	2131	P2 G→T P20	-
E	2138	P2 C→T P20	-
E	2170	P2 C→T P20	-
E	2189	P2 G→A P20	<b>A</b> <sub>E-403</sub> <b>T</b>
E	2242	P2 T→C P20	-
E	2326	P2 C→T P20	-
E	2428	P2 A→G P20	-
E	2439	P2 C→T P20	-
E	2451	P2 C→T P20	A <sub>E-490</sub> V
E	2459	P2 C→G P20	-
E	2460	P2 A→G P20	<b>Q</b> <sub>E-493</sub> <b>G</b>
E	2461	P2 G→C P20	-
E	2464	P2 T→C P20	-
NS2B	4476	P2 A→G P20	<b>D</b> <sub>NS2b-94</sub> <b>G</b>
NS2B	4497	P2 T→K P20	<b>L</b> <sub>NS2b-101</sub> <b>R/L</b>
NS5	8513	P2 Y→T P20	<b>H/Y</b> <sub>NS5-288</sub> <b>Y</b>
NS5	9380	P2 T→G P20	<b>L</b> <sub>NS5-577</sub> <b>V</b>

\* As letras grifadas indicam mutações não conservativas.

**Tabela 4.6:** Estabilidade genética dos vírus quiméricos YFV/DENV3 H87 e YFV/DENV4: comparação das sequências nucleotídicas e de aminoácido, entre as passagens P2 e P20\*.

YFV/DENV3 H87			
GENE	Posição SEQ	Alteração Nucleotídica	Alteração Aminoácido
E	2147	P2 T→C P20	-
E	2481	P2 A→T P20	-
NS2B	4587	P2 G→A P20	<b>D</b> <sub>NS2b-131</sub> <b>N</b>
NS5	7913	P2 C→T P20	-
NS5	8075	P2 C→T P20	-
NS5	9329	P2 G→A P20	-
NS5	9492	P2 T→G P20	L <sub>NS5-616</sub> V
YFV/DENV4			
GENE	Posição SEQ	Alteração Nucleotídica	Alteração Aminoácido
PrM	756	P2 A→G P20	<b>K</b> <sub>prM-90</sub> <b>E</b>
PrM	782	P2 A→C P20	E <sub>prM-99</sub> D

\* As letras grifadas indicam mutações não conservativas.

### 4.3- Purificação Viral e Caracterização Biológica dos Vírus Clonados.

#### 4.3.1- Seleção dos Clones

Com a finalidade de estabelecermos sementes virais geneticamente mais homogêneas e estáveis, iniciamos a seleção clonal dos vírus quiméricos através da técnica de “plaque pick”, ou pinçamento de um clone viral a partir de uma placa de lise originada de uma única partícula viral. Este procedimento teve como ponto de partida as observações do sequenciamento da estabilidade genética (P2 x P20) da quimera YFV/DENV2, que demonstrou um alto número de mutações. Outro ponto importante foi a observação de diferentes fenótipos de placa de lise nas quimeras de YFV/DENV1 e 2, os quais são visualizados através do desvio-padrão que é maior em comparação com YFV/DENV3 e 4.

Após a seleção dos clones através de três rodadas da técnica de plaque pick, descrita em Material e Métodos, dos 27 clones, quatro clones de cada um dos vírus quiméricos foram utilizados para o sequenciamento dos genes prM e E. Os resultados obtidos foram comparados com o banco de dados do sequenciamento do lote de trabalho (P2) na mesma região.

Os quatro clones originados do vírus YFV/DENV2 (PE) foram geneticamente idênticos na região estudada (4/4). São eles os clones: YFV/DENV2 (PE) /L-32211, YFV/DENV2(PE)/L-32212; YFV/DENV2(PE)/L-32222 YFV/DENV2(PE)/M-3232.

Para os vírus YFV/DENV1 (PE) e YFV/DENV3 (H87) foi necessário sequenciar clones adicionais para a obtenção de pelo menos três clones virais idênticos à passagem 2 de cada vírus. Dos sete clones analisados para YFV/DENV1 (PE), três clones foram idênticos geneticamente à passagem P2 (3/7), embora na posição 1590 de três clones tenha ocorrido uma alteração conservativa (lisina→arginina). Uma vez que estes aminoácidos tem tamanhos diferentes, esta alteração poderia influenciar na configuração proteica. Em um dos clones (M-3234) houve uma mutação silenciosa (posição 2308; Tabela 4.7).

**Tabela 4.7:** Sequenciamento das regiões prM/E dos clones virais de YFV/DENV1(PE).

YFV/DENV1 (PE)				
Vírus Clone	GENE	Posição SEQ	Alteração Nucleotídica	Alteração aminoácido
YFV/DENV1(PE) L-3223	E	1590	-	-
	E	2308	-	-
YFV/DENV1(PE) S-3211	E	1590	P2 A→G CLONE	K <sub>E-204</sub> R
	E	2308	-	-
YFV/DENV1(PE) S-3213	E	1590	P2 A→G CLONE	K <sub>E-204</sub> R
	E	2308	-	-
YFV/DENV1(PE) S-3214	E	1590	P2 A→G CLONE	K <sub>E-204</sub> R
	E	2308	-	-
YFV/DENV1(PE) M-3234	E	1590	-	-
	E	2308	P2 A→G CLONE	-
YFV/DENV1(PE) M-3211	E	1590	-	-
	E	2308	-	-
YFV/DENV1(PE) L-3224	E	1590	-	-
	E	2308	-	-

A quimera YFV/DENV4 originou três de quatro clones (3/4) sem alteração nucleotídica. A alteração do clone YFV/DENV4 M-32334 gerou mudança de aminoácido metionina para valina, ambos são apolares (hidrofóbicos) (Tabela 4.8).

**Tabela 4.8:** Sequenciamento das regiões prM/E dos clones virais de YFV/DENV4.

YFV/DENV4				
Vírus Clone	GENE	Posição SEQ	Alteração Nucleotídica	Alteração aminoácido
YFV/DENV4 M-32113	prM	559	-	-
	E	1946	-	-
YFV/DENV4 M-32211	prM	559	-	-
	E	1946	-	-
YFV/DENV4 M-32233	prM	559	-	-
	E	1946	-	-
YFV/DENV4 M-32334	prM	559	P2 T→C CLONE	-
	E	1946	P2 A→G CLONE	M <sub>E-322</sub> V

Foram sequenciados oito clones originados da passagem 2 do vírus YFV/DENV3 H87, entretanto, nenhum foi idêntico ao vírus original. Todos os clones mostraram alteração na posição 2363 que corresponde à mudança de aminoácido em P2 (T<sub>E-461</sub> S) de treonina para serina, aminoácidos com o mesmo caráter (polar); e uma mutação silenciosa na posição 2029. As mutações encontradas no vírus YFV/DENV3 H87 estão descritas na tabela 4.9.

**Tabela 4.9:** Sequenciamento das regiões prM/E dos clones virais de YFV/DENV3 H87.

YFV/DENV3 H87				
Vírus Clone	GENE	Posição SEQ	Alteração Nucleotídica	Alteração aminoácido
YFV/DENV3 H87 S-32121	E	1520	P2 C→T CLONE	-
	E	2029	P2 T→C CLONE	-
	E	2363	P2 A→T CLONE	T <sub>E-461</sub> S
YFV/DENV3 H87 S-32211	E	2029	P2 T→C CLONE	-
	E	2363	P2 A→T CLONE	T <sub>E-461</sub> S
YFV/DENV3 H87 S-32212	E	2029	P2 T→C CLONE	-
	E	2363	P2 A→T CLONE	T <sub>E-461</sub> S
YFV/DENV3 H87 S-32213	E	2029	P2 T→C CLONE	-
	E	2363	P2 A→T CLONE	T <sub>E-461</sub> S
YFV/DENV3 H87 S-32214	E	2029	P2 T→C CLONE	-
	E	2363	P2 A→T CLONE	T <sub>E-461</sub> S
YFV/DENV3 H87 S-32311	E	2029	P2 T→C CLONE	-
	E	2363	P2 A→T CLONE	T <sub>E-461</sub> S
YFV/DENV3 H87 S-32312	E	2029	P2 T→C CLONE	-
	E	2363	P2 A→T CLONE	T <sub>E-461</sub> S
YFV/DENV3 H87 S-32333	E	2029	P2 T→C CLONE	-
	E	2363	P2 A→T CLONE	T <sub>E-461</sub> S

Após a análise da primeira etapa de sequenciamento, os clones virais tiveram o genoma sequenciado completamente para avaliar se eram estáveis geneticamente ao longo das etapas de propagação em monocamada de célula Vero. Os resultados abaixo foram comparados com o genoma viral da quimera do lote P2 que originou cada clone e indicam algumas mudanças nucleotídicas entre a passagem P2 e CP2, com exceção dos clones YFV/DENV4A e YFV/DENV4B originados de YFV/DENV4 que permaneceram estáveis. As mutações existentes foram silenciosas ou conservativas. Essas mutações estão detalhadas na figura 4.7 e na tabela 4.10.

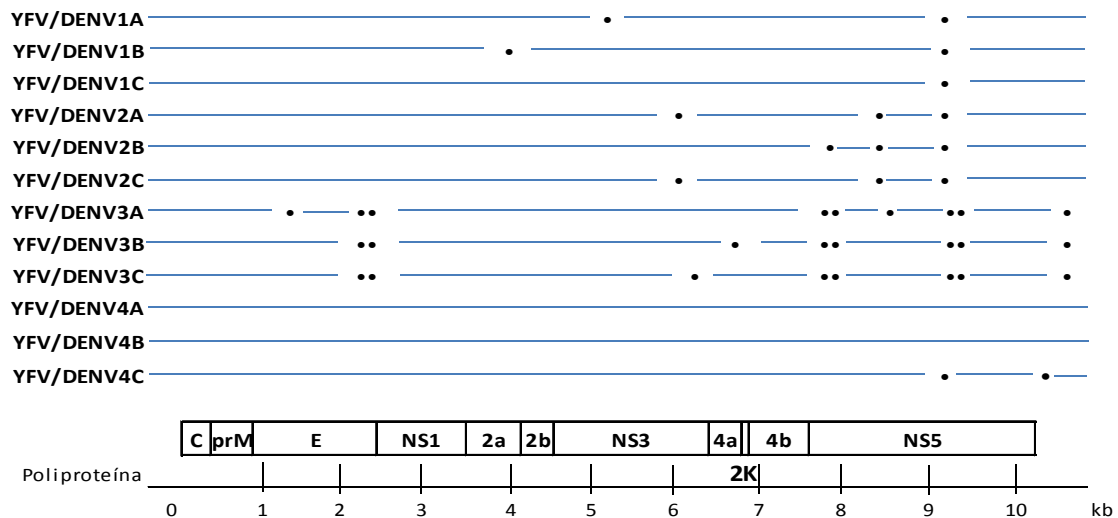
**Figura 4.7:** Representação dos pontos de mutação dos clones ao longo do genoma viral. Observamos uma maior concentração de mutações nas regiões não estruturais da poliproteína, principalmente na região NS5.

Tabela 4.10. Pontos de mutação no genoma dos vírus nas passagens CP2.

Sequenciamento dos vírus quiméricos P2 e CP2				
Vírus	GENE	Posição SEQ	Alteração Nucleotídica	Alteração aminoácido
YFV/DENV1 L#3223	NS2A	3997	P2 T→C CP2	-
	NS5	9380	P2 T→G CP2	L <sub>NS5-577</sub> V
YFV/DENV1 M#3211	NS3	5350	P2 C→T CP2	-
	NS5	9380	P2 T→G CP2	L <sub>NS5-577</sub> V
YFV/DENV1 L#3224	NS5	9380	P2 T→G CP2	L <sub>NS5-577</sub> V
YFV/DENV2 M#3232	NS5	7948	P2 C→T CP2	-
	NS5	8513	P2 C/T→T CP2	H/T <sub>NS5-288</sub> Y
	NS5	9380	P2 T→G CP2	L <sub>NS5-577</sub> V
YFV/DENV2 L#32211	NS3	6037	P2 T→C CP2	-
	NS5	8513	P2 C/T→T CP2	H/T <sub>NS5-288</sub> Y
	NS5	9380	P2 T→G CP2	L <sub>NS5-577</sub> V
YFV/DENV2 L#32222	NS3	6037	P2 C→T CP2	-
	NS5	8513	P2 C/T→T CP2	H/T <sub>NS5-288</sub> Y
	NS5	9380	P2 T→G CP2	L <sub>NS5-577</sub> V
YFV/DENV3 S#32121	E	1520	P2 C→T CP2	-
	E	2029	P2 T→C CP2	-
	E	2363	P2 A→T CP2	T <sub>E-461</sub> S
	NS5	7795	P2C→ T CP2	-
	NS5	7957	P2 C→ T CP2	-
	NS5	8569	P2 C→T CP2	-
	NS5	9211	P2 G→A CP2	-
	NS5	9374	P2 T→G CP2	L <sub>NS5-577</sub> V
YFV/DENV3 S#32312	UTR	10630	P2 C→T CP2	-
	E	2029	P2 T→C CP2	-
	E	2363	P2 A→T CP2	T <sub>E-461</sub> S
	NS4A	6772	P2 C→T CP2	-
	NS5	7795	P2 C→T CP2	-
	NS5	7957	P2 C→T CP2	-
	NS5	9211	P2 G→A CP2	-
	NS5	9374	P2 T→G CP2	L <sub>NS5-577</sub> V
YFV/DENV3 S#32213	UTR	10630	P2 C→T CP2	-
	E	2029	P2 T→C CP2	-
	E	2363	P2 A→T CP2	T <sub>E-461</sub> S
	NS3	6129	P2 C→T CP2	T <sub>NS3-517</sub> I
	NS5	7795	P2 C→T CP2	-
	NS5	7957	P2 C→T CP2	-
	NS5	9211	P2 G→A CP2	-
	NS5	9374	P2 T→G CP2	L <sub>NS5-577</sub> V
YFV/DENV4 M#32231	-	-	-	-
YFV/DENV4 L#32233	-	-	-	-
YFV/DENV4 L#32113	UTR	10331	P2 T→C CP2	S <sub>UTR-14</sub> P

Assim para seguirmos com os estudos e mantermos a reprodutibilidade dos testes, fizemos um estoque de trabalho com estes clones selecionados que está descrito no item 4.3.2.

### 4.3.2- Produção de Estoques Virais Clonados

A partir dos resultados do sequenciamento nucleotídico foi possível fazer uma seleção dos clones que inicialmente mostraram ser mais estáveis geneticamente entre a P2 e a CP2. Fizemos um estoque de trabalho para prosseguir, então, com a caracterização fenotípica (tamanho de placa de lise) e molecular (sequenciamento do genoma completo) e com os estudos de imunogenicidade e neurovirulência em modelo murino.

A partir da seleção clonal foi produzido um novo estoque de trabalho. O resultado da titulação dos estoques virais está descrito na tabela 4.11. Para todos os clones selecionados foi realizada mais uma passagem em célula Vero para aumentar o volume das amostras. Esses clones foram produzidos em células Vero adaptadas ao crescimento em meio de cultura livre de soro fetal bovino (VP-SFM com glutamax). Para facilitar, alteramos a nomenclatura dos clones, de acordo com a tabela abaixo.

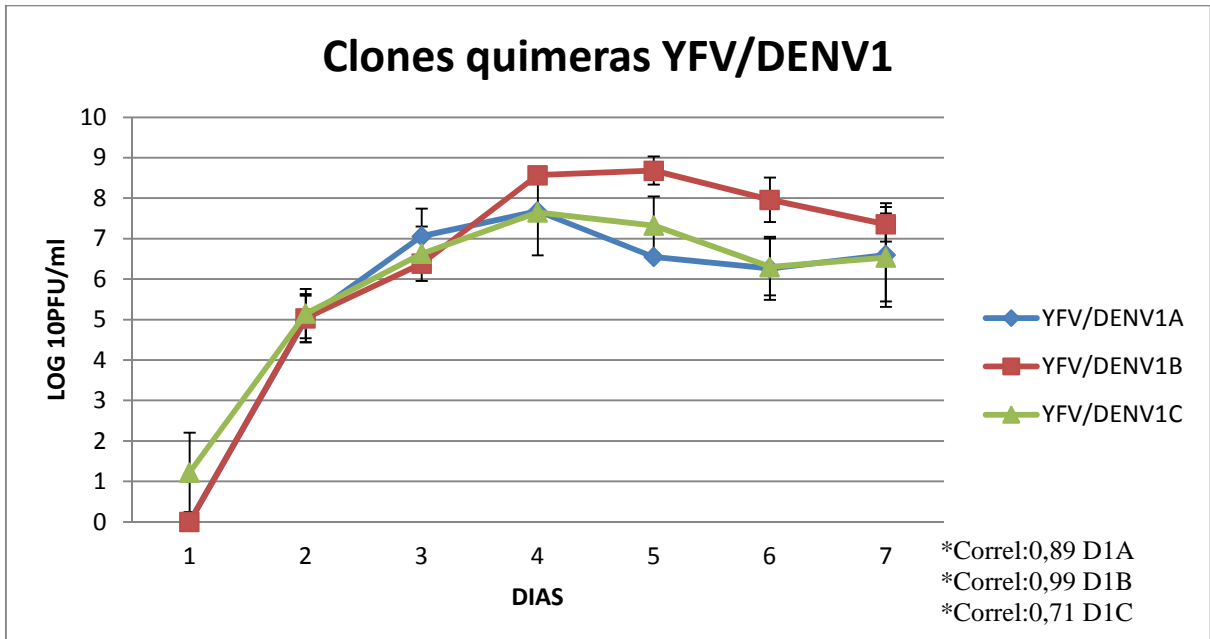
**Tabela 4.11:** Vírus selecionados a partir do sequenciamento nucleotídico e o título dos estoques virais.

CLONES	CÓDIGO	TÍTULO DO ESTOQUE VIRAL ( $\log_{10}$ PFU/ml)
YFV/DENV1 PE L-3223	YFV/DENV1 A	5,19
YFV/DENV1 PE M-3211	YFV/DENV1 B	7,62
YFV/DENV1 PE L-3224	YFV/DENV1 C	7,76
YFV/DENV2 PE M-3232	YFV/DENV2 A	5,46
YFV/DENV2 PE L-32211	YFV/DENV2 B	5,54
YFV/DENV2 PE L-32222	YFV/DENV2 C	7,11
YFV/DENV3H87 S-32121	YFV/DENV3A	7,24
YFV/DENV3H87 S-32312	YFV/DENV3 B	7,10
YFV/DENV3H87 S-32213	YFV/DENV3 C	7,51
YFV/DENV4 M-32231	YFV/DENV4 A	4,53
YFV/DENV4 M-32233	YFV/DENV4 B	4,80
YFV/DENV4 M-32113	YFV/DENV4 C	6,11

### 4.3.3- Cinética de Replicação dos Vírus Clonados

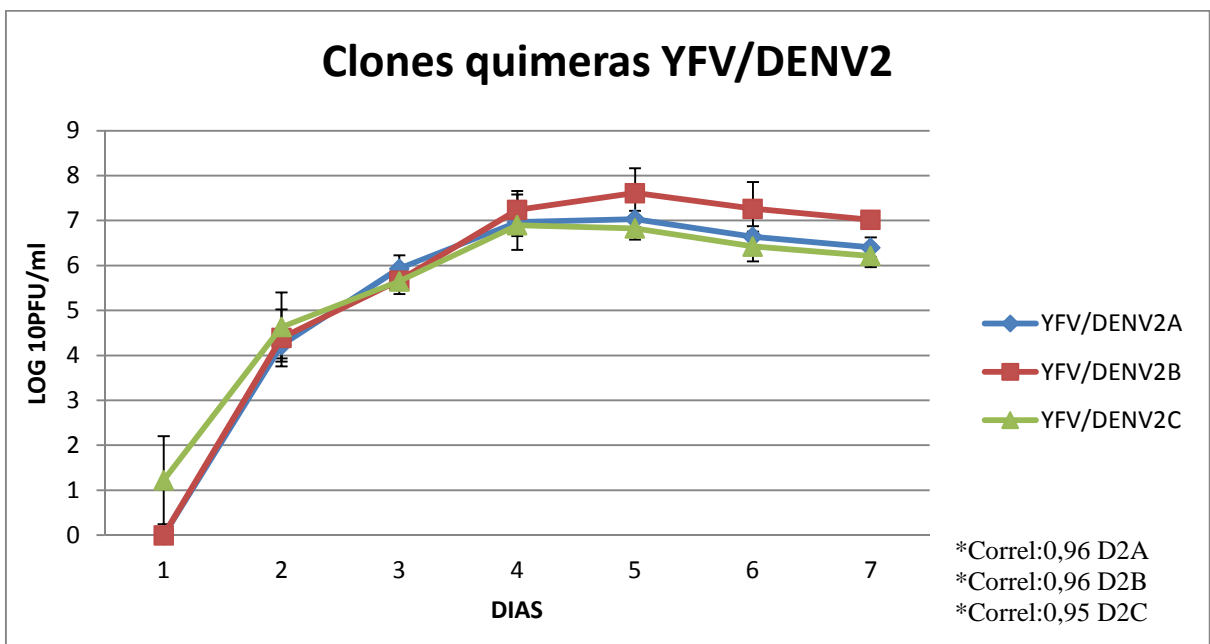
Seguindo na avaliação replicativa dos vírus recombinantes, foram feitas três curvas de replicação para cada sorotipo visando dar consistência aos nossos resultados. Para os clones virais de YFV/DENV1 obtivemos título máximo no quarto dia chegando a 7,0  $\log_{10}$ pfu/ml para os clones YFV/DENV1A e YFV/DENV1C e 8,5  $\log_{10}$ pfu/ml para YFV/DENV1C (Figura 4.8).





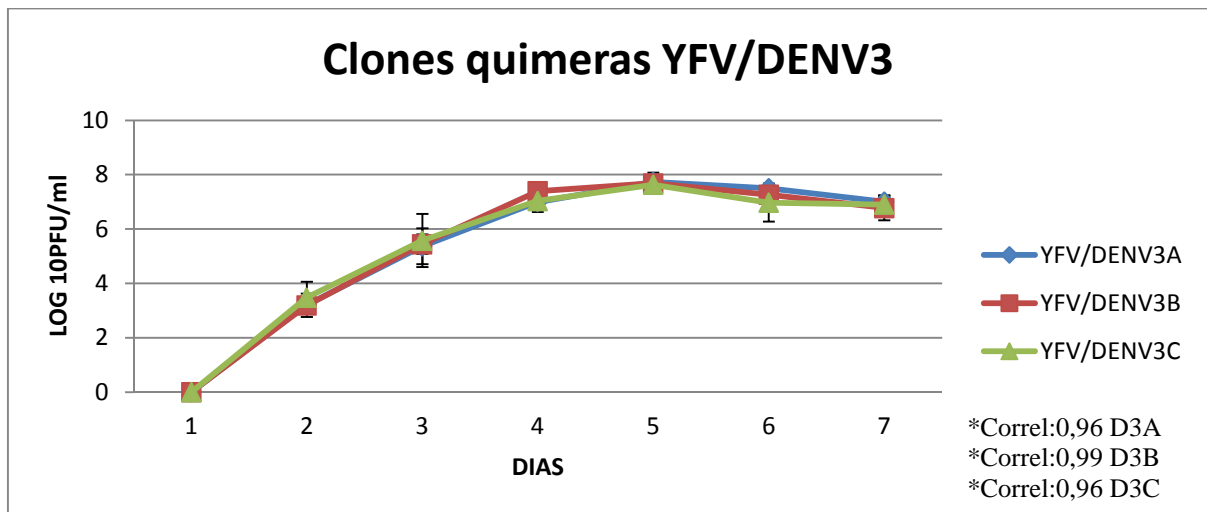
**Figura 4.8:** Curvas de crescimento dos vírus recombinantes em meio sem soro. Culturas de células Vero foram infectadas com os vírus: YFV/DENV1A, YFV/DENV1B e YFV/DENV1A C. Aliquotas (0,2 ml) foram recolhidas em intervalos de 24 h e as amostras congeladas para titulação viral por ensaio de placa em células Vero. Foi calculado o desvio padrão com base em três experimentos com os mesmos procedimentos. \*O índice de correlação está indicado como *correl*.

Para os clones de YFV/DENV2 o título máximo ocorreu no quinto dia, com valores de 7,0; 6,8; 7,5 log<sub>10</sub>pfu/ml para os clone YFV/DENV2A, YFV/DENV2C e YFV/DENV2B, respectivamente (Figura 4.9).



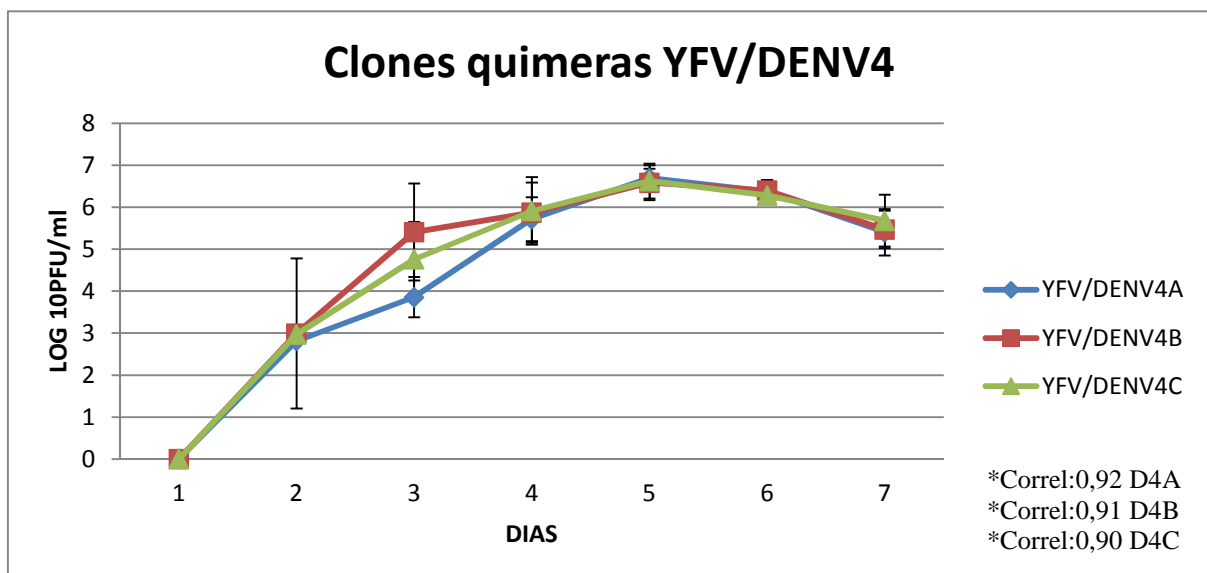
**Figura 4.9:** Curvas de crescimento dos vírus recombinantes em meio sem soro. Culturas de células Vero foram infectadas com os vírus: YFV/DENV2A, YFV/DENV1B e YFV/DENV1C. Aliquotas (0,2 ml) foram recolhidas em intervalos sucessivos de 24 h e as amostras congeladas para titulação viral por ensaio de placa em células Vero. Foi calculado o desvio padrão com base em três experimentos com os mesmos procedimentos. \*O índice de correlação está indicado como *correl*.

Os clones de YFV/DENV3 (Figura 4.10) alcançaram título máximo no quinto dia com 7,5 log<sub>10</sub>pfu/ml para todos clones.



**Figura 4.10:** Curvas de crescimento dos vírus recombinantes em meio sem soro. Culturas de células Vero foram infectadas com os vírus: YFV/DENV3A, YFV/DENV3B e YFV/DENV3C. Aliquotas (0,2 ml) foram recolhidas em intervalos sucessivos de 24 h e as amostras congeladas para titulação viral por ensaio de placa em células Vero. Foi calculado o desvio padrão com base em três experimentos com os mesmos procedimentos. \*O índice de correlação está indicado como *correl*.

Os clones de YFV/DENV4 alcançaram o título máximo no quinto dia com 6,5 log<sub>10</sub>pfu/ml (Figura 4.11).



**Figura 4.11:** Curvas de crescimento dos vírus recombinantes em meio sem soro. Culturas de células Vero foram infectadas com os vírus: YFV/DENV4A, YFV/DENV4B e YFV/DENV4C. Aliquotas (0,2 ml) foram recolhidas em intervalos sucessivos de 24 h e as amostras congeladas para titulação viral por ensaio de placa em células Vero. Foi calculado o desvio padrão com base em três experimentos com os mesmos procedimentos. \*O índice de correlação está indicado como *correl*.

Foi analisado o fator de correlação entre as amostras das três curvas. Um resultado aceitável de correlação é acima de 0,8 e todas as curvas, com exceção da curva do clone de YFV/DENV1C com 0,71 de correlação, ficaram acima deste valor pré-estabelecido.

#### 4.3.4- Estabilidade Genética dos vírus clonados

Os clones virais foram submetidos a nove passagens seriadas em culturas de células Vero com o objetivo de verificarmos a estabilidade do genoma viral de cada clone. O genoma dos vírus do sobrenadante da última passagem (CP10) e do nosso estoque de trabalho (CP2) foi sequenciado completamente. As sequências foram obtidas, analisadas e comparadas com os vírus quiméricos não clonados (P2).

Os resultados obtidos no sequenciamento nucleotídico mostraram que a estabilidade genética é alta, pois poucas alterações ocorreram entre as passagens CP2 e a CP10. Na tabela 4.12, encontram-se as alterações nucleotídicas e de aminoácido dos clones virais de CP2 a CP10, comparando com o estoque de trabalho P2.

As mutações encontradas nos clones de YFV/DENV1 entre CP2 e CP10 foram silenciosas ou conservativas (YFV/DENV1A - A<sub>1590</sub>G [K<sub>E-204</sub> R]; YFV/DENV1C - A<sub>1590</sub>G [K<sub>E-204</sub> R], A<sub>1787</sub>G [I<sub>E-269</sub> V]). Por problemas técnicos, o vírus YFV/DENV1B ainda não foi sequenciado na CP10. Os clones de YFV/DENV2 apresentaram mudança nucleotídica com alteração de aminoácido e todas com modificação de carga (YFV/DENV2A C<sub>773</sub>T [H<sub>prM-96</sub> Y]; YFV/DENV2B C<sub>1782</sub>C/T [T<sub>E-269</sub> T/I], T<sub>1809</sub>C [L<sub>E-276</sub> S], A<sub>3479</sub>G [K<sub>NS1-339</sub> E]; YFV/DENV2C C<sub>773</sub>C/T [H<sub>prM-96</sub> Y/H], T<sub>996</sub>C/T [I<sub>E-5</sub> I/T]).

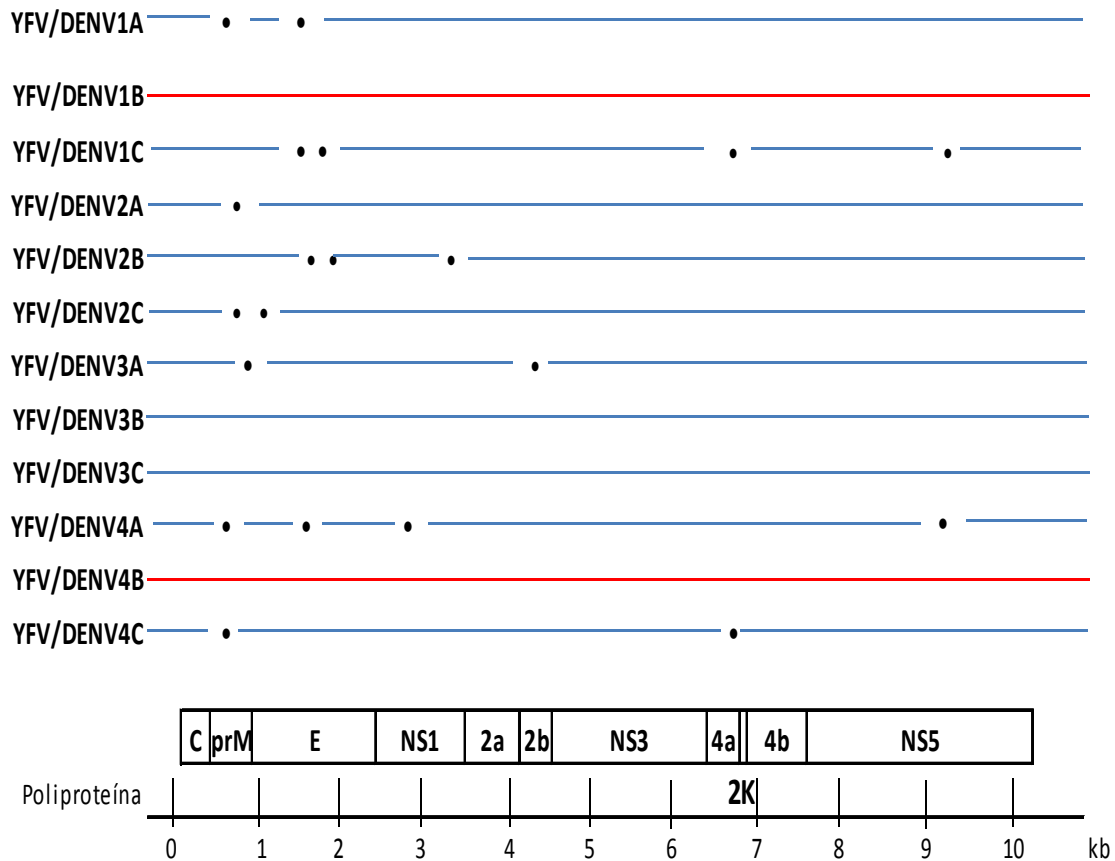
Para os clones YFV/DENV3B e YFV/DENV3C não houve mutação entre as passagens CP2 e CP10. Já o clone YFV/DENV3A apresentou uma mutação silenciosa (YFV/DENV3A C<sub>4298</sub>T) e uma heterogeneidade com alteração no aminoácido G<sub>848</sub>G/T [V<sub>prM-151</sub> V/L]. Os clones de YFV/DENV4 apresentaram mutações silenciosas e não conservativas (YFV/DENV4A A<sub>638</sub>G [K<sub>prM-51</sub> E], T<sub>1679</sub>C [Y<sub>E-232</sub> H]; YFV/DENV4C A<sub>638</sub>G [K<sub>prM-51</sub> E], T<sub>6837</sub>C [I<sub>NS4a-133</sub> T]).

Tabela 4.12: Estabilidade genética dos clones\*.

YFV/DENV1 (PE)								
Vírus	GENE	Posição SEQ	Alteração Nucleotídica			Alteração Aminoácido		
			P2	CP2	CP10	P2	CP2	CP10
YFV/DENV1A	prM	574	T	T	C	-	-	-
	E	1590	A	A	G	K	K <sub>E-204</sub>	R
YFV/DENV1B			Sem resultado					
YFV/DENV1C	E	1590	A	A	G		K <sub>E-204</sub>	R
	E	1787	A	A	G		I <sub>E-269</sub>	V
	NS4A	6739	T	T	C	-	-	-
	NS5	9400	A	A	G	-	-	-
YFV/DENV2 (PE)								
Vírus	GENE	Posição SEQ	Alteração Nucleotídica			Alteração Aminoácido		
			P2	CP2	CP10	P2	CP2	CP10
YFV/DENV2A	prM	773	C	C	T	H	H <sub>prM-96</sub>	Y
	E	1782	C	C	C/T		T <sub>E-269</sub>	T/I
YFV/DENV2B	E	1809	T	T	C/T	L	L <sub>E-276</sub>	S
	NS1	3479	A	A	G/A	K	K <sub>NS1-339</sub>	E
	NS2A	3913	C	C	C/T		-	-
YFV/DENV2C	prM	773	C	C	C/T		H <sub>prM-96</sub>	Y
	E	996	T	T	C/T		I <sub>E-5</sub>	I/T
YFV/DENV3 H87								
Vírus	GENE	Posição SEQ	Alteração Nucleotídica			Alteração Aminoácido		
			P2	CP2	CP10	P2	CP2	CP10
YFV/DENV3A	prM	848	G	G	G/T	V	V <sub>prM-151</sub>	V/L
	NS2B	4298	C	C	C/T	-	-	-
YFV/DENV3B		-	-	-	-	-	-	-
YFV/DENV3C		-	-	-	-	-	-	-
YFV/DENV4								
Vírus	GENE	Posição SEQ	Alteração Nucleotídica			Alteração Aminoácido		
			P2	CP2	CP10	P2	CP2	CP10
YFV/DENV4A	prM	638	A	A	G	K	K <sub>prM-51</sub>	E
	E	1679	T	T	C	Y	Y <sub>E-232</sub>	H
	NS1	2977	C	C	T		-	-
	NS5	9124	A	A	G		-	-
YFV/DENV4B			Sem resultado					
YFV/DENV4C	prM	638	A	A	G		K <sub>prM-51</sub>	E
	E	2137	C	C	T		-	-
	NS4A	6837	T	T	C		I <sub>NS4a-133</sub>	T

\*Os grupos P2 são vírus quimericos estoque de trabalho; o grupo CP2 são os clones na passagem P2; e o grupo CP10 são os clones após as dez passagens seriadas em célula Vero, nos quais estão indicados os pontos de mutações das passagens P2, CP2 e CP10

Os resultados de todos os clones e a sua disposição ao longo do genoma encontram-se na figura 4.12. Por problemas técnicos, os genomas dos vírus YFV/DENV1B e YFV/DENV4B na CP10 ainda não foram sequenciados.



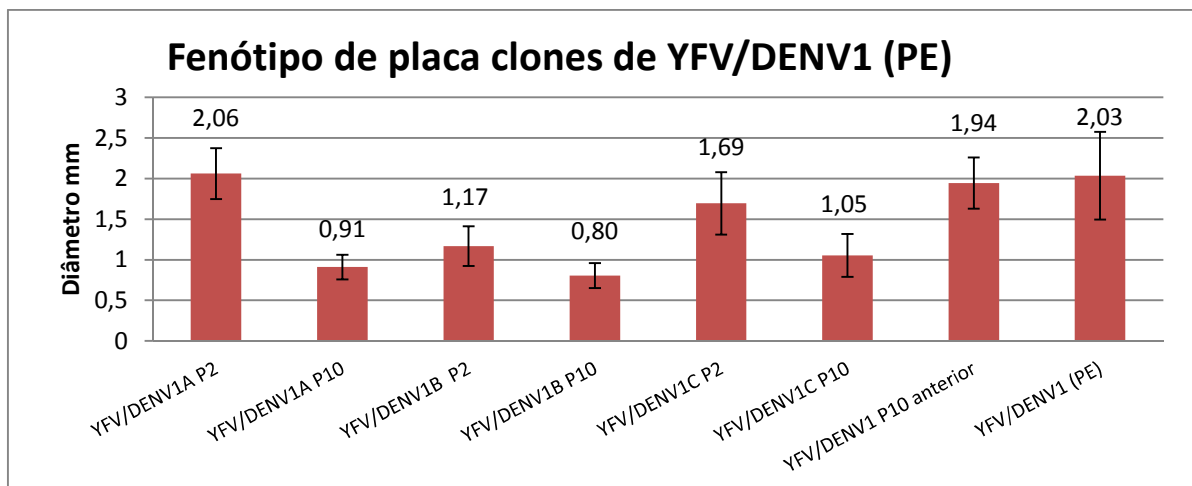
**Figura 4.12:** Representação dos pontos de mutação dos clones. Observamos uma maior concentração de mutações nas regiões estruturais da poliproteína, principalmente nas regiões prM e E. As linhas vermelhas representam os clones que não tiveram o seu material genético sequenciado.

#### 4.3.5- Fenótipo de Placa de Lise Viral

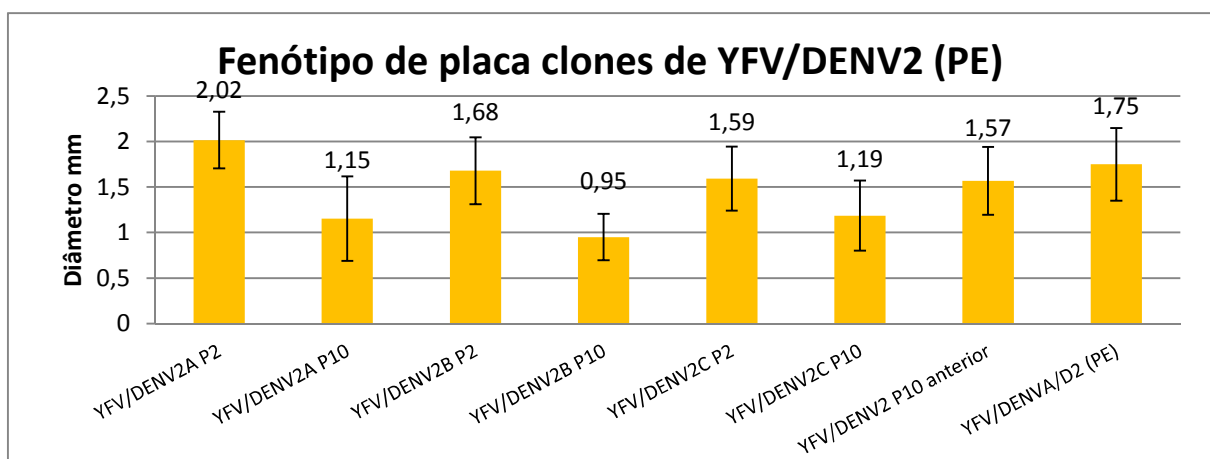
A caracterização do tamanho de placa foi realizada pelo plaqueamento em células Vero e revelação dos plaques pela técnica de imunofocus. Foram analisados os vírus quiméricos P2 e P10 (vírus proveniente da estabilidade genética anterior a etapa de seleção clonal), os vírus dos clones CP2 e CP10, a fim de avaliarmos mudanças fenotípicas após a clonagem e estabilidade genética. O tamanho médio de cada plaque foi aferido no aparelho Biospot. Este equipamento é capaz de medir a área total dos plaques e as imagens produzidas pelo Biospot encontram-se no

anexo 7.4. Após a avaliação dos dados do equipamento, foi realizado um cálculo para determinar o diâmetro médio dos plaques (M&M 3.10).

Os resultados do fenótipo de placa demonstram morfologia de placa grande para os clones de YFV/DENV1 e YFV/DENV2 (~1,2-2,0mm e ~1,6-2,0mm, respectivamente) Todos os clones de YFV/DENV1 e YFV/DENV2, após 10 passagens seriadas em célula Vero, apresentaram uma diminuição no tamanho de plaque, enquanto que para os vírus da P10 anterior manteve o perfil de tamanho de placa de lise similar ao vírus P2 (Figuras 4.13, 4.14).

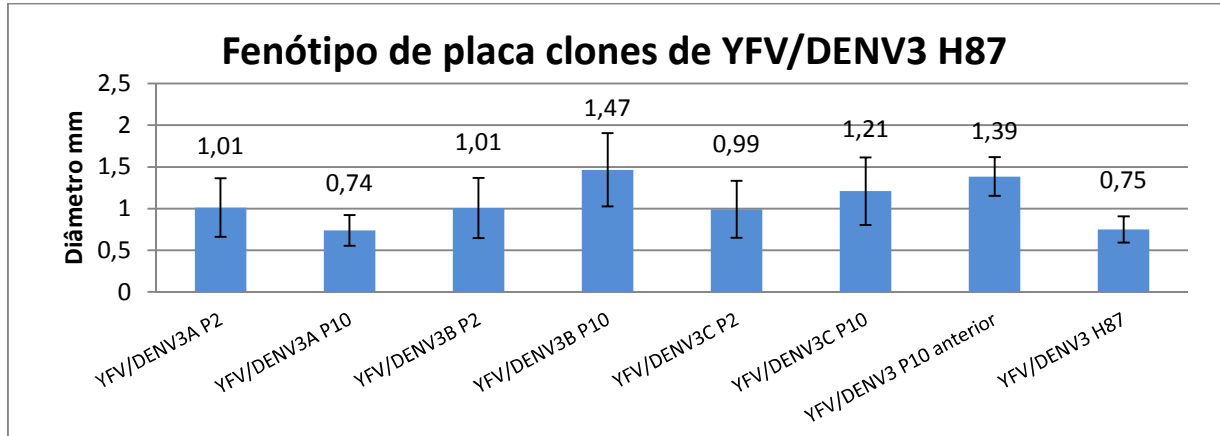


**Figura 4.13:** Determinação do tamanho médio dos plaques. As barras são os desvios-padrão calculados e os números os valores médios do diâmetro. Foram utilizados os vírus que passaram pela seleção clonal (YFV/DENV1A, YFV/DENV1B e YFV/DENV1C todos P2), os vírus da estabilidade genética dos clones (YFV/DENV1A, YFV/DENV1B e YFV/DENV1C todos P10), o vírus da estabilidade genética do vírus que não passou pela etapa de seleção clonal (YFV/DENV1C P10 anterior) e o vírus YFV/DENV1 (P2).



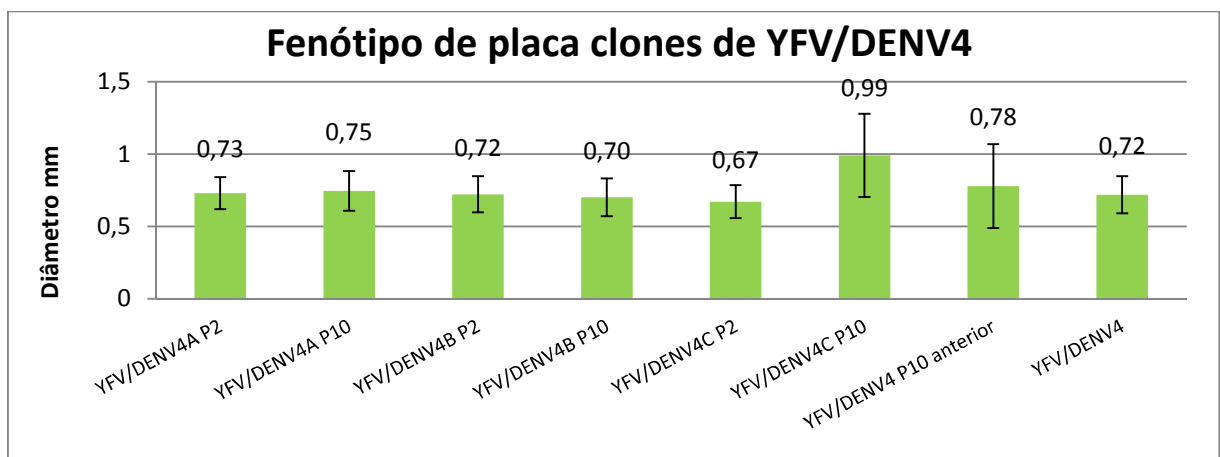
**Figura 4.14:** Determinação do tamanho médio dos plaques. As barras são os desvios-padrão calculados e os números os valores médios do diâmetro. Foram utilizados os vírus que passaram pela seleção clonal (YFV/DENV2A, YFV/DENV2B e YFV/DENV2C todos P2), os vírus da estabilidade genética dos clones (YFV/DENV2A, YFV/DENV2B e YFV/DENV2C todos P10), o vírus da estabilidade genética do vírus que não passou pela etapa de seleção clonal (YFV/DENV2 P10 anterior) e o vírus YFV/DENV2 (P2).

Os clones de YFV/DENV3 apresentaram um perfil intermediário (~1,0mm) (Figura 4.15). Os clones de YFV/DENV3 após 10 passagens apresentaram morfologia aumentada, exceto o clone YFV/DENV3A.



**Figura 4.15:** Determinação do tamanho médio dos plaques. As barras são os desvios-padrão calculados e os números os valores médios do diâmetro. Foram utilizados os vírus que passaram pela seleção clonal (YFV/DENV3A, YFV/DENV3B e YFV/DENV3C todos P2), os vírus da estabilidade genética dos clones (YFV/DENV3A, YFV/DENV3B e YFV/DENV3C todos P10), o vírus da estabilidade genética do vírus que não passou pela etapa de seleção clonal (YFV/DENV3 P10 anterior) e o vírus YFV/DENV3 H87 (P2).

Os clones de YFV/DENV4 permaneceram com a mesma morfologia após as passagens, exceto o vírus YFV/DENV4C. Os clones de YFV/DENV4 apresentaram um perfil de tamanho de placa de lise menor, quando comparado com os outros clones virais (~0,7-1,0mm) (Figura 4.16)



**Figura 4.16:** Determinação do tamanho médio dos plaques. As barras são os desvios-padrão calculados e os números os valores médios do diâmetro. Foram utilizados os vírus que passaram pela etapa de seleção clonal (YFV/DENV4A, YFV/DENV4B e YFV/DENV4 C todos P2), os vírus da estabilidade genética dos clones (YFV/DENV4A, YFV/DENV4B e YFV/DENV4C todos P10), o vírus da estabilidade genética do vírus que não passou pela etapa de seleção clonal (YFV/DENV4 P10 anterior) e o vírus YFV/DENV4 (P2).

Os resultados entre os clones CP2 e CP10 mostram um valor significativo ( $<0,05$ ) entre a diferença dos tamanhos de placa de lise para todos os clones, exceto para os clones (YFV/DENV4A P2 e YFV/DENV4A P10) e (YFV/DENV4B P2 e YFV/DENV4B P10) (Tabela 4.13).

**Tabela 4.13:** Significância estatística entre os tamanhos de placa de lise dos vírus quiméricos CP2 e CP10.

Relação entre os Vírus			Teste Mann-Whitney
YFV/DENV1A (PE) P2	x	YFV/DENV1A (PE) P10	<b>0,039</b>
YFV/DENV1B (PE) P2	x	YFV/DENV1B (PE) P10	<b>0,000</b>
YFV/DENV1C (PE) P2	x	YFV/DENV1C (PE) P10	<b>0,000</b>
YFV/DENV2A (PE) P2	x	YFV/DENV2A (PE) P10	<b>0,000</b>
YFV/DENV2B (PE) P2	x	YFV/DENV2B (PE) P10	<b>0,000</b>
YFV/DENV2C (PE) P2	x	YFV/DENV2C (PE) P10	<b>0,000</b>
YFV/DENV3A H87 P2	x	YFV/DENV3A H87 P10	<b>0,000</b>
YFV/DENV3B H87 P2	x	YFV/DENV3B H87 P10	<b>0,000</b>
YFV/DENV3C H87 P2	x	YFV/DENV3C H87 P10	<b>0,032</b>
YFV/DENV4A P2	x	YFV/DENV4A P10	<b>0,538*</b>
YFV/DENV4B P2	x	YFV/DENV4B P10	<b>0,234*</b>
YFV/DENV4C P2	x	YFV/DENV4C P10	<b>0,000</b>

\*Pontos onde o nível de significância foi maior que 0,05, aceitando-se a hipótese nula significa que não existe diferença entre os tamanhos de placa de lise.

#### 4.3.6- Neurovirulência em Camundongos

O teste de neurovirulência em camundongos é exigido para lotes sementes de vírus 17D utilizados para a produção de vacina e está bem descrito nos protocolos da OMS. Como os vírus quiméricos contêm 80% do genoma do vírus 17D, torna-se necessária a análise destes vírus recombinantes.

Para analisar a neurovirulência dos vírus quiméricos foram realizados dois experimentos com camundongos Swiss Webster. No primeiro foram usados camundongos com três semanas e no segundo neonatos, que foram inoculados por via intracerebral com  $10^3$ pfu/30 $\mu$ l e  $10^3$ pfu/20 $\mu$ l de inóculo, respectivamente. Nestes experimentos os animais foram observados durante 21 dias e anotados os sinais de paralisia ou morte.

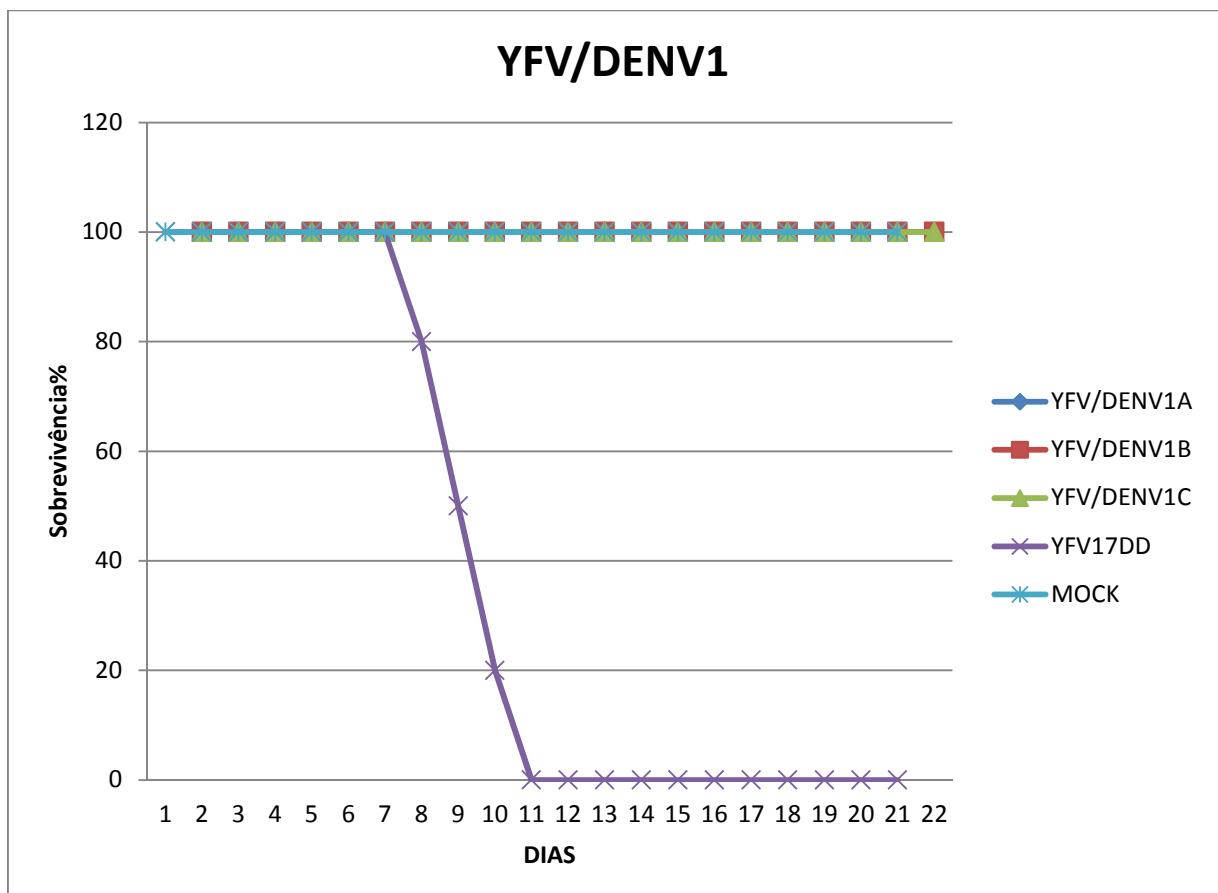


#### 4.3.6.1- Neurovirulência em Camundongos com Três semanas

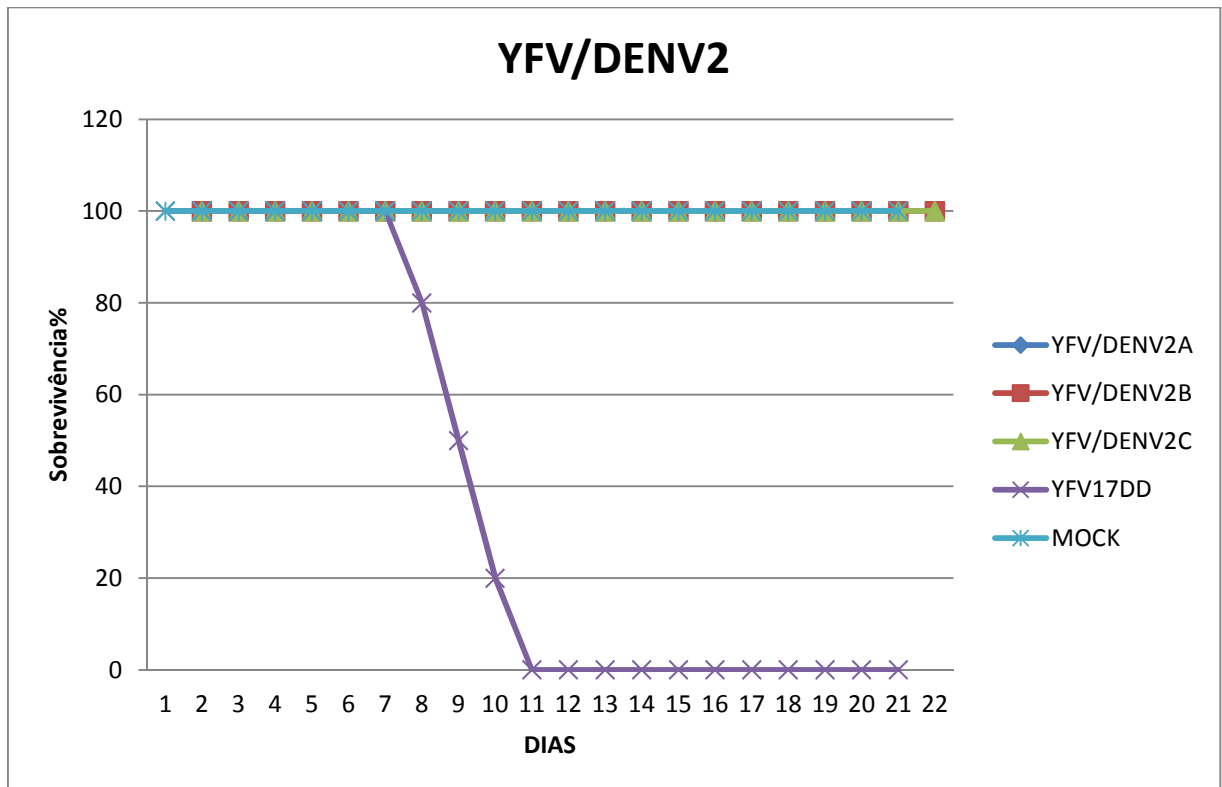
Os camundongos foram inoculados com os vírus quiméricos e seus respectivos clones. O YFV17DD e meio de cultivo celular (VP-SFM) foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

Entre os clones virais, o vírus YFV/DENV3A causou a partir do 11º dia paralisia seguida de morte em dois animais. Para os demais clones virais e o controle negativo (meio de cultura) houve 100% de sobrevivência sem sinais de paralisia. O grupo controle positivo inoculado com YFV17DD apresentou mortalidade a partir do 7º dia o percentual de sobrevivência diminuiu até atingir 100% de mortalidade no 11º dia. (Figuras 4.17, 4.18, 4.19 e 4.20).

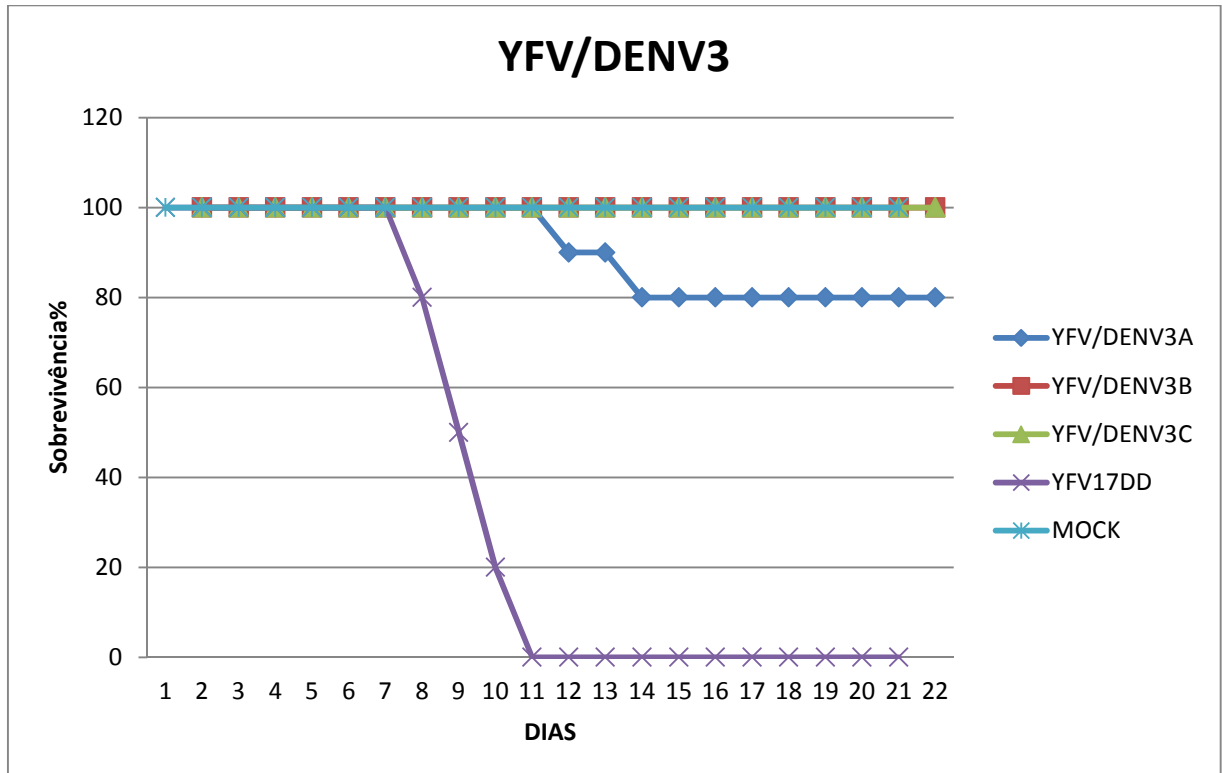
Os valores dos títulos dos clones virais YFV/DENV1 (PE), YFV/DENV2 (PE), YFV/DENV3 H87 e YFV/DENV4 no experimento em camundongos com três semanas de idade estão mostrados na tabela 4.14.



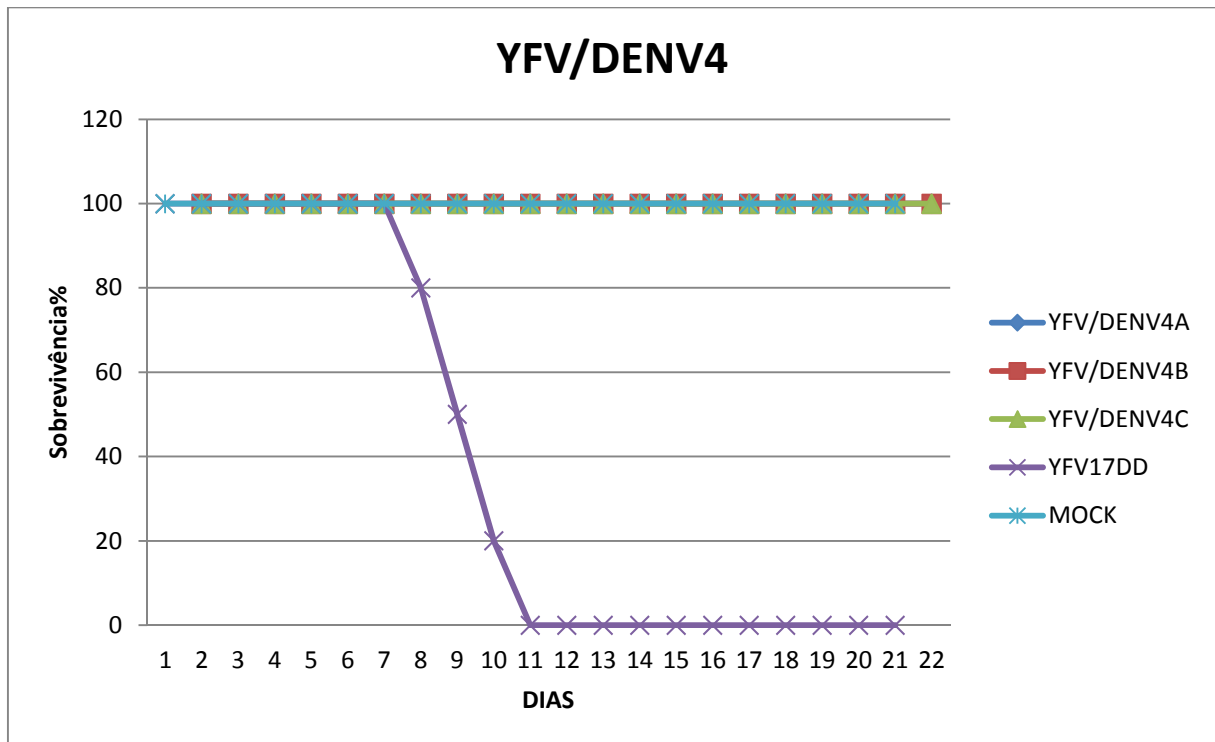
**Figura 4.17:** Teste de neurovirulência para o vírus YFV/DENV1 e seus derivados. O volume de inóculo foi de 30 µl pela via intracerebral, contendo  $\sim 10^3$  pfu. A figura mostra a sobrevivência após a inoculação durante 21 dias.



**Figura 4.18:** Teste de neurovirulência para o vírus YFV/DENV2 e seus derivados. O volume de inóculo foi de 30  $\mu$ l pela via intracerebral, contendo  $\sim 10^3$  pfu. A figura mostra a sobrevivência após a inoculação durante 21 dias.



**Figura 4.19** Teste de neurovirulência para o vírus YFV/DENV3 e seus derivados. O volume de inóculo foi de 30  $\mu$ l pela via intracerebral, contendo  $\sim 10^3$  pfu. A figura mostra a sobrevivência após a inoculação durante 21 dias.



**Figura 4.20:** Teste de neurovirulência para o vírus YFV/DENV4 e seus derivados. O volume de inóculo foi de 30  $\mu$ l pela via intracerebral, contendo  $\sim 10^3$  pfu. A figura mostra a sobrevivência após a inoculação durante 21 dias.

**Tabela 4.14** Títulos virais após a inoculação dos camundongos\*

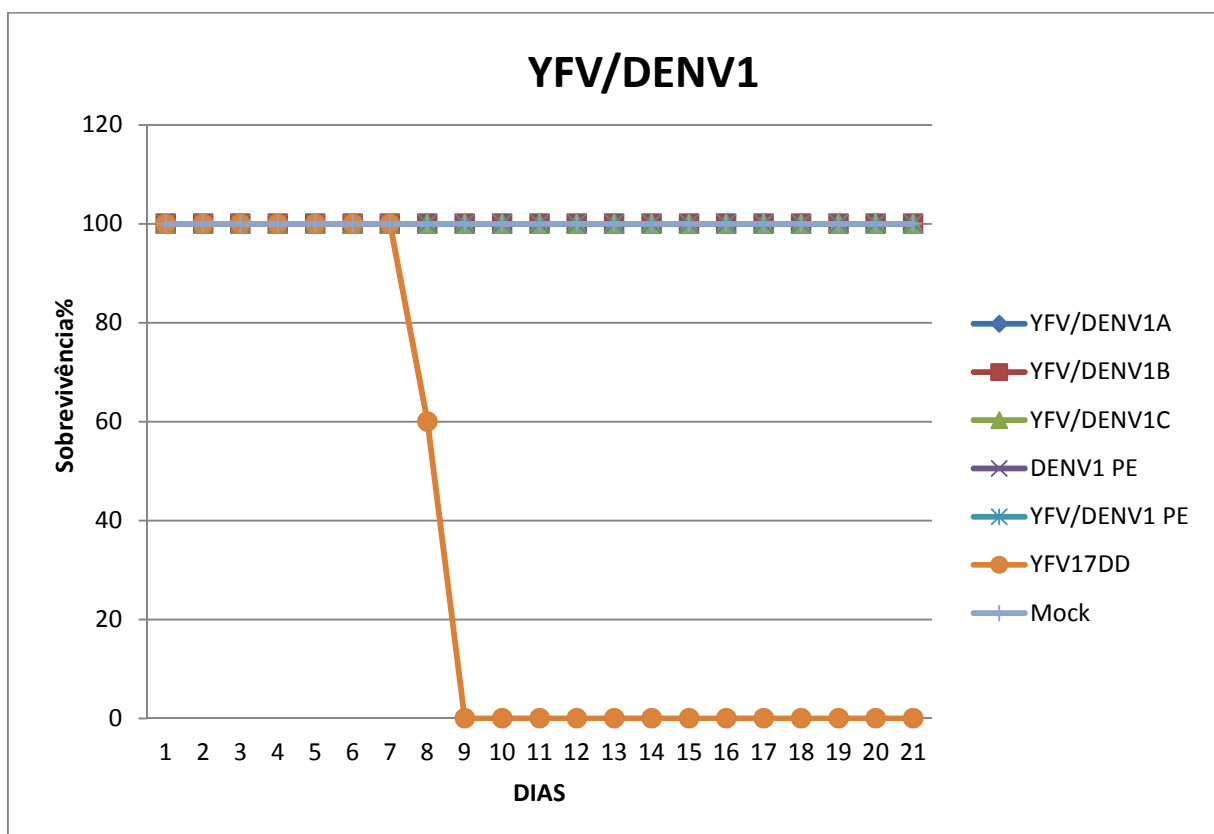
Back up inóculo Vírus	pfu/dose/30ul	LOG pfu/dose/30ul
YFV/DENV1A	5,85E+03	3,77
YFV/DENV1B	1,46E+02	2,16
YFV/DENV1C	5,85E+02	2,77
YFV/DENV2A	2,12E+03	3,33
YFV/DENV2B	1,07E+03	3,03
YFV/DENV2C	1,68E+03	3,23
YFV/DENV3A	6,75E+02	2,83
YFV/DENV3B	1,35E+01	1,13
YFV/DENV3C	8,70E+02	2,94
YFV/DENV4A	1,61E+03	3,21
YFV/DENV4B	1,10E+03	3,04
YFV/DENV4C	1,23E+03	3,09
MOCK	0,00E+00	0,00
YFV17DD	2,27E+02	2,36

\* Os quadrados representam os grupos que não tiveram o valor desejável de inóculo,

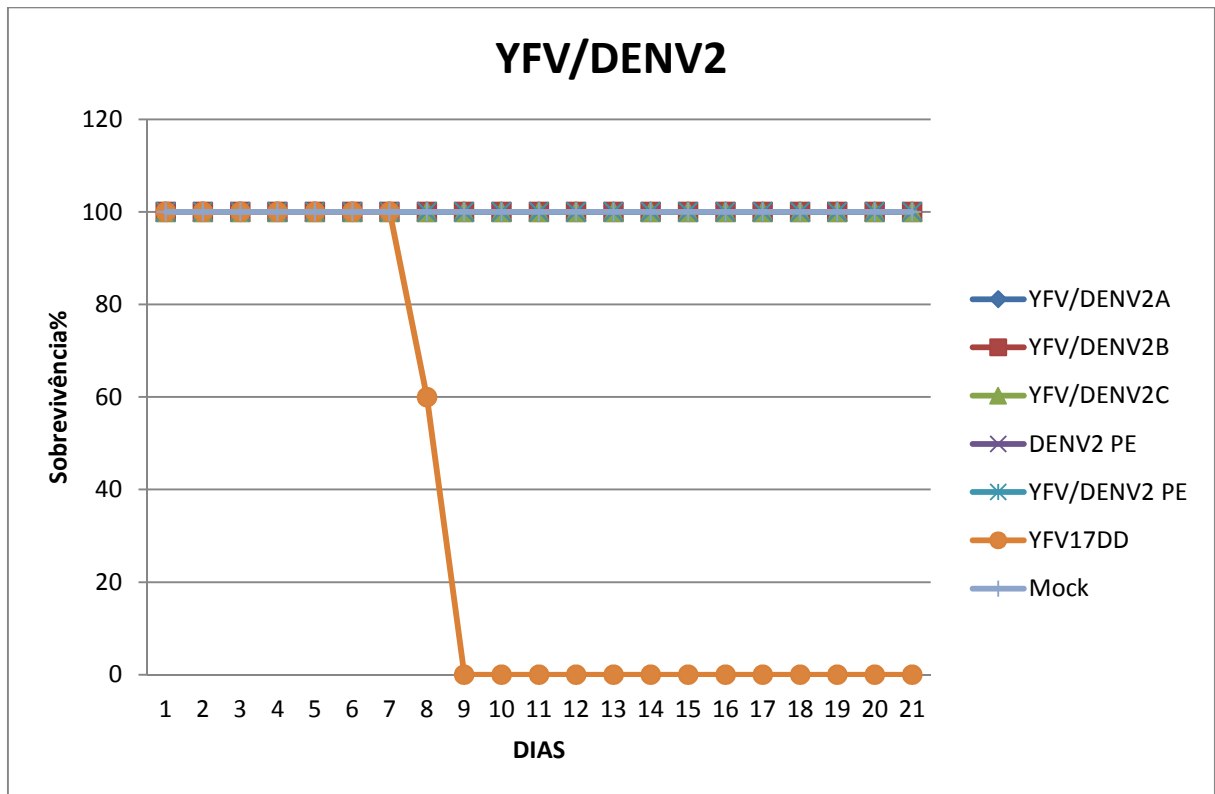
Com o objetivo de avaliar a neurovirulência com valores máximos possíveis, pelo título atual dos estoques virais, inoculamos pela via intracerebral, o vírus sem diluição ( $10^0$ ). Os resultados demonstram que apesar do aumento significativo da quantidade viral por inóculo, nenhum grupo apresentou uma taxa de sobrevivência abaixo de 100% (Figuras 4.21, 4.22, 4.23 e 4.24). Todos os animais inoculados com

os vírus YFV/DENV recombinantes e seus clones assim como os vírus de dengue selvagens e o controle negativo sobreviveram. Já os animais que receberam o vírus 17DD atingiram 100% de mortalidade no intervalo do 7º ao 14º dia após a inoculação.

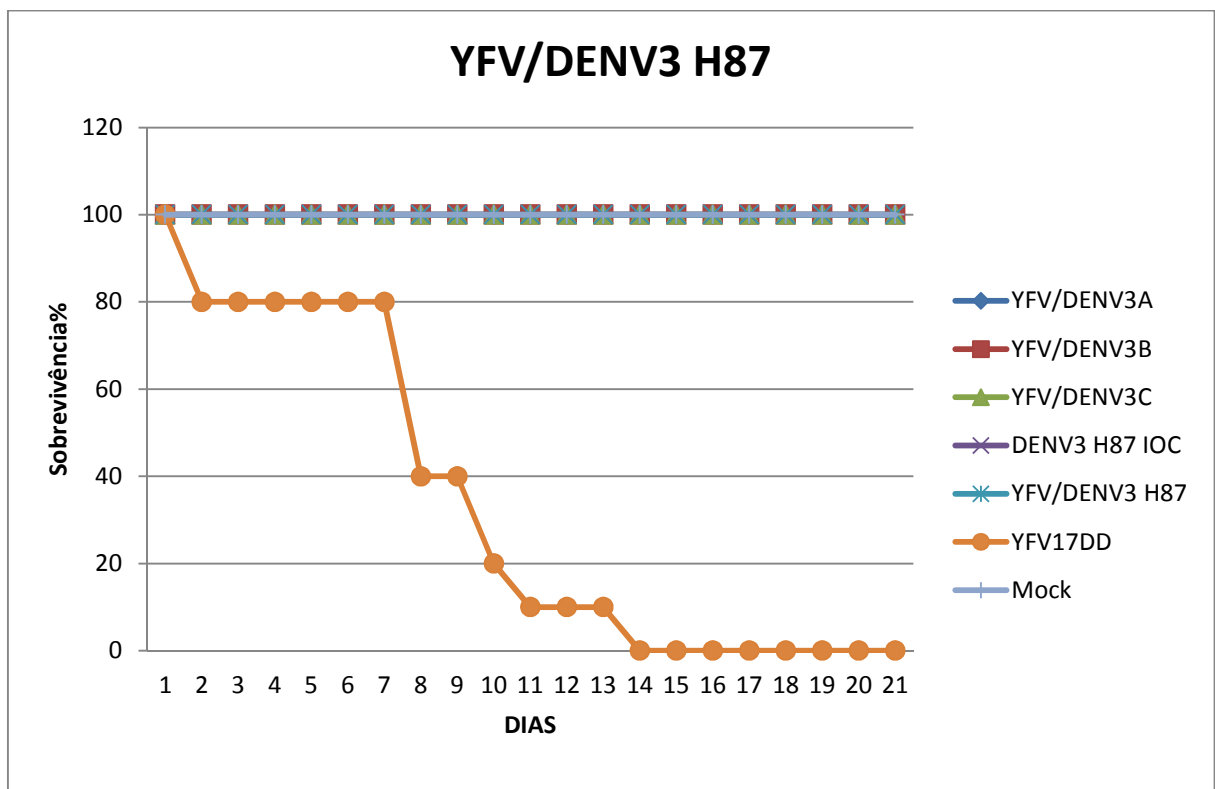
Devido à necessidade de analisar também os vírus quiméricos P2 de cada clone e também os vírus parentais, o experimento precisou ser reconfigurado. Em caráter emergencial solicitamos animais sobressalentes do CECAL para a realização do teste. Assim tivemos que dividir o experimento em dois grupos (DENV1 e DENV2) e (DENV3 e DENV4). Cada grupo possui um controle positivo 17DD, pois foram realizados em dias diferentes. Por isso a diferença entre os dois experimentos em relação ao vírus 17DD. Os títulos dos clones virais YFV/DENV1 (PE), YFV/DENV2 (PE), YFV/DENV3 H87, YFV/DENV4 e seus respectivos controles estão na tabela 4.15.



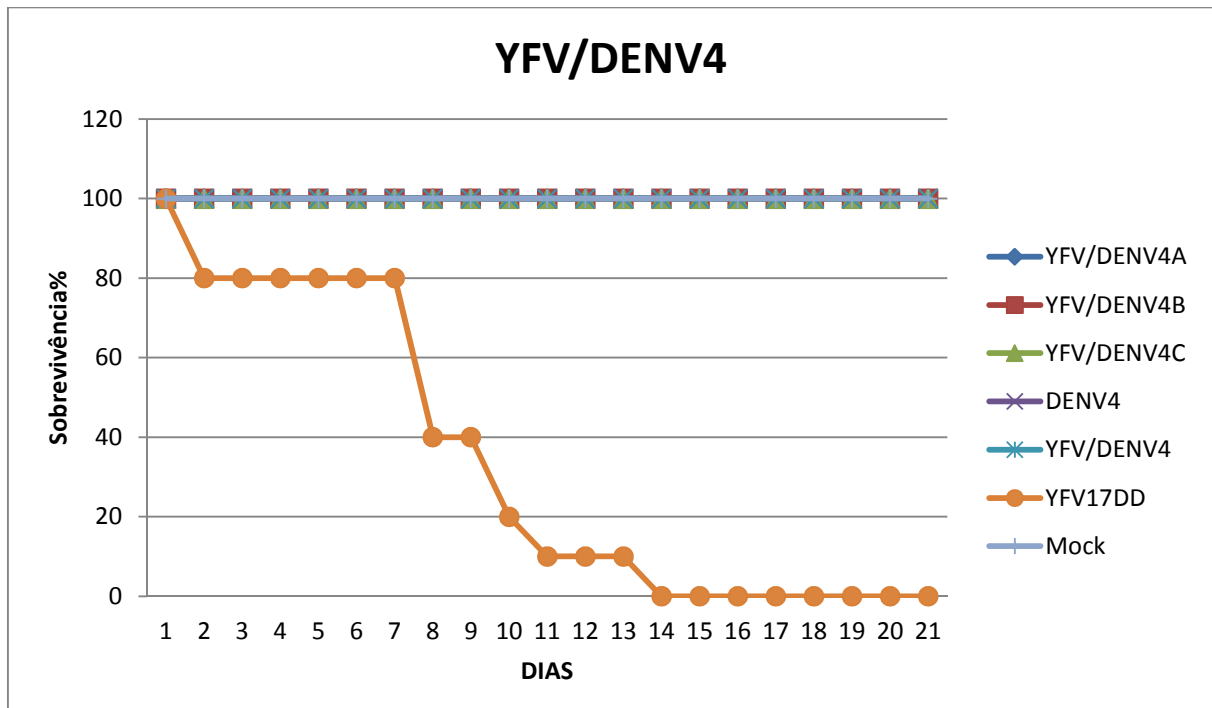
**Figura 4.21:** Teste de neurovirulência para o vírus YFV/DENV1 e seus derivados. Foram inoculados 10 animais para cada clone viral. O volume de inóculo foi de 30 µl intracerebral. A figura mostra o grau, em porcentagem, de sobrevivência após a inoculação sendo estes avaliados durante 21 dias.



**Figura 4.22:** Teste de neurovirulência para o vírus YFV/DENV2 e seus derivados. O volume de inóculo foi de 30  $\mu$ l intracerebral. A figura mostra o grau, em porcentagem, de sobrevivência após a inoculação sendo estes avaliados durante 21 dias.



**Figura 4.23:** Teste de neurovirulência para o vírus YFV/DENV3 e seus derivados. Foram inoculados 10 animais para cada clone viral. O volume de inóculo foi de 30  $\mu$ l intracerebral. A figura mostra o grau, em porcentagem, de sobrevivência após a inoculação sendo estes avaliados durante 21 dias.



**Figura 4.24:** Teste de neurovirulência para o vírus YFV/DENV4 e seus derivados. Foram inoculados 10 animais para cada clone viral. O volume de inóculo foi de 30 µl intracerebral. A figura mostra o grau, em porcentagem, de sobrevivência após a inoculação sendo estes avaliados durante 21 dias.

**Tabela 4.15:** Títulos virais após a inoculação dos camundongos.

Vírus	pfu/dose/30ul	LOG pfu/dose/30ul
YFV/DENV1A	1,80E+03	3,25
YFV/DENV1B	3,60E+05	5,55
YFV/DENV1C	2,10E+05	5,32
YFV/DENV (P2)	8,70E+03	3,94
DENV1 (PE)	1,50E+05	4,17
YFV17DD	2,10E+05	5,32
YFV/DENV2A	4,50E+03	3,65
YFV/DENV2B	3,00E+03	3,47
YFV/DENV2C	8,40E+03	3,92
YFV/DENV2 (P2)	1,80E+04	3,25
DENV2 (PE)	3,90E+04	4,59
YFV17DD	2,10E+05	5,32
YFV/DENV3A	3,60E+05	5,55
YFV/DENV3B	4,05E+05	5,60
YFV/DENV3C	7,35E+05	5,86
YFV/DENV3 (P2)	2,24E+04	4,35
DENV3 H87	8,70E+04	3,94
YFV17DD	1,02E+05	5,00
YFV/DENV4A	5,25E+02	2,72
YFV/DENV4B	1,05E+03	3,02
YFV/DENV4C	2,55E+05	5,40
YFV/DENV4 (P2)	5,40E+03	3,73
DENV4	8,40E+05	5,92
YFV17DD	1,02E+05	5,00

#### 4.3.6.2- Neurovirulência em Camundongos Neonatos

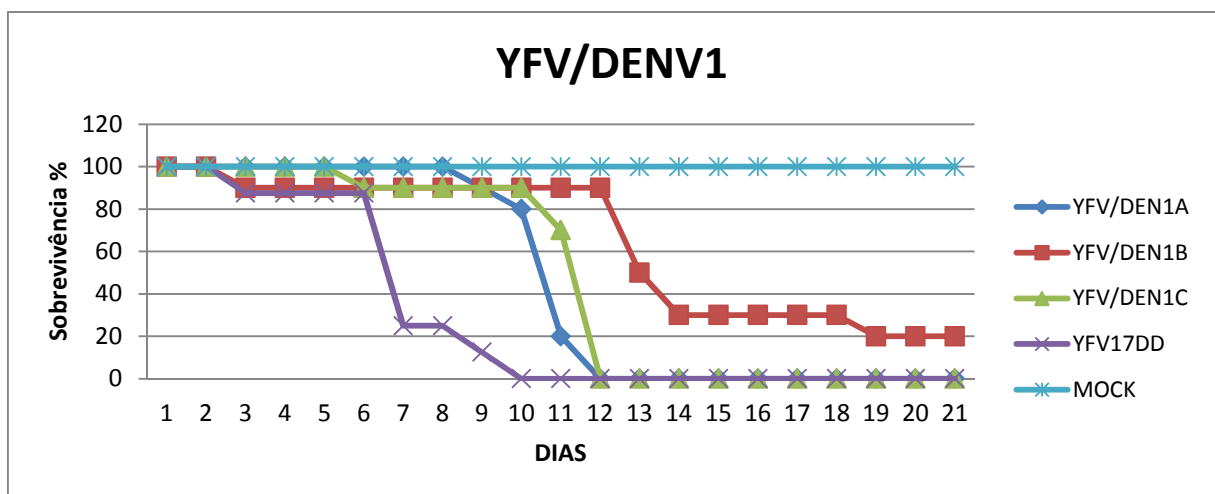
Os camundongos neonatos apresentaram uma diferença significativa nos resultados, quando comparados com os camundongos de três semanas. Observamos que todos os vírus foram neurovirulentos em neonatos, com exceção de YFV/DENV4C e YFV/DENV4A. Os controles permaneceram com o mesmo padrão, com mortalidade total já no décimo primeiro dia após a inoculação com o vírus YFV17DD e o controle negativo com 100% de sobrevivência (Figuras 4.25, 4.26, 4.27 e 4.28).

Analisando os resultados por vírus, entre os clones de YFV/DENV1, somente os camundongos inoculados com o vírus YFV/DENV1B apresentaram sobrevivência de 20%, enquanto os demais apresentaram mortalidade de 100%.

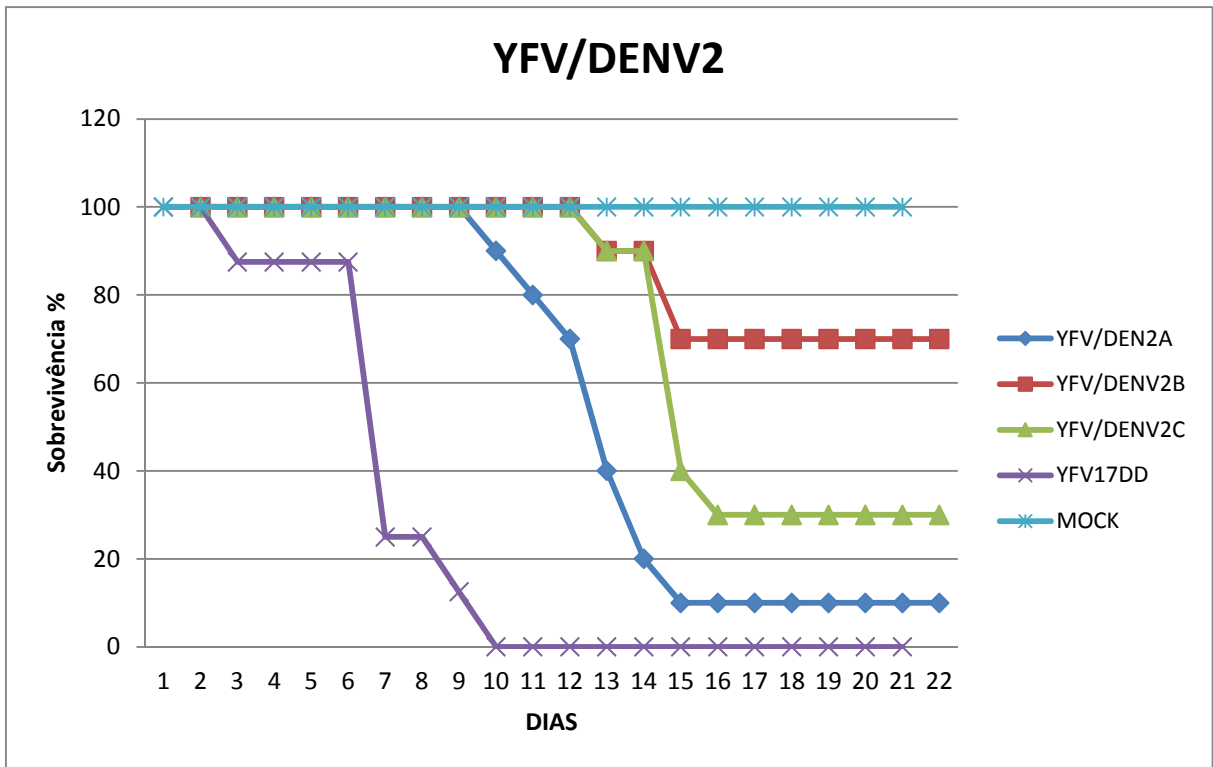
Os animais inoculados com os clones de YFV/DENV2 apresentaram sobrevivência de 10% após a inoculação com vírus YFV/DENV2A, 70% para YFV/DENV2B e 30% para YFV/DENV2C.

Dentre os clones YFV/DENV3 H87 somente 30% dos camundongos inoculados com YFV/DENV3A sobreviveram e todos os animais morreram após a inoculação com os vírus YFV/DENV3B e YFV/DENV3C.

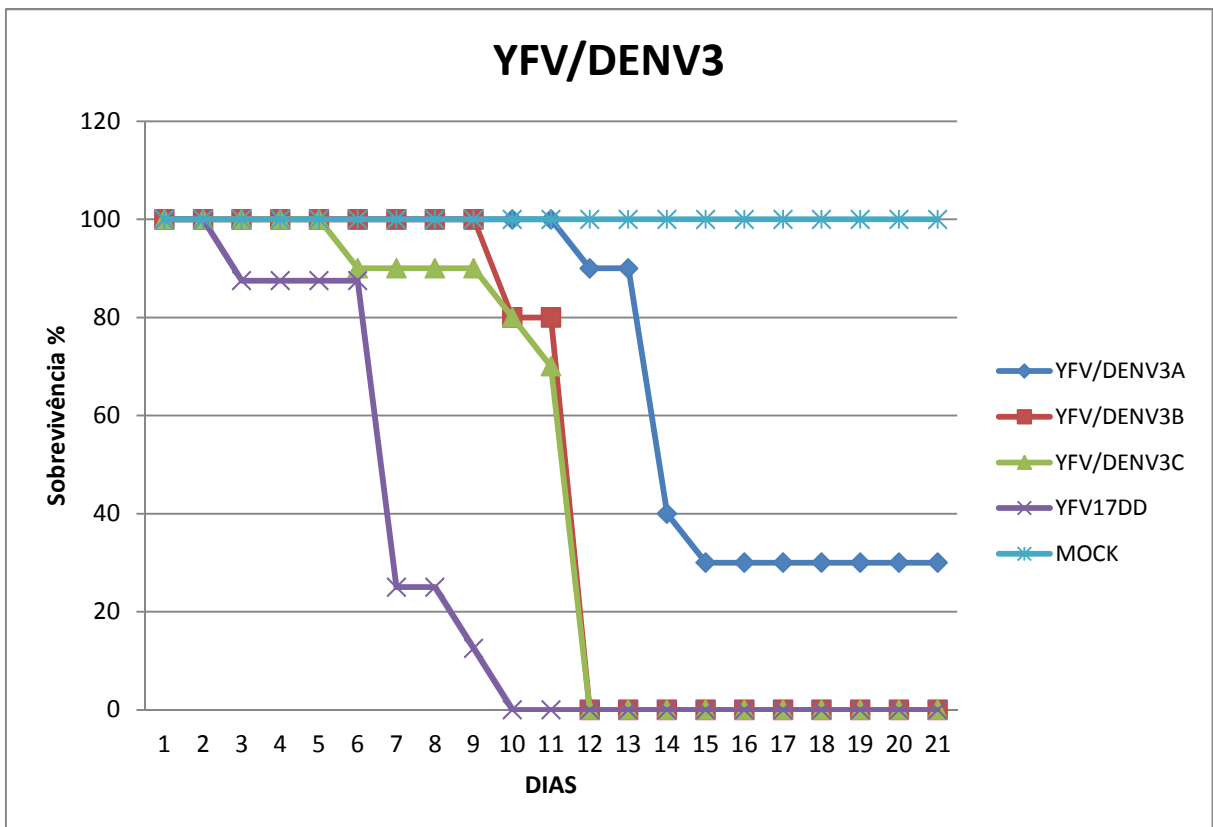
Os melhores resultados entre todos os clones foram obtidos com clone YFV/DENV4: 90% dos animais inoculados com o clone YFV/DENV4A sobreviveram, 30% após a inoculação com YFV/DENV4B e com o clone YFV/DENV4C houve 100% de sobrevivência.



**Figura 4.25:** Neurovirulência dos clones de YFV/DENV1. Foram inoculados 10 animais para cada clone viral. O volume de inóculo foi de 20 µl intracerebral. A figura mostra o grau, em porcentagem de sobrevivência após a inoculação sendo estes avaliados durante 21 dias.

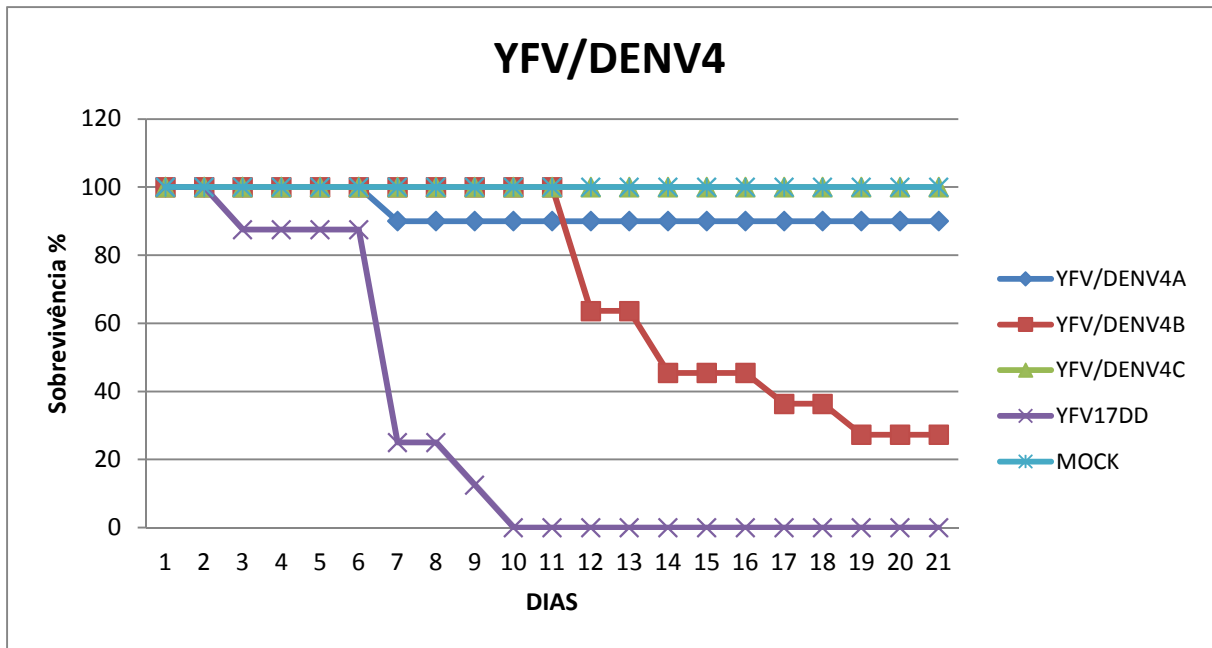


**Figura 4.26:** Neurovirulência dos clones de YFV/DENV2. Foram inoculados 10 animais para cada clone viral. O volume de inóculo foi de 20  $\mu$ l intracerebral. A figura mostra o grau, em porcentagem, de sobrevivência após a inoculação sendo estes avaliados durante 21 dias.



**Figura 4.27:** Neurovirulência dos clones de YFV/DENV3. Foram inoculados 10 animais para cada clone viral. O volume de inóculo foi de 20  $\mu$ l intracerebral. A figura mostra o grau, em porcentagem, de sobrevivência após a inoculação sendo estes avaliados durante 21 dias.





**Figura 4.28:** Neurovirulência dos clones de YFV/DENV4. Foram inoculados 10 animais para cada clone viral. O volume de inóculo foi de 20 µl intracerebral. A figura mostra o grau, em porcentagem, de sobrevivência após a inoculação sendo estes avaliados durante 21 dias.

Os valores dos títulos dos clones virais YFV/DENV1 (PE), YFV/DENV2 (PE), YFV/DENV3 H87 e YFV/DENV4 usados para a inoculação de camundongos neonatos estão representados na tabela 4.16.

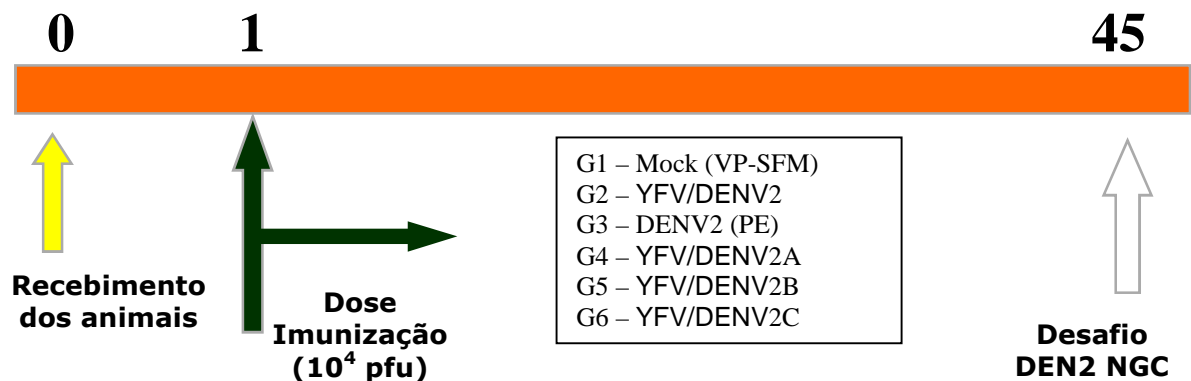
**Tabela 4.16:** Titulação viral pós-inoculação\*.

Back up inóculo Vírus	pfu/dose/20µl	LOG pfu/dose/20µl
YFV/DENV1 D1A	3,83E+03	3,58
YFV/DENV1 D1B	1,10E+02	2,04
YFV/DENV1 D1C	3,93E+02	2,59
YFV/DENV2 D2A	1,45E+03	3,16
YFV/DENV2 D2B	7,40E+02	2,87
YFV/DENV2 D2C	1,13E+03	3,05
YFV/DENV3 D3A	5,83E+02	2,77
YFV/DENV3 D3B	5,60E+02	2,75
YFV/DENV3 D3C	5,97E+02	2,78
YFV/DENV4 D4A	1,08E+03	3,03
YFV/DENV4 D4B	7,20E+02	2,86
YFV/DENV4 D4C	8,20E+02	2,91
MOCK	0,00E+00	0,00
YFV17DD	1,89E+02	2,28

\*Após a inoculação dos camundongos, as amostras foram tituladas para a confirmação da quantidade de input viral que cada grupo recebeu. Os quadrados representam os grupos que não tiveram o valor desejável de inóculo, pois estes foram calculados para  $10^3$  PFU/dose.

#### 4.3.7- Imunogenicidade de vírus quimérico YFV/DENV2 e seus derivados em camundongos.

Este estudo teve o objetivo de avaliar se o vírus YFV/DENV2 e seus derivados estimulam uma resposta imune protetora em camundongos C57/Bl6. Neste teste, fizemos uma única administração de 100µl no coxim-plantar (50µl em cada pata do animal) tendo como grupos controle G1-Mock-meio VP-SFM; G2-YFV/DENV2 (P2) e G3-DENV2 PE (vírus selvagem fonte do cDNA de prM-E utilizado na construção da quimera) em comparação com os grupos dos clones virais, G4-YFV/DENV2A; G5- YFV/DENV2B e G6- YFV/DENV2C, com 16 animais por grupo. Após 45 dias todos os grupos foram desafiados com o vírus D2 NGC neuroadaptado e observados durante 21 dias (Figura 4.29).



**Figura 4.29.** Esquemática do teste de proteção para os clones de YFV/DENV2. Os animais foram divididos em seis grupos de 16 animais com três controles (G1-Mock-meio VP-SFM; G2-YFV/DENV2 e G3-D2WTPE) e três amostras de vírus clonados (G4- YFV/DENV2A; G5- YFV/DENV2B e G6- YFV/DENV 2C). Estes foram imunizados com  $10^4$ PFU/ml e desafiados com DEN2 NGC

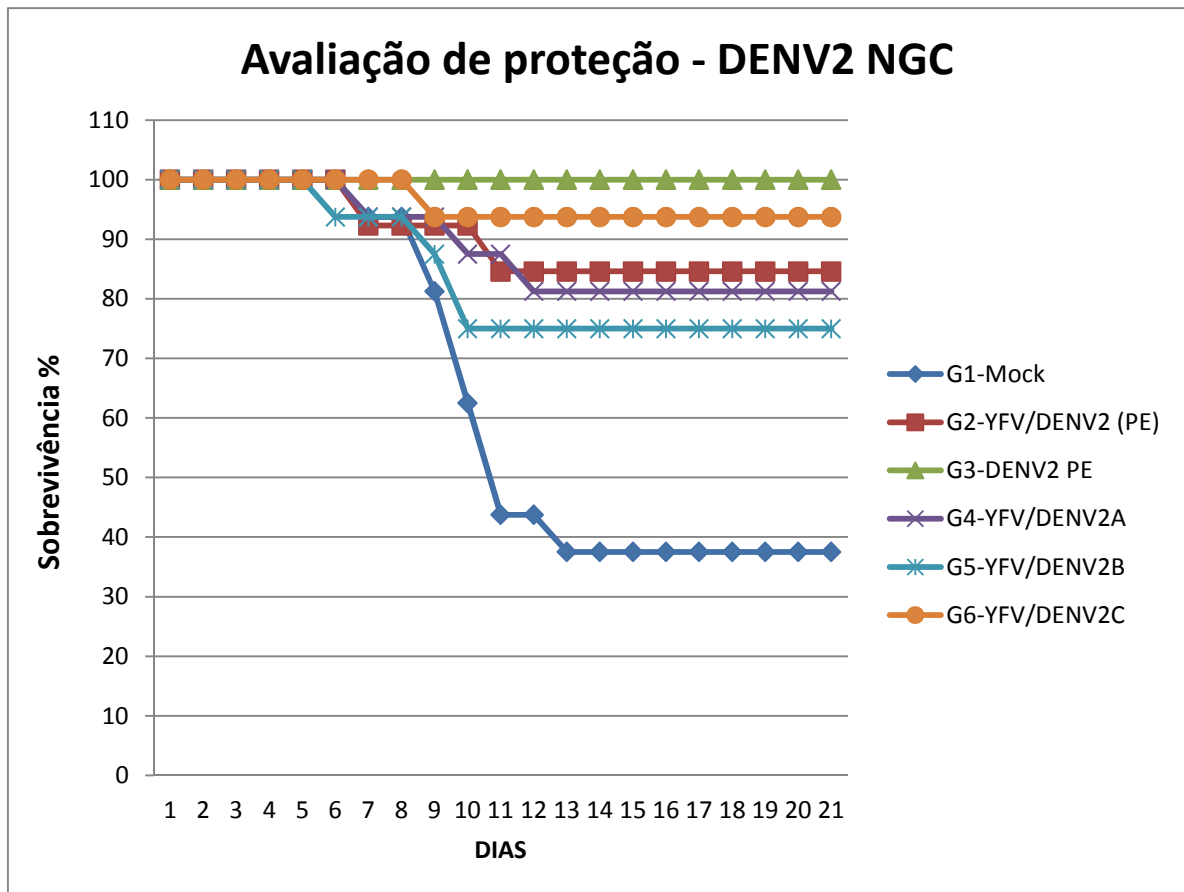
Os resultados mostram que todos os camundongos receberam quantidades similares de inóculo viral na imunização (tabela 4.17).

**Tabela 4.17:** Títulos virais utilizados nas imunizações e no desafio.

Vírus	Back do inóculo PFU/100µl	LOG PFU/100µl
G1-Mock meio de cultura	0,00E+00	0,00
G2-YFV/DENV2 PE	2,90E+04	4,46
G3-D2 WT PE	1,70E+04	4,23
G4- YFV/DENV2A	7,00E+04	4,85
G5- YFV/DENV2B	3,50E+04	4,54
G6-D YFV/DENV2C	4,60E+04	4,66
Vírus Desafio	Back do inóculo PFU/30µl	LOG PFU/30µl
DEN2 NGC	1,10E+04	4,04

Após o desafio, observamos que o grupo G1 (controle negativo) mostrou mortalidade a partir do 7º dia a qual chegou a 62,5% no décimo terceiro dia após o desafio. O grupo controle positivo (DENV2 WT) apresentou 0% de mortalidade mostrando a imunogenicidade do vírus selvagem nesta linhagem de camundongos. Já no G2, cujos animais foram inoculados com o vírus YFV/DENV2 (P2) houve 15,4% de mortalidade (Figura 4.30).

Os grupos imunizados com os clones virais YFV/DENV2A (G4) e YFV/DENV2B (G5) tiveram mortalidade acima do vírus parental (G2) com 18,7% e 25%, respectivamente. Já o clone YFV/DENV2C (G6) mostrou o melhor resultado protegendo 94% dos animais imunizados com este vírus (Figura 4.30).



**Figura 4.30:** Teste de imunogenicidade do vírus YFV/DENV2 PE e seus derivados. Foram inoculados 16 animais para cada grupo viral. O volume de inóculo para imunização foi de 100 µl coxin-plantar, sendo 50 µl em cada pata. Após 45 dias foram desafiados com D2 NGC com  $10^4$ PFU/ml em 30 µl, via intracerebral. A figura mostra o percentual de sobrevivência 21 dias após o desafio.

## 5- DISCUSSÃO

Uma vacina contra dengue segura e eficaz deve proteger contra os quatro sorotipos existentes. Até o momento, não existe nenhuma vacina contra dengue licenciada e diversos grupos de pesquisa utilizam variadas abordagens na tentativa de desenvolver uma vacina tetravalente (Monath, 1999). Nosso grupo vem trabalhando no desenvolvimento de uma vacina contra dengue usando o vírus vacinal 17D como vetor de expressão para antígenos heterólogos (Galler et al, 1997; Bonaldo, 2000; Caufour et al, 2001; Galler et al 2005; Mateu et al 2007).

### 5.1- O desenvolvimento de vírus quiméricos.

Este trabalho consiste no estudo dos vírus quiméricos YFV/DENV1 a 4 construídos através da troca dos genes das proteínas estruturais prM e E do vírus vacinal YFV17D pelos mesmos genes de cada um dos 4 sorotipos de DENV. Para isso, o genoma do vírus da febre amarela foi clonado como cDNA e é nesta forma que é realizada a troca dos genes prM e E de YFV pelos de DENV. Este cDNA quimérico, é transcrito *in vitro* e o RNA resultante transfectado em células Vero em cultura. O RNA viral, no interior de célula permissiva inicia o ciclo viral e vírus infeccioso será liberado no meio de cultura, tendo o envelope de vírus DEN e a maquinaria replicativa do vírus da YFV17D.

Os vírus regenerados, então, foram coletados originando o sobrenadante de transfecção (P0), que é amplificado gerando o lote semente (P1) o qual é amplificado uma vez para produzir o lote de trabalho (P2). Esta dissertação apresenta o estudo da cinética de crescimento em cultura celular, fenótipo de placa de lise, estabilidade genética, teste de neurovirulência e de proteção em camundongos, análise do sequenciamento completo dos clones virais e o cultivo em média escala em meio sem soro dos vírus P2 YFV/DENV1 (PE), YFV/DENV2 (PE), YFV/DENV3H87 e YFV/DENV4.

## 5.2- Propagação de vírus YFV/DENV quiméricos.

Para produção de uma vacina, é necessário que o vírus se replique eficientemente em cultura de célula certificada para produção de vacinas humanas. Células Vero tem sido empregada para tal feito, por ser uma das poucas, na atualidade, aprovadas para uso em produção de vacinas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), o que a torna um excelente modelo para o desenvolvimento de novas vacinas. Esta célula também possui características de alta permissividade a diversos vírus dando bons rendimentos em cultivos virais e por ser adaptar ao crescimento em Biorreatores (FDA, 2000).

Ao avaliar o perfil replicativo do vírus recombinante YFV/DENV1, em meio com soro fetal bovino, vimos que este vírus ao se replicar em uma monocamada de células Vero com 60.000 células/cm<sup>2</sup> e com MOI de 0,002, atingiu no décimo dia um título de 7,0 log<sub>10</sub> PFU/mL. O vírus recombinante ChimeriVax/D1 (Guirakhoo et al. 2004b), equivalente ao nosso YFV/DENV1, alcançou um título de 7,4 log<sub>10</sub> PFU/mL, título muito próximo do obtido por nós. Obtivemos para o vírus recombinante YFV/DENV2 (PE) um título de 7,0 log<sub>10</sub> PFU/mL no décimo dia. Caufour et al (2001) obteve com o vírus recombinante YFV/DENV2 (44/3) um título de 7,4 log<sub>10</sub> PFU/mL no quarto dia, título esse um pouco maior comparado com o recombinante YFV/DENV2 (PE) e de Chambers (2003) com título de 7,0 log<sub>10</sub> PFU/mL no terceiro dia. O vírus recombinante YFV/DENV3 (PE) foi o vírus com o qual obtivemos o menor título (6,0 log<sub>10</sub> PFU/mL). Este vírus parece ter um perfil replicativo inferior já que foi o vírus que apresentou os títulos mais baixos nas curvas de replicação viral. O vírus YFV/DENV4 alcançou um título de 7,0 log<sub>10</sub> PFU/mL no décimo dia, enquanto no trabalho de Chambers (2003) obteve-se um título de 6,0 log<sub>10</sub> PFU/mL no terceiro dia. Uma possível explicação para essa diferença dos títulos encontrado em diferentes trabalhos para vírus equivalentes seria a diferença de cepas virais utilizadas em cada construção uma vez que cDNAs com sequencias contendo divergências foram utilizados. Isto pode levar a diferenças desde o início da infecção com a ligação ao receptor celular até a saída do vírus da célula infectada. Todos os perfis replicativos destes vírus recombinantes foram comparados com os seus respectivos vírus parentais. Observamos que os vírus recombinantes possuem o perfil semelhante aos

vírus dengue parentais<sup>1</sup>, sugerindo que a troca da proteína prM/E, influencia a capacidade replicativa do vírus quimérico.

Pensando no processo produtivo destes vírus, avaliamos o rendimento viral em suporte estacionário do tipo Cell Factory (NUNC). Essa plataforma possibilita a produção de vacinas virais em células aderentes em escala industrial. Inicialmente avaliamos o rendimento viral em cultura de células Vero cultivadas em Cell Factory de duas, quatro e dez camadas, o que equivale a áreas de 1.264 cm<sup>2</sup> (400 mL volume de suspensão viral), 2.528 cm<sup>2</sup> (800 mL) e 6.320 cm<sup>2</sup> (2.000 mL), respectivamente. Os vírus P2 YFV/DENV1(PE), YFV/DENV2 (PE), YFV/DENV3 H87 e YFV/DENV4 Ven88, foram utilizados nestes experimentos.

Os resultados mostrados nos gráficos 4.6 e nas tabelas 4.2 e 4.3 sugerem que os títulos virais seguem o mesmo perfil dos títulos encontrados nas garrafas T-175 cm<sup>2</sup>, o que evidencia que o processo replicativo dos vírus quiméricos é escalonável utilizando garrafas Cell Factory.

### 5.3- Análise da variabilidade genética dos vírus YFV/DENV quiméricos

A tecnologia envolvida na produção de quimeras tem sido utilizada na criação de vacinas atenuadas para flavivirus usando o vírus da febre amarela como vetor de expressão das proteínas de prM-E de outros flavivirus. Para produzir um vírus quimérico, o genoma de RNA viral é primeiro sintetizado por transcrição *in vitro* a partir de um molde de DNA contendo o promotor da RNA-polimerase do fago SP6 na extremidade 5'. Após transfecção de células com o RNA transcrito *in vitro*, a replicação viral começa com a amplificação do genoma que é agora dependente da RNA polimerase do vírus YFV17DD. Em ambos os casos a atividade de RNA polimerase não tem correção de modo que populações de vírus a RNA em geral são constituídas de variantes genéticas em equilíbrio com o tipo predominante. A simples passagem desta população viral em um substrato não usual pode levar à substituição do tipo majoritário por uma das variantes genéticas minoritárias, a qual passa a predominar. Durante o processo de produção de uma vacina, o vírus deve ser passado algumas vezes em culturas de células para a geração de lotes sementes primário e secundário. O volume destes lotes deverá ser adequado para a

---

<sup>1</sup> DENV1 (PE), DENV2 (PE), DENV3 (PE) e o vírus DENV4, entretanto o vírus DENV4 não pode ser comparado com o vírus parental, pois este trabalho iniciou-se quando o vírus selvagem ainda não circulava no Brasil. Entretanto, nos experimentos posteriores a 2010 utilizamos o DENV4 WT como controle.

produção de vacinas por vários anos. É de fundamental importância que a estabilidade genética dos vírus recombinantes seja estudada com objetivo de se estabelecer o número de passagens possível sem que haja o acúmulo de mutações que pudesse comprometer o fenótipo vacinal.

### **5.3.1- Variabilidade genética populacional e seleção de clones virais.**

Inicialmente, foi realizado o sequenciamento completo do genoma dos vírus quiméricos ao nível da segunda passagem (P2) e após vinte passagens sucessivas em células Vero (P20; M&M, item 3.6). Não foi possível derivar a comparação para as quimeras YFV/DENV1 uma vez que por motivos técnicos não foi realizado o sequenciamento do genoma viral da P20. No entanto, observamos muitas mutações no genoma da quimera de YFV/DENV2 (80 mutações, P2 X P20), sendo 57 silenciosas, 17 conservativas e 6 não conservativas. O vírus YFV/DENV3 apresentou sete mutações nucleotídicas, sendo cinco silenciosas e duas com alteração de aminoácido. A quimera YFV/DENV4 também sofreu duas alterações nucleotídicas que alteraram o aminoácido, conforme as tabelas 4.5 e 4.6. Esse grande número de mutações encontradas nas quimeras de DENV na P20 indica uma possível existência de subpopulações na P2 e que uma população foi se fixando ao longo das passagens (Pugachev et al, 2004). Alternativamente, as mutações observadas se acumularam por terem sido positivamente selecionadas durante as passagens consecutivas.

Na tentativa de tornar nossos estoques virais geneticamente mais homogêneos realizamos três rodadas de purificação viral através de plaqueamento, originando um conjunto de 27 clones virais para cada sorotipo. Este resultado é de suma importância, já que ele indicará o melhor clone viral para ser utilizado na preparação de lotes sementes em Boas Práticas de Manufatura e posterior produção de lotes clínicos.

O critério de escolha dos clones virais foi a maior identidade com a região prM/E do vírus quimérico original (P2), informação esta derivada da análise do sequenciamento da região prM e E do genoma de oito clones virais de cada quimera. Após a seleção dos clones, sequenciamos o genoma completo de três clones (A-B-C) de cada sorotipo e as mutações entre a P2 e CP2 foram anotadas (tabela 4.10).

Com o objetivo de saber até quantas passagens o vírus permaneceria estável, analisamos a estabilidade genética dos clones acima em passagens seriadas em células Vero. Fizemos 10 passagens e sequenciamos o genoma dos vírus da CP2 e da CP10, a última passagem. No quadro 7.5 em anexo, observamos a quantidade de mutações não conservativas por sorotipo entre as passagens P2 x CP2 e entre as passagens CP2 x CP10. Os resultados demonstram que houve uma maior incidência de mutações na etapa de seleção dos clones. As mutações acumuladas ao longo das passagens P2 e CP2 mantiveram-se até a passagem CP10 caracterizando, portanto, uma provável adaptação dos vírus recombinantes à propagação em célula Vero. Analisando os clones virais, sob o ponto de vista da estabilidade genômica, pode-se prever uma possível escolha do melhor vírus para fazer parte de uma vacina tetravalente. Os clones YFV/DENV1A, YFV/DENV2A, YFV/DENV3B e YFV/DENV4A são os vírus com menor número de mutações, porém os vírus YFV/DENV1B e YFV/DENV4B ainda não foram sequenciados na CP10 e por isso não podem ser descartados de uma futura escolha. Entretanto, esses vírus devem ser analisados também em testes de imunogenicidade e proteção.

### **5.3.2- Acumulo de mutações em regiões genômicas.**

Os vírus de RNA são vírus que possuem uma taxa de mutação de 10 a 1000 vezes maior do que os vírus de DNA, uma vez que a RNA polimerase não corrige incorporações errôneas durante a síntese (Holland et al.1982). Analisando o vírus da febre amarela 17D, que é o *backbone* dos vírus quiméricos, observam-se populações geneticamente variáveis. O vírus de YFV possuem sítios específicos de heterogeneidade (C-370, NS2A-4013, NS2A-4054, NS3-4612, NS3-4873, NS3-5153, NS4B-7571, NS5-7701 e UTR-10550) (Galler et al.1998; Hahn et al. 1987) e essa variabilidade pode ser esperada também nos vírus recombinantes, já que os mesmos possuem a mesma maquinaria replicativa de febre amarela. Na tentativa de caracterizar os tipos de mutações existentes nos vírus quiméricos, uma hipótese sugerida foi observar se algumas destas alterações estão inseridas nestes sítios de heterogeneidade de YFV. Ao alinharmos todas as nossas amostras e posteriormente analisa-las, verificamos que nenhuma mutação está relacionada aos sítios de heterogeneidade de YFV, dando suporte à hipótese de as mutações observadas serem realmente de cunho adaptativo das quimeras à célula Vero.



Para uma melhor visualização da maior ocorrência de mutações em determinados sítios do genoma viral da vacina Chimerivax, o Anexo 7.2 mostra os locais das mutações para cada clone produzido. Neste estudo observou-se a presença constante de uma mutação na proteína E na posição 1590 ( $K_{E-204}R$ ) da quimera de DENV1 além de uma concentração de mutações na região de NS4B (DENV1 – NS4B<sub>23, 98, 113, 190</sub>; DENV2 – NS4B<sub>177, 182</sub>; DENV3 – NS4B<sub>113, 177</sub>). A primeira modificação ( $K_{E-204}R$ ) foi estudada por Guirakhoo (2004a,b), que observou que os clones quiméricos de DENV1 que possuíam esta alteração na E204 davam origem a vírus com fenótipo de placas de lise maiores, eram menos neurovirulentos em camundongos e tinham uma redução da viremia em macacos. Nas nossas quimeras observamos a alteração E204 somente nos clones de YFV/DENV1, mais especificamente em YFV/DENV1A e YFV/DENV1C, porém neste trabalho observamos uma diminuição do tamanho de placa de lise e não um aumento do tamanho como mencionado por Guirakhoo. As demais modificações encontradas na NS4B, também diferem dos nossos resultados, pois a maioria das mutações encontra-se na região NS5. Acreditamos que essa diferença de resultados entre os dois trabalhos deva-se ao fato de que os vírus recombinantes YFV/DENV terem sido construídos com os genes prM-E de genótipos diferentes de dengue 1 e 3 (Sanofi Pasteur DENV1-I e DENV3-II e Fiocruz DENV1-V e DENV3-V) (Tabela 5.1) ou pela forma de obtenção das cepas, que estão descritas no final da introdução, que pode ter sido influenciado pelo número de passagens e tipo de células, resultando em diferentes processos adaptativos.

**Tabela 5.1.** Genótipos virais utilizadas pela Fiocruz e a Acambis-Sanofi Pasteur para construção dos vírus recombinantes

	Fiocruz	Acambis- Sanofi Pasteur
DENV1	V	I
DENV2	III	III
DENV3	V	II
DENV4	II	II

### 5.3.3- Origem das mutações

Como mencionado anteriormente, a clonagem molecular do genoma viral em bactérias juntamente com a taxa de erro da polimerase do fago SP6 na transcrição in vitro respondem por número indeterminado de mutações, não calculadas neste trabalho. No entanto Pugachev et al (2004) relataram que o erro estimado da SP6

polimerase com os vírus recombinantes Chimerivax é aproximadamente 1,48 incorporações erradas a cada molécula genômica sintetizada e que estes erros estão associados a etapa de transfecção viral.

As taxas de erro da RNA polimerase viral variam de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  erros por nucleotídeo (Domingo e Holland, 1997), assim em um genoma de 10kb as taxas de erro da polimerase podem variar de 0,1 a 10 mutações por genoma sintetizado. Esta produção contínua de mutantes favorece a adaptabilidade dos vírus, mas pode também levar a extinção viral (Lauring et al. 2013; Domingo e Holland 1997). Algumas adaptações podem ser alcançadas por meio de combinações de diferentes mutações e, portanto, a fixação das mesmas pode se dar em diferentes pontos, dependendo da ordem de ocorrência de mutações (Domingo e Holland 1997).

O número total de mutações acumuladas para a quimera YFV/DENV1A foi de quatro mutações, YFV/DENV1B<sup>1</sup> duas mutações, YFV/DENV1C cinco mutações, YFV/DENV2A quatro mutações, YFV/DENV2B cinco mutações, YFV/DENV2C cinco mutações, YFV/DENV3A onze mutações, YFV/DENV3B oito mutações, YFV/DENV3C oito mutações, YFV/DENV4A quatro mutações, YFV/DENV4B<sup>1</sup> nenhuma mutação e YFV/DENV4C três mutações. Observamos, portanto, que o acúmulo de mutações entre as quimeras varia. Os clones quiméricos YFV/DENV1 (PE), YFV/DENV2 (PE), YFV/DENV3 H87 na passagem CP2 acumularam não mais que três mutações não conservativas, enquanto que para YFV/DENV4 houve somente uma mutação não conservativa para o clone C. O mesmo ocorreu nas passagens CP10 com não mais que três mutações com alteração de aminoácido para todos os vírus. Essas mutações correspondem às fixadas após a transfecção e pertenceriam ao grupo de mutações introduzidas pela RNA polimerase do vírus 17D.

No entanto, para uma melhor compreensão da origem das mutações no genoma dos vírus quiméricos, seria necessário o sequenciamento do cDNA, do material regenerado do cDNA (P0), para identificarmos o número de mutações que são introduzidas pelo erro da SP6 RNA polimerase durante as transcrições, eliminando algumas mutações que poderiam não ser adaptativas.

Desta forma se elucidaria se as mutações que ocorreram ao longo das passagens foram devido a um erro originado na clonagem do cDNA em bactéria ou levedura, ou se realmente possuem caráter adaptativo.

---

<sup>1</sup> Os vírus YFV/DENV1B e YFV/DENV4B, não foram sequenciados na passagens CP10.

### 5.3.4- Consequências de mutações

Foram observadas diferenças entre o tamanho de placa de lise das quimeras P2 com seus respectivos vírus parentais. No geral houve um aumento significativo do tamanho de plaque dos vírus DENV1 (PE) para YFV/DENV1 (PE) e DENV2 PE para YFV/DENV2 (PE). O vírus DENV3 H87 IOC possui um tamanho de placa de lise ligeiramente maior do que o YFV/DENV3 H87 e o vírus DENV4 é semelhante à quimera YFV/DENV4.

Essa variação no tamanho das placas de lise foi observada por Caufour et al (2001) ao comparar o vírus recombinante YFV/DENV2 (44/3) com seu parental, sugerindo o efeito predominante da região prM/E sobre o fenótipo de placa de lise viral. Um estudo realizado por Jabor (2001) sobre os determinantes moleculares do tamanho de placa de lise com diferentes clones da vacina de febre amarela 17D, concluiu que o tamanho de placa de lise está associado aos sítios de glicosilação existentes na proteína E e também na NS1. Foram estudadas também algumas mutações na região NS5 e estas não influenciaram o tamanho de placa de lise.

Lorroengsil (2008) estudou uma alteração na proteína E do vírus da encefalite japonesa que possuíam placa de lise pequena e os comparou com o próprio vírus da encefalite sem a mutação na proteína E, a qual apresenta morfologia de placa de lise grande. Lorroengsil observou em estudos realizados em camundongos, que a atenuação viral nem sempre está associada à morfologia de placa pequena. Desta forma a escolha do clone viral de cada sorotipo, não deve estar vinculada ao tamanho do placa de lise. Entretanto, Blaney et al. (2002) analisando algumas mutações nas regiões não estruturais do vírus rDENV4 $\Delta$ 30 do NIH, observaram que algumas alterações fora da região estrutural são capazes de influenciar este fenótipo de placa de lise. Os autores propuseram uma associação entre o tamanho de placa de lise pequeno com atenuação viral em humanos. Esta caracterização do fenótipo por ensaio de placa seria um teste rápido e simples para demonstração de variantes virais nos lotes de trabalho e vacinais.

A vacina de YFV17DD possui um sítio de glicosilação ligado a asparagina (E-153 e E-155). Segundo Jabor (2001) este sítio de glicosilação é um determinante do tamanho de placa de lise para o vírus YFV17D (apresenta fenótipo de placa grande com a N-glicosilação em E-155 e placa pequena na ausência). A proteína E glicosilada teria um limiar de pH mais alto, o que permitiria uma cinética mais lenta de

fusão com a membrana endosomal no prosseguimento do ciclo do vírus no citoplasma. Porém a inexistência da N-glicosilação pode favorecer casos de eventos adversos devido a rápida propagação viral (Jennings et al. 1994 *apud* Jabor, 2001).

Lee et al. (2010) destaca a importância da glicosilação das proteínas E de DENV e de outros flavivírus em duas fases do ciclo de crescimento viral: infectividade e liberação do virion. Em DENV esses sítios estão ligados ao aminoácido N, nas regiões E (N-67 e N-153-155), sendo N-67 exclusivo entre os sorotipos de DENV e N153-155 são conservados entre os flavivírus. Esses pontos são importantes para a entrada do vírus na célula hospedeira, maturação viral, liberação das partículas infecciosas e também conferem afinidade pelas células dendríticas (Mondotte et al. 2007, Lee et al. 2010). Analisamos, então, a existência ou não de mutação nestes sítios de glicosilação, pois caso haja uma alteração de aminoácido, esta poderia inviabilizar a replicação viral e também causar uma diminuição da resposta imune. Não observamos em qualquer um de nossos clones virais mutações nas posições de E envolvidas na N-glicosilação.

Outra abordagem de análise foi identificar o local das mutações na proteína E. Esta proteína pode ser dividida em três domínios (DI, DII e DIII) e uma região terminal hidrofóbica (RH) (Figura 1.3). Os vírus quiméricos apresentaram mutações na região de envelope, tanto na etapa de purificação clonal, quanto na estabilidade genética. Observamos que a metade das mutações, 5/10, está no DII que pode interferir no processo de fusão do envelope viral com a membrana endosomal da célula alvo, atenuando o vírus o que poderia, conseqüentemente, levar a uma diminuição da resposta por anticorpos neutralizantes e não-neutralizantes. (Modis et al. 2004). Uma mutação encontrada neste domínio foi encontrada por Pugachev (2004) na E-204. Esta mutação está relacionada à diminuição do neuro-tropismo em camundongos neonatos. A região hidrofóbica sofreu 4/10 mutações que poderiam acarretar alterações em sua conformação e inserção na membrana do retículo endoplasmático (Alfredo Jabor comunicação pessoal). Apenas uma mutação em dez ocorreu no DI. Este domínio está associado a uma resposta imune predominantemente de anticorpos não-neutralizantes tipo-específico (Hughes et al. 2012). Nenhuma mutação foi encontrada no DIII.

As mutações encontradas ainda não foram todas estudadas com maior detalhamento. Com o objetivo de avaliar a importância de cada mutação no ciclo viral, alguns testes adicionais, como por exemplo: neurovirulência, imunogenicidade e possivelmente uma análise tridimensional das proteínas, deverão ser realizados, a

fim de caracterizar o perfil de todos os clones virais. De posse destes dados é que poderia ser feita uma escolha definitiva dos melhores clones a serem escolhidos para a produção dos lotes sementes em GMP.

#### 5.4- Caracterização fenotípica de vírus YFV/DENV recombinantes

##### **5.4.1- O uso de tamanho de placa de lise como indicador de estabilidade genética.**

É sabido que os flavivirus podem rapidamente acumular mutações durante passagens em célula (Mandl et al. 2001). Sucessivas passagens em célula Vero podem resultar em adaptação do vírus a este substrato, o que conseqüentemente poderia alterar a morfologia das placas de lise causadas pela infecção viral na monocamada celular sob meio semi-sólido. Essas alterações fenotípicas podem geralmente ser explicadas por uma substituição de aminoácido na região de envelope ou até mesmo nas regiões NS1, NS3 e 3'UTR (Blaney et al, 2003). Por exemplo, os clones de YFV/DENV1 (PE) e YFV/DENV2 (PE) inicialmente produziram placas grandes (~1,2 a ~2,0mm) em célula Vero na passagem 2 dos clones (CP2), as quais diminuiriam após as sucessivas passagens em células Vero (estabilidade genética - Gráfico 4.11 e 4.12). Isso indica que durante o processo de seleção dos clones, uma população que antes apresentava heterogeneidade agora é mais homogênea diminuindo assim, a interferência de sub-populações no caráter fenotípico. Essa diminuição no tamanho de placa de lise desses vírus pode estar relacionada com a localização das mutações nas passagens CP2 e CP10. Até a passagem CP2 grande parte das mutações estava localizada na região de NS5, a qual não contém determinantes do tamanho de placa de lise, mas está envolvida a adaptação à célula Vero (Blaney et al. 2003). Entretanto, na CP10, as mutações foram direcionadas para as regiões de prM e E, que neste trabalho indica uma ligação direta ao tamanho de placa de lise. Esses resultados diferem dos resultados encontrados por Guirakhoo (2004a), que após as passagens seriadas em células Vero, os vírus YFV/DENV1 e YFV/DENV2 apresentaram placas de lise com maior diâmetro. Essa diferença pode ser explicada por termos usado diferentes cepas virais nas construções de vírus quimérico, o que possibilita diferentes características fenotípicas. Contudo, Blaney et

al. (2003) relataram que o aumento do tamanho de placa de lise estava associado a uma adaptação à célula Vero. Isso foi observado depois de avaliar algumas mutações nas regiões NS3, NS4B, NS5 e 3' UTR de alguns clones virais comparando com o vírus controle, o qual possui tamanho de placa pequeno e menor capacidade replicativa. Isso nos leva a questionar o caráter das mutações encontradas neste trabalho, pois caso as mutações que ocorreram ao longo das passagens da estabilidade genética não estiverem relacionadas à adaptação, pode vir a ser um problema nas questões regulatórias da vacina. Todavia, essa diminuição do tamanho de placa de lise e seus efeitos devem ser estudados futuramente para esclarecer esse questionamento, já que todos os estudos realizados por Blaney et al. (2003) foram com DENV4.

Os clones de YFV/DENV3 H87 (YFV/DENV3A, YFV/DENV3B e YFV/DENV3C) apresentam um tamanho médio de ~1,0mm e após as dez passagens o clone YFV/DENV3A sofreu uma redução de tamanho, cerca de ~0,3mm, enquanto os outros YFV/DENV3B e YFV/DENV3C aumentaram ~0,47 e ~0,21mm, respectivamente. O genoma do vírus não purificado YFV/DENV3 H87 acumulou menos mutações em relação aos clones, um resultado, portanto, inesperado, já que se esperava que após a seleção dos vírus o número de mutações diminuísse, devido a possível exclusão de sub-populações.

Para o vírus YFV/DENV4 houve uma única mutação resultando na troca de aminoácido na CP10, mas os clones A e B permaneceram estáveis com relação ao fenótipo de placa de lise. Já para o clone YFV/DENV4C, o qual apresentou aumento do tamanho de placa, esse aumento pode estar relacionado com as mutações existentes neste clone, inicialmente da passagem P2 à P9 (CP2) e depois até à CP10, em comparação com o clone YFV/DENV4A.

#### **5.4.2- Atenuação dos clones virais em modelo murino.**

A Vacina de Febre Amarela vem sendo usada na imunização humana desde 1936. Mais de 70 anos se passaram, com mais de 600 milhões de doses administradas, conferindo proteção e eficácia. Entretanto, foram relatados casos adversos graves (~1:250.000) pós-vacinais incluindo viscerotropismo e casos de encefalites (Martin, 2001; Centers for disease control and prevention, 2002). Em dengue, eventos envolvendo o sistema nervoso são raros. Existem alguns casos de

diagnóstico de DENV encefálico, o que indica que o vírus é capaz em algumas situações de cruzar as barreiras do sangue-cérebro e atingir células neurais (Lum, 1996). Já que a nossa candidata a vacina contém maquinaria replicativa de YFV17DD com as proteínas prM e E de DENV, é possível que eventos de encefalites possam ocorrer.

Para avaliar esses eventos, foram feitos experimentos de neurovirulência em camundongos com três semanas de idade e em neonatos com administração intracerebral de  $10^3$ PFU por animal e com o estoque viral não diluído ( $>10^5$ .PFU por animal). Nos animais de 3 semanas observamos que os clones virais não se mostraram neurovirulentos, mesmo quando inoculado em altas concentrações virais, ao contrário do vírus YFV17DD que causou 100% de mortalidade. Já nos neonatos, verificamos uma significativa incidência de mortalidade em todos os grupos, com exceção dos clones de YFV-DENV4 os quais induziram a morte de até no máximo 30% dos animais (clone YFV-DENV4B).

Em outro trabalho, Guirakhoo et al (2004a) revela que uma mutação na quimera de DENV1 na proteína E (na posição 204) foi capaz de reduzir o neurotropismo. De fato, novos estudos de neurovirulência com a CP10 deverão ser realizados para elucidar o perfil de atenuação dos clones de DENV.

#### **5.4.3- Imunogenicidade do vírus quimérico YFV/DENV2.**

Analisamos a imunogenicidade dos clones A, B e C de YFV/DENV2 em um ensaio de proteção de camundongos C57/Bl6 com desafio pelo vírus DENV2 NGC neurovirulento. Observamos que os três clones YFV/DENV2A, YFV/DENV2B e YFV/DENV2C, apresentaram perfis semelhantes de indução de imunidade protetora. O valor de *input* viral pela via intracerebral, quando do desafio, foi o mesmo para todos os clones e podemos dizer que o vírus quimérico YFV/DENV2 (P2) e os clones derivados se mostraram imunogênicos com 93,8% de sobrevivência de animais vacinados com o clone YFV/DENV2C, 84,6% com o YFV/DENV2 (P2), 81,3% com o YFV/DENV2A e 75% com YFV/DENV2B. Deve ser ressaltado que os animais receberam uma única dose vacinal e foram desafiados 45 dias pós-imunização. Caufour et al (2001) mostrou proteção de 85% com a quimera YFV/DENV2 (44/3), com três doses de  $10^5$ pfu/dose antes do desafio. Podemos notar uma diferença

notável entre a quimera de Caufour com as deste trabalho, em relação a resposta protetora e quantidade de imunizações.

### 5.5- Considerações finais

O maior desafio no desenvolvimento contra uma vacina de Dengue é a dificuldade de obtenção de níveis imunogenicidade contra os quatro sorotipos ao mesmo tempo, modelos animais confiáveis e os parâmetros indicativos de imunidade protetora. Seguindo como base um estudo clínico de fase 2b realizado pela Sanofi Pasteur entre os anos de 2009 e 2010 com crianças no distrito de Ratchaburi – Tailândia, este teve como objetivo estabelecer a eficácia contra os quatro sorotipos após a administração de três doses da vacina tetravalente. Os resultados deste estudo mostraram eficácia maior que 70% contra os vírus DENV1, DENV3 e DENV4, entretanto, contra o sorotipo 2 após as três doses não foram alcançados índices maiores que 10% de eficácia (Sabchareon et al. 2012).

A baixa eficácia contra DENV2 é surpreendente, apesar de resultados satisfatórios para os outros sorotipos, o que levou a questionar a solidez do pressuposto de que, para proteger contra o dengue, a vacinação deve induzir anticorpos neutralizantes de forma equilibrada contra os quatro sorotipos. O ensaio de neutralização in vitro (PRNT<sub>50</sub>) é considerado como o mais relevante para medir os anticorpos protetivos contra as infecções por vírus dengue (Sabchareon et al. 2012), mas segundo Rainwater-Lovett (2012) o PRNT<sub>60</sub> seria mais indicado já que ele é mais específico e previne a detecção cruzada de anticorpos neutralizantes, apesar de ser menos sensível. Mas o que é destacado é a inexistência de uma resposta celular, já que os vírus recombinantes não possuem as proteínas não estruturais que estão mais relacionadas a esse tipo de proteção.

Outra justificativa para essa baixa eficácia pode estar relacionada com a cepa utilizada na vacina e o vírus DENV2 que circula na Ásia. O sorotipo DENV2 que circula na Ásia possui três mutações no domínio II da proteína E que poderiam influenciar a infectividade ou fitness viral aumentando o poder de interação celular, conseqüentemente, com maior replicação e possivelmente virulência (Vu et al. 2010 apud Sabchareon et al. 2012). Segundo Sabchareon e colaboradores (2012), a cepa usada na vacina foi testada em primatas não humanos e demonstrou que os soros destes animais neutralizava um amplo repertório de genótipos deste vírus trazidos



de diferentes países. Para responder esses questionamentos, está em andamento um estudo clínico de fase 3 com 30.000 voluntários em dez países na América Latina e na Ásia.

Analisando estas observações, uma interrogação sobre as nossas quimeras entra em questão. Será que os nossos vírus vacinais seguirão o mesmo perfil imunológico? É evidente que existe uma possibilidade de que isso possa ocorrer com a vacina proposta pela FIOCRUZ, entretanto como mencionado acima diferentes cepas podem ser uma alternativa para solucionar o problema e nós utilizamos os genes prM-E de uma cepa de DENV2 diferente da Sanofi Pasteur.

Observando os resultados obtidos pela Sanofi Pasteur, o laboratório de biotecnologia e fisiologia de infecções virais, lotado na Fundação Oswaldo Cruz, liderada pela doutora Ada Maria de Barcelos Alves propôs uma vacina conjugada de DNA com a vacina de vírus vivo atenuado recombinante, já que a vacina de DNA iria induzir uma resposta celular que é inexistente na vacina recombinante YFV/DENV. Esse trabalho foi publicado por Azevedo e colaboradores (2013) e foi observado um sinergismo entre as duas vacinas em camundongos imunizados contra o sorotipo 2 do dengue, obtendo uma resposta celular e humoral contra este sorotipo. Devido ao sucesso em testes pré-clínicos em camundongo, ainda neste ano estará em andamento um teste pré-clínico em PNH. Assim teremos um indicativo melhor sobre a eficiência da vacina conjugada da FIOCRUZ.

## 6- CONCLUSÕES

As conclusões destes estudos são:

- As construções dos vírus recombinantes YFV/DENV prM/E são viáveis, produzindo vírus que replicam eficientemente em culturas de células Vero com propriedades de crescimento similares aos vírus dengue selvagens parentais. Os títulos virais alcançados são satisfatórios para estabelecermos os parâmetros de produção desses vírus.
- A morfologia e o tamanho das placas de lise dos clones virais YFV/DENV1 (PE), YFV/DENV2 (PE) e YFV/DENV4 são homogêneos, enquanto o clone YFV/DENV3 H87 é heterogêneo. As alterações genéticas ao longo das oito passagens de CP2 a CP10 levaram à modificação do fenótipo de tamanho de placa de lise para todos os clones, exceto YFV/DENV4.
- O sequenciamento nucleotídico do estudo da estabilidade genômica mostrou alterações de aminoácido em todos os clones virais, exceto no clone YFV/DENV4, mas essas alterações não inviabilizaram os vírus quanto à replicação e redução do neurotropismo em camundongos lactentes.
- O teste de neurovirulência dos clones virais YFV/DENV1A, YFV/DENV1B, YFV/DENV1C, YFV/DENV2A, YFV/DENV2B, YFV/DENV2C, YFV/DENV3A, YFV/DENV3B, YFV/DENV3C, YFV/DENV4A, YFV/DENV4B e YFV/DENV4C mostrou que os clones não são neurovirulentos em camundongos com três semanas de idade, até quando submetidos a altas concentrações virais, porém possuem tropismo em camundongos neonatos.
- Os resultados obtidos no teste de proteção com os clones de YFV/DENV2 (PE) foram satisfatórios, principalmente para o clone

YFV/DENV2C induzindo imunidade protetora de 93% com apenas uma dose.

- A escolha do clone ideal para produção em área GMP e a metodologia de produção ainda não foi possível com este trabalho. Esta escolha certamente será feita mediante a análise do sequenciamento em conjunto com os testes de imunogenicidade e neurovirulência. Estudos complementares estão sendo desenhados a fim de responder a principal questão que é a escolha dos clones virais. É importante destacar que esta dissertação inclui algumas etapas essenciais do projeto da vacina recombinante dengue/febre amarela e que por isso é de extrema importância a continuação dos estudos.

## REFERÊNCIAS

Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections.** J Clin Microbiol. fevereiro de 2002;40(2):376–81.

Appanna R, Huat TL, See LLC, Tan PL, Vadivelu J, Devi S. **Cross-Reactive T-Cell Responses to the Nonstructural Regions of Dengue Viruses among Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever Patients in Malaysia.** Clin Vaccine Immunol. agosto de 2007;14(8):969–77.

Azevedo AS, Gonçalves AJS, Archer M, Freire MS, Galler R, Alves AMB. **The Synergistic Effect of Combined Immunization with a DNA Vaccine and Chimeric Yellow Fever/Dengue Virus Leads to Strong Protection against Dengue.** PLoS ONE. 2013;8(3):e58357.

Azevedo AS, Yamamura AMY, Freire MS, Trindade GF, Bonaldo M, Galler R, et al. **DNA vaccines against dengue virus type 2 based on truncate envelope protein or its domain III.** PLoS ONE. 2011;6(7):e20528.

Balanço dengue - **Semana Epidemiológica** [Internet]. [citado 24 de fevereiro de 2013]. Recuperado de: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe\\_dengue\\_072011.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_072011.pdf)

Blaney JE Jr, Johnson DH, Manipon GG, Firestone C-Y, Hanson CT, Murphy BR, et al. **Genetic basis of attenuation of dengue virus type 4 small plaque mutants with restricted replication in suckling mice and in SCID mice transplanted with human liver cells.** Virology. 2002 Aug 15;300(1):125–39.

Blaney JE Jr, Manipon GG, Firestone CY, Johnson DH, Hanson CT, Murphy BR, et al. **Mutations which enhance the replication of dengue virus type 4 and an antigenic chimeric dengue virus type 2/4 vaccine candidate in Vero cells.** Vaccine. 2003 Oct 1;21(27-30):4317–27.

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 Suppl 1:215–23.

Brandler S, Lucas-Hourani M, Moris A, Frenkiel M-P, Combredet C, Février M, et al. **Pediatric measles vaccine expressing a dengue antigen induces durable serotype-specific neutralizing antibodies to dengue virus.** PLoS Negl Trop Dis. 2007;1(3):e96.

Castro MG de, Nogueira RMR, Filippis AMB de, Ferreira AA, Lima M da RQ, Faria NR da C, et al. **Dengue virus type 4 in Niterói, Rio de Janeiro: the role of**

**molecular techniques in laboratory diagnosis and entomological surveillance.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. novembro de 2012;107(7):940–5.

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. 5 de novembro de 2001;79(1-2):1–14.

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. **Flavivirus genome organization, expression, and replication.** Annu. Rev. Microbiol. 1990a;44:649–88.

Chambers TJ, Nestorowicz A, Mason PW, Rice CM. **Yellow Fever/Japanese Encephalitis Chimeric Viruses: Construction and Biological Properties.** J Virol. abril de 1999;73(4):3095–101.

Chambers TJ, Liang Y, Droll DA, Schlesinger JJ, Davidson AD, Wright PJ, et al. **Yellow fever virus/dengue-2 virus and yellow fever virus/dengue-4 virus chimeras: biological characterization, immunogenicity, and protection against dengue encephalitis in the mouse model.** J. Virol. 2003 Mar;77(6):3655–68.

Chambers TJ, Nestorowicz A, Rice CM. **Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B/3 cleavage site: determinants of cleavage site specificity and effects on polyprotein processing and viral replication.** J. Virol. março de 1995;69(3):1600–5.

Chambers TJ, Tsai TF, Pervikov Y, Monath TP. **Vaccine development against dengue and Japanese encephalitis: report of a World Health Organization meeting.** Vaccine. outubro de 1997;15(14):1494–502.

Chambers TJ, Weir RC, Grakoui A, McCourt DW, Bazan JF, Fletterick RJ, et al. **Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein.** Proc Natl Acad Sci U S A. novembro de 1990b;87(22):8898–902.

Chaturvedi UC, Shrivastava R, Nagar R. **Dengue vaccines: problems and prospects.** Indian J. Med. Res. maio de 2005;121(5):639–52.

Cleaves GR, Ryan TE, Schlesinger RW. **Identification and characterization of type 2 dengue virus replicative intermediate and replicative form RNAs.** Virology. maio de 1981;111(1):73–83.

Clements DE, Collier B-AG, Lieberman MM, Ogata S, Wang G, Harada KE, et al. **Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys.** Vaccine. 24 de março de 2010;28(15):2705–15.

Costa CAX, Fonseca THS, Oliveira FMS, Santos JFG, Gomes MA, Caliari MV. **Influence of inflammation on parasitism and area of experimental amoebic liver abscess: an immunohistochemical and morphometric study.** Parasit Vectors. 28 de fevereiro de 2011;4:27.

Costa SM, Azevedo AS, Paes MV, Sarges FS, Freire MS, Alves AMB. **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*. 20 de fevereiro de 2007;358(2):413–23.

Costa SM, Yorrio AP, Gonçalves AJS, Vidale MM, Costa ECB, Mohana-Borges R, et al. **Induction of a protective response in mice by the dengue virus NS3 protein using DNA vaccines.** *PLoS ONE*. 2011;6(10):e25685.

Danko JR, Beckett CG, Porter KR. **Development of dengue DNA vaccines.** *Vaccine*. 23 de setembro de 2011;29(42):7261–6.

Domingo E, Holland JJ. **Rna Virus Mutations and Fitness for Survival.** *Annual Review of Microbiology*. 1997;51(1):151–78.

Donalísio MR, Glasser CM. **Entomological surveillance and control of dengue fever vectors.** *Revista Brasileira de Epidemiologia*. dezembro de 2002;5(3):259–79.

Durbin AP, Karron RA, Sun W, Vaughn DW, Reynolds MJ, Perreault JR, et al. **Attenuation and immunogenicity in humans of a live dengue virus type-4 vaccine candidate with a 30 nucleotide deletion in its 3'-untranslated region.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.* novembro de 2001;65(5):405–13.

Durbin AP, Kirkpatrick BD, Pierce KK, Elwood D, Larsson CJ, Lindow JC, et al. **A Single Dose of Any of Four Different Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccines Is Safe and Immunogenic in Flavivirus-naive Adults: A Randomized, Double-blind Clinical Trial.** *J. Infect. Dis.* março de 2013;207(6):957–65.

DVI | denguevaccines [Internet]. **Dengue Overview.** 2013 [citado 1 de março de 2013]. Recuperado de: <http://www.denguevaccines.org/dengue-overview-0>

DVI | denguevaccines [Internet]. **Vaccine Development.** 2013 [citado 1 de março de 2013]. Recuperado de: <http://www.denguevaccines.org/vaccine-development>

DVI | denguevaccines [Internet]. **Why a vaccine.** 2013 [citado 1 de março de 2013]. Recuperado de: <http://www.denguevaccines.org/why-a-vaccine>

Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ. **Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins.** *J Virol.* maio de 1991;65(5):2467–75.

**Fiocruz - Desenvolvimento e validação de um instrumento para avaliar o programa nacional de controle da dengue no âmbito municipal** [Internet]. [citado 24 de fevereiro de 2013]. Recuperado de: <http://bvssp.icict.fiocruz.br/pdf/juniorfgpm.pdf>

Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA, Deubel V. **Dengue Virus Type 1 Nonstructural Glycoprotein NS1 Is Secreted from Mammalian Cells as a Soluble Hexamer in a Glycosylation-Dependent Fashion.** *J Virol.* julho de 1999;73(7):6104–10.

Galler R, Bonaldo MC, Alves AM de B. **Dengue vaccines: closer but not there yet.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. dezembro de 2011;106(8):905–6.

Galler R, Freire MS, Jabor AV, Mann GF. **The yellow fever 17D vaccine virus: molecular basis of viral attenuation and its use as an expression vector.** Braz. J. Med. Biol. Res. fevereiro de 1997;30(2):157–68.

Galler R, Post PR, Santos CND, Ferreira II. **Genetic variability among yellow fever virus 17D substrains.** Vaccine. maio de 1998;16(9–10):1024–8.

Gollins SW, Porterfield JS. **Flavivirus infection enhancement in macrophages: an electron microscopic study of viral cellular entry.** J. Gen. Virol. setembro de 1985;66 ( Pt 9):1969–82.

Gubler DJ. **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.** Clin. Microbiol. Rev. 1 de julho de 1998;11(3):480–96.

Gubler DJ. **Emerging vector-borne flavivirus diseases: are vaccines the solution?** Expert Rev Vaccines. maio de 2011;10(5):563–5.

Gubler DJ. **Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century.** Trends Microbiol. fevereiro de 2002;10(2):100–3.

Guirakhoo F, Arroyo J, Pugachev KV, Miller C, Zhang Z-X, Weltzin R, et al. **Construction, Safety, and Immunogenicity in Nonhuman Primates of a Chimeric Yellow Fever-Dengue Virus Tetravalent Vaccine.** J Virol. agosto de 2001;75(16):7290–304.

Guirakhoo F, Pugachev K, Arroyo J, Miller C, Zhang Z-X, Weltzin R, et al. **Viremia and Immunogenicity in Nonhuman Primates of a Tetravalent Yellow Fever–Dengue Chimeric Vaccine: Genetic Reconstructions, Dose Adjustment, and Antibody Responses against Wild-type Dengue Virus Isolates.** Virology. 20 de junho de 2002;298(1):146–59.

Guirakhoo F, Pugachev K, Zhang Z, Myers G, Levenbook I, Draper K, et al. **Safety and Efficacy of Chimeric Yellow Fever-Dengue Virus Tetravalent Vaccine Formulations in Nonhuman Primates.** J Virol. maio de 2004a;78(9):4761–75.

Guirakhoo F, Zhang Z, Myers G, Johnson BW, Pugachev K, Nichols R, et al. **A Single Amino Acid Substitution in the Envelope Protein of Chimeric Yellow Fever-Dengue 1 Vaccine Virus Reduces Neurovirulence for Suckling Mice and Viremia/Viscerotropism for Monkeys.** J Virol. setembro de 2004b;78(18):9998–10008.

Guirakhoo F, Zhang Z-X, Chambers TJ, Delagrave S, Arroyo J, Barrett ADT, et al. **Immunogenicity, Genetic Stability, and Protective Efficacy of a Recombinant, Chimeric Yellow Fever-Japanese Encephalitis Virus (ChimeriVax-JE) as a Live, Attenuated Vaccine Candidate against Japanese Encephalitis.** Virology. 10 de maio de 1999;257(2):363–72.

Guy B, Almond JW. **Towards a dengue vaccine: progress to date and remaining challenges.** Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. março de 2008;31(2-3):239–52.

Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. **Dengue: a continuing global threat.** Nat. Rev. Microbiol. dezembro de 2010;8(12 Suppl):S7–16.

Hahn CS, Dalrymple JM, Strauss JH, Rice CM. **Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it.** Proc Natl Acad Sci U S A. abril de 1987;84(7):2019–23.

Halstead SB, Marchette NJ. **Biologic properties of dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: studies at the University of Hawaii.** Am. J. Trop. Med. Hyg. dezembro de 2003;69(6 Suppl):5–11.

Halstead SB. **Global epidemiology of dengue hemorrhagic fever.** Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. dezembro de 1990;21(4):636–41.

Halstead SB. **Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology.** Science. 29 de janeiro de 1988;239(4839):476–81.

Heinz FX, Auer G, Stiasny K, Holzmann H, Mandl C, Guirakhoo F, et al. **The interactions of the flavivirus envelope proteins: implications for virus entry and release.** Arch. Virol. Suppl. 1994a;9:339–48.

Heinz FX, Stiasny K, Püschner-Auer G, Holzmann H, Allison SL, Mandl CW, et al. **Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM.** Virology. janeiro de 1994b;198(1):109–17.

Henchal EA, Putnak JR. **The dengue viruses.** Clin. Microbiol. Rev. outubro de 1990;3(4):376–96.

Hughes HR, Crill WD, Chang G-JJ. **Manipulation of immunodominant dengue virus E protein epitopes reduces potential antibody-dependent enhancement.** Virol J. 2012 Jun 18;9:115.

Jabor AV. **Manipulação Genética do Vírus Amarelão Vacinal 17D** [Dissertação de mestrado]. Instituto Oswaldo Cruz; 2001.

Jan L-R, Yang C-S, Trent DW, Falgout B, Lai C-J. **Processing of Japanese Encephalitis Virus Non-Structural Proteins: NS2B-NS3 Complex and Heterologous Proteases.** J Gen Virol. 3 de janeiro de 1995;76(3):573–80.

Khromykh AA, Sedlak PL, Guyatt KJ, Hall RA, Westaway EG. **Efficient trans-Complementation of the Flavivirus Kunjin NS5 Protein but Not of the NS1 Protein Requires Its Coexpression with Other Components of the Viral Replicase.** J Virol. dezembro de 1999;73(12):10272–80.

Kimura T, Ohyama A. **Association between the pH-dependent conformational change of West Nile flavivirus E protein and virus-mediated membrane fusion.** J Gen Virol. junho de 1988;69:1247–54.

Knipe DM, Howley PM. **Fields Virology.** 5<sup>o</sup> ed. 2007.

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. 8 de março de 2002;108(5):717–25.



Lai CJ, Bray M, Men R, Cahour A, Chen W, Kawano H, et al. **Evaluation of molecular strategies to develop a live dengue vaccine.** Clin Diagn Virol. 15 de julho de 1998;10(2-3):173–9.

Lai CJ, Zhao BT, Hori H, Bray M. **Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus.** Proc Natl Acad Sci U S A. 15 de junho de 1991;88(12):5139–43.

Lauring AS, Frydman J, Andino R. **The role of mutational robustness in RNA virus evolution.** Nat. Rev. Microbiol. 2013 May;11(5):327–36.

Lee E, Weir RC, Dalgarno L. **Changes in the dengue virus major envelope protein on passaging and their localization on the three-dimensional structure of the protein.** Virology. 9 de junho de 1997;232(2):281–90.

Lindenbach BD, Rice CM. **Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function.** J. Virol. junho de 1999;73(6):4611–21.

Lindenbach BD, Thiel H-J, Rice , CM. **Flaviviridae: The viruses and their replication.** In: Knipe, DM, Howley, PM. Fields Virology, 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007;(1):1102-1148.

Lourenco-de-Oliveira R, Honorio NA, Castro MG, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Alves JCR, et al. **Dengue virus type 3 isolation from Aedes aegypti in the municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz. setembro de 2002;97(6):799–800.

Mandl CW, Kroschewski H, Allison SL, Kofler R, Holzmann H, Meixner T, et al. **Adaptation of tick-borne encephalitis virus to BHK-21 cells results in the formation of multiple heparan sulfate binding sites in the envelope protein and attenuation in vivo.** J. Virol. 2001 Jun;75(12):5627–37.

Mateu GP, Marchevsky RS, Liprandi F, Bonaldo MC, Coutinho ESF, Dieudonné M, et al. **Construction and biological properties of yellow fever 17D/dengue type 1 recombinant virus.** Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. março de 2007;101(3):289–98.

Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. **Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses.** Nat. Med. dezembro de 2004;10(12 Suppl):S98–109.

Ministério da Saúde - **Portal da Saúde** - [www.Saude.gov.br](http://www.Saude.gov.br) - Principal [Internet]. 2012 [citado 23 de fevereiro de 2013]. Recuperado de: [http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=22207](http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=22207)

Ministério da Saúde - **Portal da Saúde** - [www.Saude.gov.br](http://www.Saude.gov.br) - Principal [Internet]. 2012 [citado 4 de abril de 2013]. Recuperado de: [http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/ap\\_balnco\\_dengue.pdf](http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/ap_balnco_dengue.pdf)

Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. **A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 10 de junho de 2003;100(12):6986–91.

Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. **Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion.** *Nature*. 22 de janeiro de 2004;427(6972):313–9.

Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. **Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein.** *J. Virol.* janeiro de 2005;79(2):1223–31.

Monath TP, Levenbook I, Soike K, Zhang Z-X, Ratterree M, Draper K, et al. **Chimeric Yellow Fever Virus 17D-Japanese Encephalitis Virus Vaccine: Dose-Response Effectiveness and Extended Safety Testing in Rhesus Monkeys.** *J Virol.* fevereiro de 2000;74(4):1742–51.

Monath TP, Soike K, Levenbook I, Zhang ZX, Arroyo J, Delagrave S, et al. **Recombinant, chimaeric live, attenuated vaccine (ChimeriVax) incorporating the envelope genes of Japanese encephalitis (SA14-14-2) virus and the capsid and nonstructural genes of yellow fever (17D) virus is safe, immunogenic and protective in non-human primates.** *Vaccine*. 9 de abril de 1999;17(15-16):1869–82.

Monath TP. **Yellow fever: an update.** *Lancet Infect Dis.* agosto de 2001;1(1):11–20.

Mondotte JA, Lozach P-Y, Amara A, Gamarnik AV. **Essential Role of Dengue Virus Envelope Protein N Glycosylation at Asparagine-67 during Viral Propagation.** *J Virol.* julho de 2007;81(13):7136–48.

Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu X, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al. **Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever.** *Nat Med.* Julho 2003;9(7):921–7.

Morens DM, Marchette NJ, Chu MC, Halstead SB. **Growth of dengue type 2 virus isolates in human peripheral blood leukocytes correlates with severe and mild dengue disease.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.* novembro de 1991;45(5):644–51.

Murgue B. **Severe dengue: questioning the paradigm.** *Microbes and Infection.* fevereiro de 2010;12(2):113–8.

Murphy BR, Whitehead SS. **Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine.** 2011.

Murrell S, Wu S-C, Butler M. **Review of dengue virus and the development of a vaccine.** *Biotechnology Advances.* março de 2011;29(2):239–47.

Nogueira RM, Zagner SM, Martins IS, Lampe E, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. **Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* junho de 1991;86(2):269.

Nogueira RMR, Eppinghaus ALF. **Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* maio de 2011;106(3):255–6.

Nowak T, Wengler G. **Analysis of disulfides present in the membrane proteins of the West Nile flavivirus.** *Virology.* janeiro de 1987;156(1):127–37.

Nunes MRT, Faria NR, Vasconcelos HB, Medeiros DB de A, Silva de Lima CP, Carvalho VL, et al. **Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010-2011**. *Emerging Infect. Dis.* novembro de 2012;18(11):1858–64.

Osanaí C. **A epidemia de dengue em Boa Vista, Território Federal de Roraima, 1981-1982**. [Rio de Janeiro]: Escola Nacional de Saúde Pública; 1984.

Perng GC. **Dengue Vaccines: Challenge and Confrontation**. *World Journal of Vaccines*. 2011;01(04):109–30.

**Portal da Saúde** - www.Saude.gov.br - Principal [Internet]. 2012 [cited 2013 Feb 23]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/8308/162/diminuem-casos-graves-e--mortes-por-dengue-no-pais.html>

Post PR, Carvalho R, Galler R. **Glycosylation and secretion of yellow fever virus nonstructural protein NS1**. *Virus Res.* março de 1991;18(2-3):291–302.

Pugachev KV, Guirakhoo F, Ocran SW, Mitchell F, Parsons M, Penal C, et al. **High fidelity of yellow fever virus RNA polymerase**. *J. Virol.* janeiro de 2004;78(2):1032–8.

Putnak RJ, Collier B-A, 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*. 15 de agosto de 2005;23(35):4442–52.

Qi R, Zhang L, Chi C. **Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design**. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2 de janeiro de 2008;40(2):91–101.

Raviprakash K, Defang G, Burgess T, Porter K. **Advances in dengue vaccine development**. *Hum Vaccin.* agosto de 2009;5(8):520–8.

Raviprakash K, Wang D, Ewing D, Holman DH, Block K, Woraratanadharm J, et al. **A tetravalent dengue vaccine based on a complex adenovirus vector provides significant protection in rhesus monkeys against all four serotypes of dengue virus**. *J. Virol.* julho de 2008;82(14):6927–34.

Ray D, Shi P-Y. **Recent advances in flavivirus antiviral drug discovery and vaccine development**. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* janeiro de 2006;1(1):45–55.

Rebecca C. **FDA-History and Characterization of the Vero Cell Line** [Internet]. 2000. Available from: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/00/backgrd/3616b1a.pdf>

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.* dezembro de 1989;1(3):285–96.

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*. 23 de agosto de 1985;229(4715):726–33.

Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, et al. **Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas.** *Virology*. 14 de abril de 1997;230(2):244–51.

Rico-Hesse R. **Microevolution and virulence of dengue viruses.** *Adv. Virus Res.* 2003;59:315–41.

Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. **Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity.** *Cell. Mol. Life Sci.* agosto de 2010;67(16):2773–86.

Roehrig JT, Bolin RA, Kelly RG. **Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica.** *Virology*. 5 de julho de 1998;246(2):317–28.

Rosen L, Khin MM, U T. **Recovery of virus from the liver of children with fatal dengue: reflections on the pathogenesis of the disease and its possible analogy with that of yellow fever.** *Res. Virol.* agosto de 1989;140(4):351–60.

Rothman AL. **Dengue: defining protective versus pathologic immunity.** *J Clin Invest.* 1 de abril de 2004;113(7):946–51.

Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, et al. **Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial.** *Lancet*. 3 de novembro de 2012;380(9853):1559–67.

Schatzmayr HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP. **An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* junho de 1986;81(2):245–6.

Schmitz J, Roehrig J, Barrett A, Hombach J. **Next generation dengue vaccines: A review of candidates in preclinical development.** *Vaccine*. 23 de setembro de 2011;29(42):7276–84.

Somnue P, Hauhart RE, Atkinson JP, Diamond MS, Avirutnan P. **N-linked glycosylation of dengue virus NS1 protein modulates secretion, cell-surface expression, hexamer stability, and interactions with human complement.** *Virology*. 10 de maio de 2011;413(2):253–64.

Srikiatkachorn A, Rothman AL, Gibbons RV, Sittisombut N, Malasit P, Ennis FA, et al. **Dengue—How Best to Classify It.** *Clin Infect Dis.* 15 de setembro de 2011;53(6):563–7.

Srikiatkachorn A. **Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever.** *Thromb. Haemost.* dezembro de 2009;102(6):1042–9.

Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX. **Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin.** *J. Virol.* novembro de 1997;71(11):8475–81.

Stephenson JR. **Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design.** *Bull. World Health Organ.* abril de 2005;83(4):308–14.

Stocks CE, Lobigs M. **Signal Peptidase Cleavage at the Flavivirus C-prM Junction: Dependence on the Viral NS2B-3 Protease for Efficient Processing**

Requires Determinants in C, the Signal Peptide, and prM. *J Virol.* março de 1998;72(3):2141–9.

Streatfield R, Bielby G, Sinclair D. **A primary dengue 2 epidemic with spontaneous haemorrhagic manifestations.** *Lancet.* 28 de agosto de 1993;342(8870):560–1.

Swaminathan S, Batra G, Khanna N. **Dengue vaccines: state of the art.** *Expert Opin Ther Pat.* junho de 2010;20(6):819–35.

Tauil PL. **Urbanization and dengue ecology.** *Cadernos de Saúde Pública.* janeiro de 2001;17:S99–S102.

Temporão JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, Azevedo R do SS, Nunes MRT, et al. **Dengue Virus Serotype 4, Roraima State, Brazil.** *Emerg Infect Dis.* maio de 2011;17(5):938–40.

Thammapalo S, Chongsuvivatwong V, Geater A, Dueravee M. **Environmental factors and incidence of dengue fever and dengue haemorrhagic fever in an urban area, Southern Thailand.** *Epidemiol. Infect.* janeiro de 2008;136(1):135–43.

Watanabe S, Tan KH, Rathore APS, Rozen-Gagnon K, Shuai W, Ruedl C, et al. **The magnitude of dengue virus NS1 protein secretion is strain dependent and does not correlate with severe pathologies in the mouse infection model.** *J. Virol.* maio de 2012;86(10):5508–14.

Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CKE, Walther P, et al. **Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites.** *Cell Host & Microbe.* 2009 Apr 23;5(4):365–75.

Wengler G, Wengler G. **Cell-associated West Nile flavivirus is covered with E+pre-M protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release.** *J Virol.* junho de 1989;63(6):2521–6.

Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. **Prospects for a dengue virus vaccine.** *Nature Reviews Microbiology.* 2007;5(7):518–28.

WHO | **Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control** [Internet]. WHO. 2009 [citado 24 de fevereiro de 2013]. Recuperado de: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf)

Wilder-Smith A, Gubler DJ. **Geographic Expansion of Dengue: The Impact of International Travel.** *Medical Clinics of North America.* novembro de 2008;92(6):1377–90.

Yamshchikov VF, Compans RW. **Formation of the flavivirus envelope: role of the viral NS2B-NS3 protease.** *J Virol.* abril de 1995;69(4):1995–2003.

Yamshchikov VF, Trent DW, Compans RW. **Upregulation of signalase processing and induction of prM-E secretion by the flavivirus NS2B-NS3 protease: roles of protease components.** *J Virol.* junho de 1997;71(6):4364–71.

Zhang Y, Corver J, Chipman PR, Zhang W, Pletnev SV, Sedlak D, et al. **Structures of immature flavivirus particles.** *EMBO J.* 2 de junho de 2003;22(11):2604–13.

## 7- ANEXO

### 7.1- Preparo de meio e soluções

#### ❖ Meio 199 com sais de Earle completo (199/Earle completo)

Meio 199 com sais de Earle 10X	10% v/v _____	10 ml
NaHCO <sub>3</sub> 4,4% (pH 7,0)	2,5 a 5% v/v _____	2,5 ml ou 5 ml *
SFB inativado (Cutilab)	5% v/v _____	5 ml
Sulfato de gentamicina (4 mg/ml)	1% v/v _____	1 ml
Fungizona (500mg/ml)	0,1% v/v _____	0,1 ml
Água bidestilada q.s.p.		100 ml

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

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

#### ❖ Meio 199 com sais de Earle 2X concentrado (199/Earle 2X)

Meio 199 com sais de Earle 10X	20% v/v _____	20 ml
NaHCO <sub>3</sub> 4,4% (pH 7,0)	10% v/v _____	10 ml
SFB inativado	10% v/v _____	10 ml
Sulfato de gentamicina (4 mg/ml)	2% v/v _____	2 ml
Fungizona (500mg/ml)	0,2% v/v _____	0,2 ml
Água bidestilada q.s.p.		100 ml

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

#### ❖ Meio VP-SFM (invitrogen) Suplementado (Produzir 1L)

Adicionar 50 mL de NaHCO<sub>3</sub> 4,4% (pH 7,0) - [concentração final 5%]  
Adicionar 20 mL de Glutamax [200 mM] – [concentração final 4mM]

❖ **Meio 199 com sais de Earle /CMC (199Earle/CMC)**

Meio 199 com sais de Earle 10X	10% v/v _____	10 ml
NaHCO <sub>3</sub> 4,4% (pH 7,0)	2,5 a 5% v/v _____	2,5 ml ou 5 ml *
SFB inativado	5% v/v _____	5 ml
Sulfato de gentamicina (4 mg/ml)	1% v/v _____	1 ml
Fungizona (500mg/ml)	0,1% v/v _____	0,1 ml
CMC 3% (Sigma) q.s.p.		100 ml

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

❖ **Bicarbonato de sódio 4,4% gaseificado (NaHCO<sub>3</sub>)**

NaHCO <sub>3</sub>	44 g
Vermelho de fenol 1%	1 ml
Água bidestilada q.s.p.	1000 ml

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

❖ **Verseno Solução estoque 5%**

EDTA	50 g
Vermelho de fenol 1%	0,1 ml
Água destilada q.s.p.	1000 ml

Instruções: Misturar e acertar o pH para 7,6 com NaOH 1N. Estocar à temperatura ambiente.

❖ **Tripsina/verseno**

Tripsina estoque	0,5 ml
Verseno	50 ml

Preparar imediatamente antes do uso.

❖ **Soro Fetal Bovino**

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

❖ **Sulfato de gentamicina (Garamicina)**

Uma ampola de Garamicina (2 ml) para 18 ml de água bidestilada estéril.

❖ **Carboximetilcelulose (CMC) 3%**

CMC	3 g
Água bidestilada q.s.p.	100 ml

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

❖ **Agarose 1%**

Agarose (Tipo I-Sigma)	1 g
Água bidestilada q.s.p.	100 ml

Instruções: Misturar, autoclavar (121°C por 20 min) e estocar a 4°C. Na hora do uso aquecer em microondas e aguardar o uso em banho Maria a 42°C.

❖ **Formaldeído 10%**

Formaldeído 37%	1000 ml
Água destilada	2700 ml

Instruções: Preparar e estocar a temperatura ambiente.

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

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

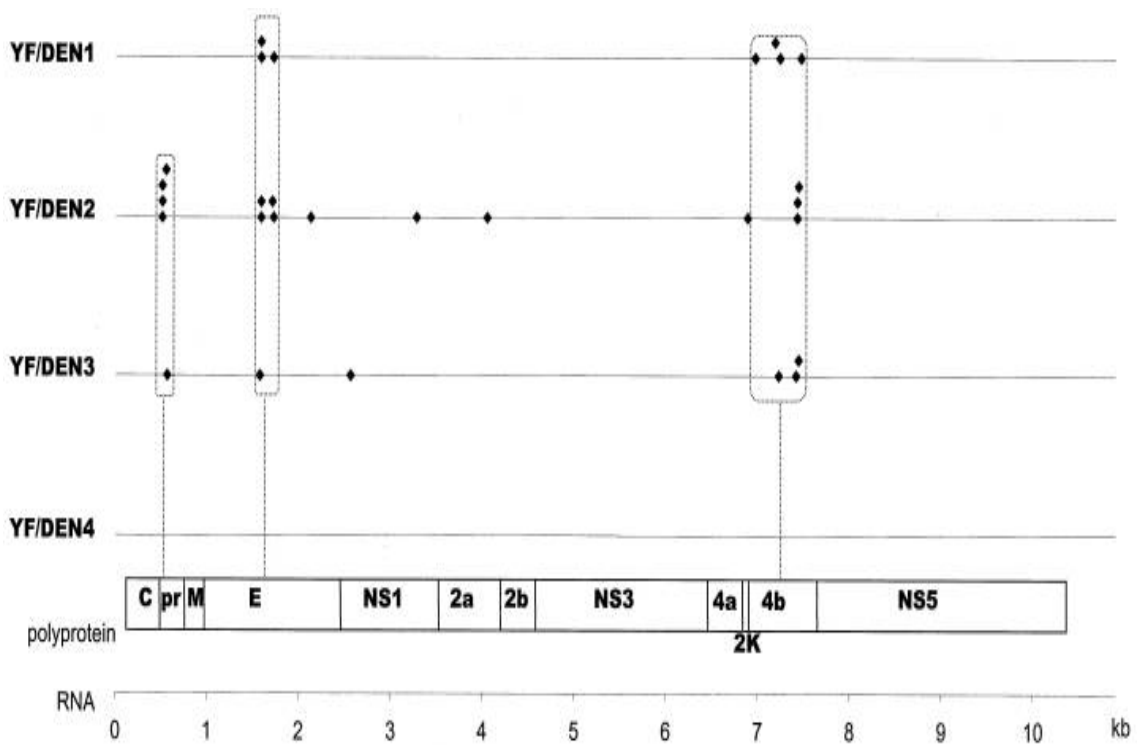
❖ **Solução de Uso (0,04%)**

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

Instruções: Preparar e estocar a temperatura ambiente.



7.2- Figura dos pontos de mutação encontradas pela Sanofi-Pasteur na candidata a vacina contra Dengue ChimeriVax YFV/DENV1, 2, 3 e 4.



**Anexo 7.2:** A figura mostra as mudanças de aminoácido das quatro quimeras (ChimeriVax-DEN) que foram clonadas e as não clonadas na estabilidade genética. A localização das mutações estão destacadas na poliproteína. Fonte: Pugachev, 2004.

## 7.3- Símbolos e siglas dos aminoácidos

Nome	Símbolo	Abreviação	Nomenclatura
Glicina ou Glicocola	Gly, Gli	G	Ácido 2-aminoacético ou Ácido 2-amino-etanóico
Alanina	Ala	A	Ácido 2-aminopropiônico ou Ácido 2-amino-propanóico
Leucina	Leu	L	Ácido 2-aminoisocapróico ou Ácido 2-amino-4-metil-pentanóico
Valina	Val	V	Ácido 2-aminovalérico ou Ácido 2-amino-3-metil-butanóico
Isoleucina	Ile	I	Ácido 2-amino-3-metil-n-valérico ou ácido 2-amino-3-metil-pentanóico
Prolina	Pro	P	Ácido pirrolidino-2-carboxílico
Fenilalanina	Phe ou Fen	F	Ácido 2-amino-3-fenil-propionico ou Ácido 2-amino-3-fenil-propanóico
Serina	Ser	S	Ácido 2-amino-3-hidroxi-propionico ou Ácido 2-amino-3-hidroxi-propanóico
Treonina	Thr, The	T	Ácido 2-amino-3-hidroxi-n-butírico
Cisteína	Cys, Cis	C	Ácido 2-bis-(2-amino-propionico)-3-dissulfeto ou Ácido 3-tiol-2-amino-propanóico
Tirosina	Tyr, Tir	Y	Ácido 2-amino-3-(p-hidroxifenil)propionico ou paraidroxifenilalanina
Asparagina	Asn	N	Ácido 2-aminossuccinâmico
Glutamina	Gln	Q	Ácido 2-aminoglutarâmico
Aspartato ou Ácido aspártico	Asp	D	Ácido 2-aminossuccínico ou Ácido 2-amino-butanodióico
Glutamato ou Ácido glutâmico	Glu	E	Ácido 2-aminoglutárico
Arginina	Arg	R	Ácido 2-amino-4-guanidina-n-valérico
Lisina	Lys, Lis	K	Ácido 2,6-diaminocapróico ou Ácido 2, 6-diaminoexanóico
Histidina	His	H	Ácido 2-amino-3-imidazolpropionico
Triptofano	Trp, Tri	W	Ácido 2-amino-3-indolpropionico
Metionina	Met	M	Ácido 2-amino-3-metiltio-n-butírico

Fonte: wikipédia

## 7.4- Imagens do fenótipo de placa de lise em tamanho real

Placa: D1A P2



Placa: D1A P10



D1B P2



D1B P10



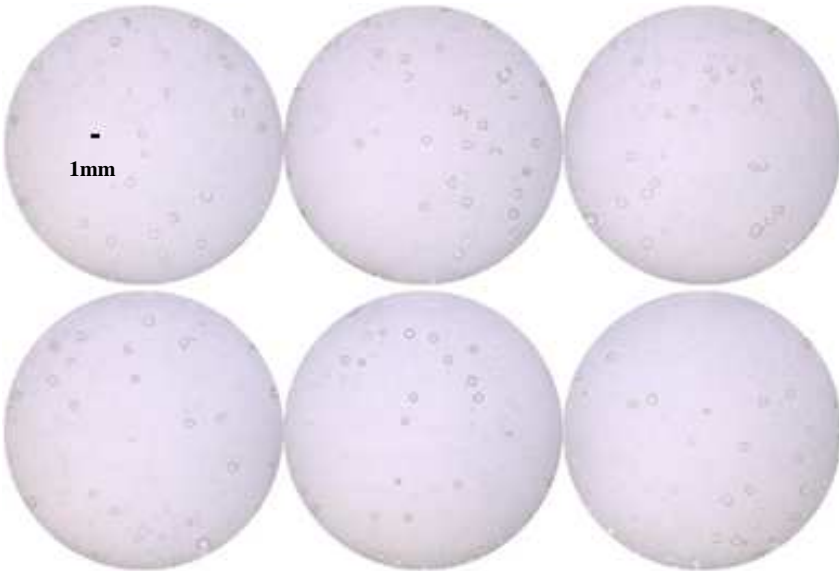
D1C P2



D1C P10



Placa: D1 P10 anterior



FA/D1 PE



D2A P2



D2A P10



D2B P2



D2B P10



D2C P2



D2C P10





D2 P10 anterior



FA/D2 PE P2



D3A P2





D3A P10



D3B P2



D3B P10



D3C P2



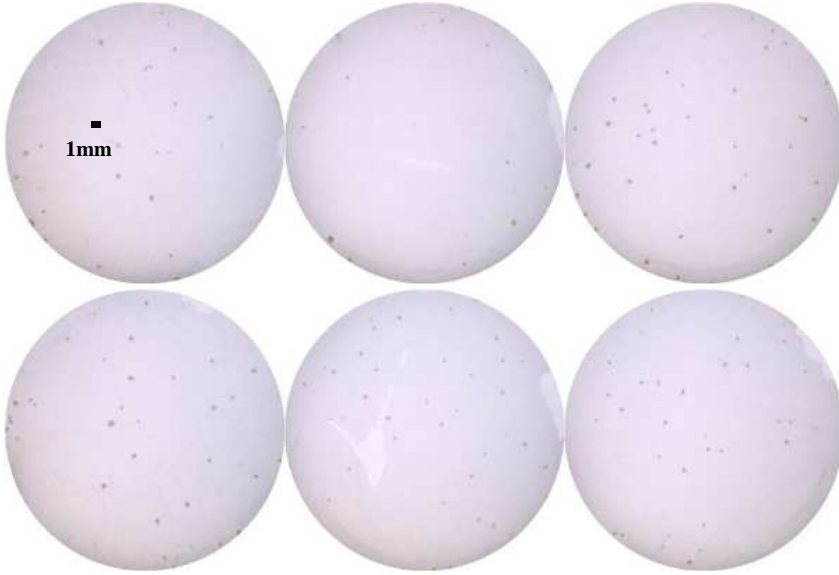
D3C P10



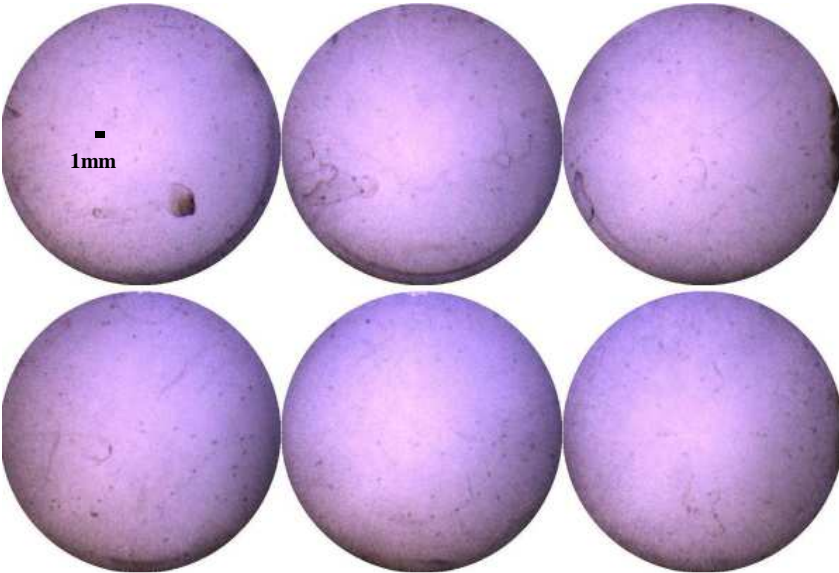
D3 P10 anterior



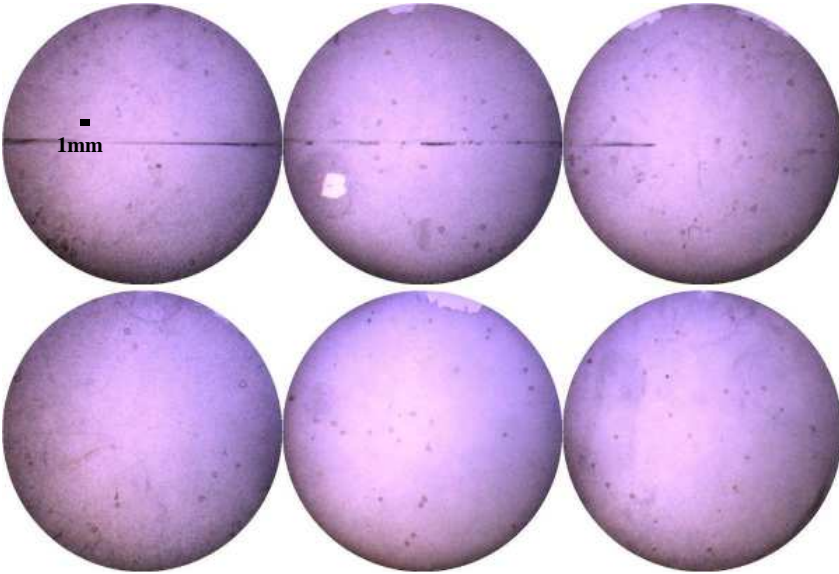
FA/D3 H87



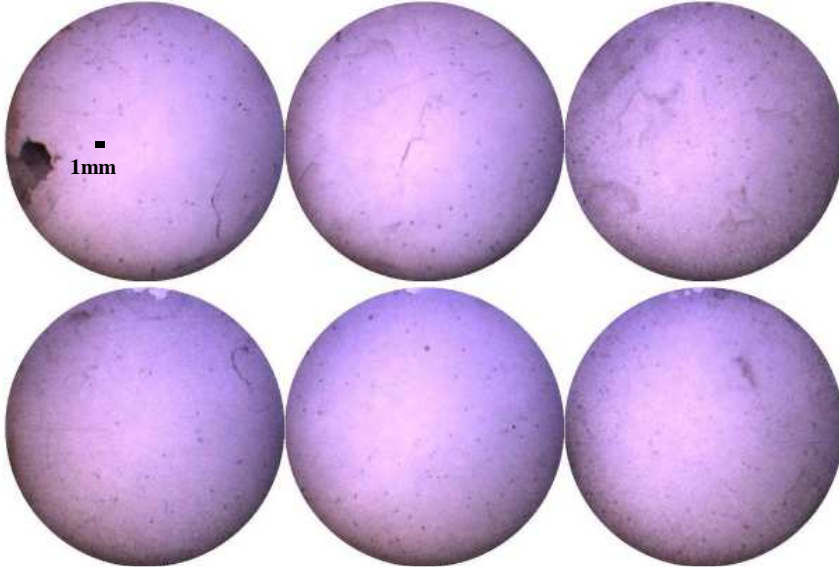
D4A P2



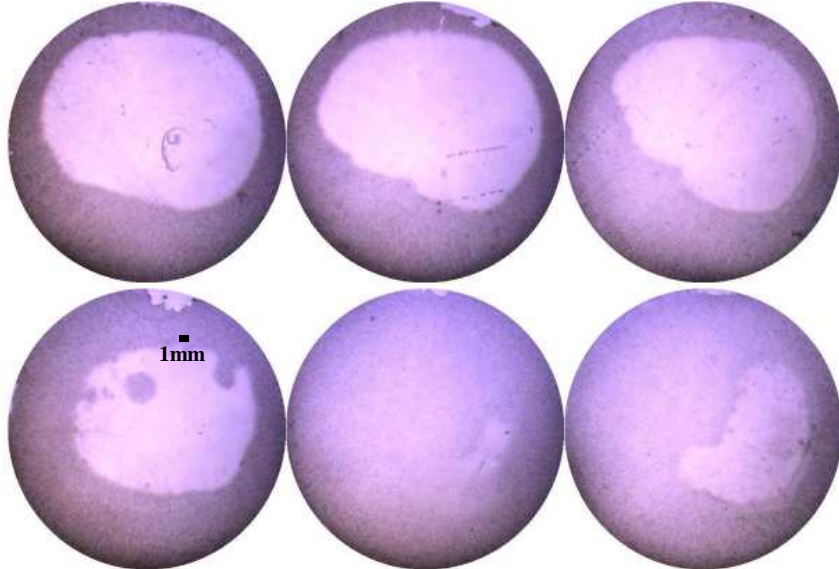
D4A P10



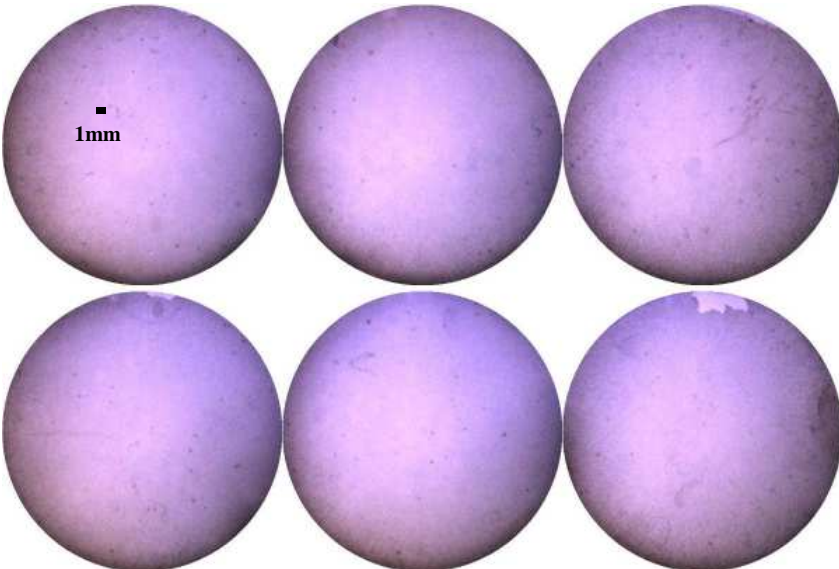
D4B P2



D4B P10

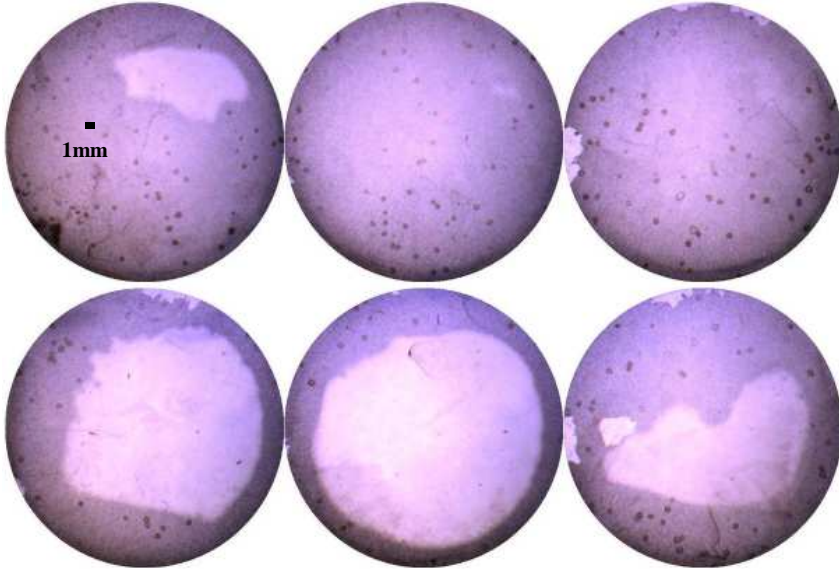


D4C P2

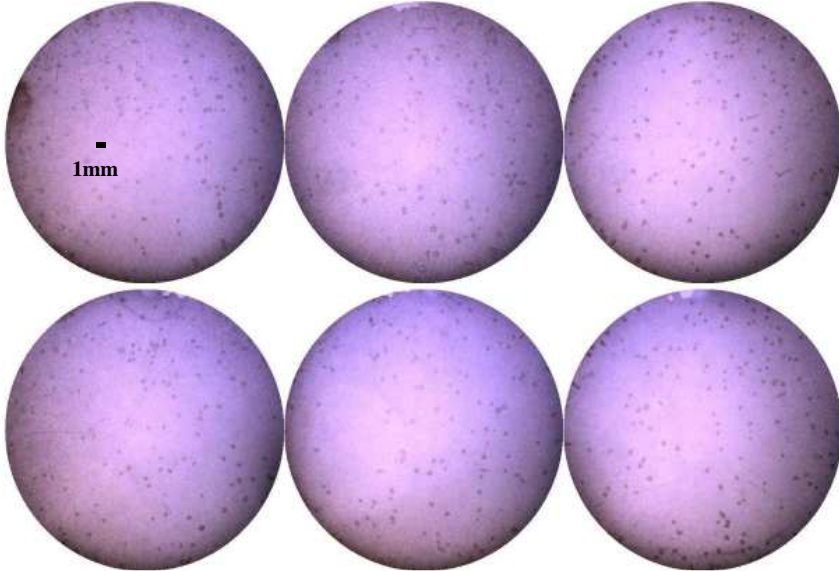




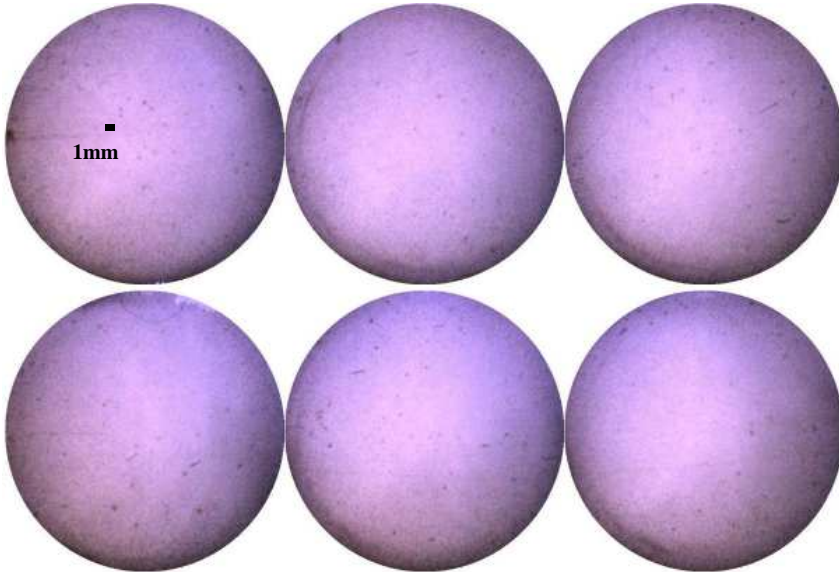
D4C P10



D4 P10 anterior



FA/D4



## 7.5- Resultados de forma resumida da dissertação

Vírus	Curva de Crescimento T-175	Fenótipo (média/desvio)	Sequenciamento P2 x CP2	Estabilidade Genética CP2 x CP10	Teste Neurovirulência (Sobrevivência)			Desafio DEN2 Proteção
					3 Semanas 10 <sup>3</sup> PFU	3 semanas 10 <sup>0</sup> PFU	Neonatos 10 <sup>3</sup> PFU	
FA/D1 L#3223 (D1A)	7,65	2,06 (+/-0,31)	2/1 <sup>1</sup>	2/1 <sup>1</sup>	10/10	10/10	0/10	-
FA/D1 M#3211 (D1B)	8,60	1,17 (+/-0,24)	2/1 <sup>1</sup>	Não Seq	10/10	10/10	2/10	-
FA/D1 L#3224 (D1C)	7,65	1,69 (+/-0,38)	1/1 <sup>1</sup>	4/2 <sup>1</sup>	10/10	10/10	0/10	-
FA/D2 M#3232 (D2A)	6,83	2,02 (+/-0,31)	3/2 <sup>1</sup>	1/1 <sup>1</sup>	10/10	10/10	1/10	D2C>D2A>D2B
FA/D2 L#32211 (D2B)	7,61	1,68 (+/-0,36)	3/2 <sup>1</sup>	2/2 <sup>1</sup>	10/10	10/10	7/10	
FA/D2 L#32222 (D2C)	6,83	1,59 (+/-0,35)	3/2 <sup>1</sup>	2/2 <sup>1</sup>	10/10	10/10	3/10	
FA/D3 S#32121 (D3A)	7,68	1,01 (+/-0,35)	9/2 <sup>1</sup>	2/0 <sup>1</sup>	8/10	10/10	3/10	-
FA/D3 S#32312 (D3B)	7,68	1,00 (+/-0,36)	8/2 <sup>1</sup>	-	10/10	10/10	0/10	-
FA/D3 S#32213 (D3C)	7,63	0,99 (+/-0,34)	8/3 <sup>1</sup>	-	10/10	10/10	0/10	-
FA/D4 M#32231 (D4A)	6,62	0,73 (+/-0,11)	-	4/2 <sup>1</sup>	10/10	10/10	9/10	-
FA/D4 M#32233 (D4B)	6,62	0,72 (+/-0,12)	-	Não Seq	10/10	10/10	3/10	-
FA/D4 M#32113 (D4C)	6,62	0,67 (+/-0,11)	1/1 <sup>1</sup>	2/2 <sup>1</sup>	10/10	10/10	10/10	-

Quadro 5.1. Todos os resultados envolvendo os clones virais estão descritos neste quadro como forma de análise comparativa entre eles. Entre os clones DEN1, o vírus D1B obteve o melhor resultado, porém não teve o seu material genético sequenciado na CP10. DEN2, o vírus D2C obteve o melhor resultado, segundo o critério de desafio, pois nos outros testes mostrou-se similar aos demais. DEN3, o vírus D3A obteve melhor resultado em camundongos neonatos, porém apresentou um maior número de mutações. DEN4, o vírus que atingiu os melhores resultados foi o D4C.

<sup>1</sup> o número indica as mutações de aminoácido entre o total de mutações.