



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

*Expressão da proteína NS1 do vírus da Febre Amarela em sistema procariótico (*E.coli*) e eucariótico (células de inseto) visando o uso dessa proteína como insumo para diagnóstico*

Lorena Carvalho de Souza Chaves

Brasília
Fevereiro/2012



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

*Expressão da proteína NS1 do vírus da Febre Amarela em sistema procariótico (*E.coli*) e eucariótico (células de inseto) visando o uso dessa proteína como insumo para diagnóstico*

Lorena Carvalho de Souza Chaves

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular

Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Brasília

Fevereiro/2012

Banca examinadora:

Dr. Bergmann Morais Ribeiro (Orientador) – Universidade Brasília - UnB

Dra. Eliane Ferreira Noronha – Universidade de Brasília – UnB

Dr. José Raimundo Corrêa – Universidade de Brasília – UnB

Suplente:

Dra. Maria Elita Batista de Castro – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha mãe, Graça, que sempre foi fundamental nas minhas escolhas e decisões. Mãe, além de amiga, você é a grande professora da minha vida, obrigado! Ao meu marido e melhor amigo, Marcus, obrigado pelo carinho e compreensão nas horas difíceis, você é e sempre será meu grande amor.

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos...

À Deus, sem ele nada faria sentido e eu não teria tido calma e força de vontade para finalizar esse trabalho.

À minha mãe, Graça, que sempre me incentivou a prosseguir com os estudos e nunca desistir. Obrigada pelo carinho e sabedoria. Te amo.

À minha irmã, Larissa, por ser um exemplo de determinação e força de vontade. Te amo.

Ao meu marido, Marcus, por todo incentivo, paciência e compreensão, que foram fundamentais nos momentos difíceis. Te amo.

Ao professor Dr. Bergmann Morais Ribeiro, que me recebeu em seu laboratório de braços abertos e transmitiu toda a segurança possível para que eu pudesse concluir esse trabalho. Obrigada pela oportunidade.

Aos professores Dr. Renato Resende e Dr. Tatsuya Nagata por sempre estarem abertos a responder minhas perguntas e por toda ajuda.

À professora Dra. Anamélia Bocca, por sua colaboração e sugestões.

Ao aluno da professora Dra. Anamélia Bocca, Márcio Sousa Jerônimo, por sua ajuda com o anti-soro e pela experiência adquirida.

À professora Dra. Maria Elita Castro, pelo conhecimento adquirido durante todos os anos de estágio sob sua orientação.

Às queridas amigas, Anabele, Briana e Carol, pela amizade, ajuda e carinho durante o mestrado, espero que nossa amizade cresça cada dia mais. Obrigada!

Aos queridos amigos, Fabrício, Miguel e Fernando, pela ajuda, amizade e brincadeiras, que transformaram o laboratório em um lugar agradável e divertido.

Ao querido amigo Roberto, que divide a bancada comigo e me aguenta todos os dias. Beto, você é parte fundamental nessa conquista. Obrigada!

Ao querido amigo Daniel, por toda a ajuda, sabedoria, experiência e paciência comigo. Obrigado por ser essa pessoa especial e ser tão altruísta. Você é um amigo.

Às amigas do laboratório, Dani, Fábria, Mariana Senna e Lea, que fazem os meus dias mais felizes.

Aos amigos de uma vida inteira, Kallyne, Flavia, Arthur, Vinicius, Tereza, Alessandra, Marcos, Arlene, Kamila, Tia Naiá, Marlua, Amanda e Mônica, que sempre torceram pelas minhas conquistas. Amo vocês!

À minha família em geral (Carvalho, Souza, Passarinho e Chaves), pela compressão nas ausências, carinho e torcida.

Ao CNPq e UnB pelo apoio financeiro e oportunidade.

A todos que torceram e acreditaram nessa vitória. Obrigada!

*Procure ser uma pessoa de valor, em vez de procurar ser uma
pessoa de sucesso. O sucesso é consequência...*

Albert Einstein

Resumo

Febre amarela é uma doença infecciosa, endêmica nas florestas tropicais da África, Américas Central e do Sul. O agente etiológico da febre amarela é o vírus da febre amarela pertencente ao gênero *Flavivirus*, e espécie-tipo da família Flaviviridae. O genoma contém 10.233 pares de bases (bp), que codifica as proteínas estruturais (Capsídeo – C, Membrana – Pré M/M, Envelope – E) e não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). NS1 é um gene essencial requerido para replicação eficiente do RNA viral. O diagnóstico mais utilizado para febre amarela é o teste MAC-ELISA para a detecção de IgM (pesquisa de anticorpos recentes). As reações cruzadas entre o vírus amaralíco e outros flavivirus são fatores que dificultam o diagnóstico sorológico, principalmente em áreas endêmicas de múltiplos flavivirus. Desta forma, nesse trabalho, a proteína NS1 do vírus da febre amarela foi expressa em sistemas procariótico (*Escherichia coli*) e eucariótico (células de inseto) com o objetivo de utilizá-la no diagnóstico precoce de infecção pelo vírus da febre amarela. Para expressão da proteína NS1 de YFV em sistema procariótico, foi utilizado o sistema de recombinação sítio específica Gateway® (Invitrogen). A proteína recombinante expressa em *E. coli* foi purificada e inoculada em camundongos para produção do antisoro policlonal anti-NS1. Para expressão da proteína NS1 em sistema eucariótico, foi utilizada a técnica de transposição sítio específica Bac-to-Bac® (Invitrogen). O gene NS1 foi fusionado ao gene da poliedrina do baculovírus AcMNPV e introduzido no genoma viral. O vírus recombinante foi usado para infectar células de inseto e a proteína recombinante foi detectada por *Western blot*. Ambos os sistemas de expressão foram utilizados com sucesso e as proteínas recombinantes serão testadas como antígenos para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico de infecção pelo vírus da febre amarela.

Palavras chaves: NS1; Baculovírus; Febre Amarela; Poliedrina; AcMNPV.

Abstract

Yellow Fever is an infectious disease, endemic in African, Central and South American tropical forests. The etiologic agent of the yellow fever is the Yellow Fever Virus belonging to the genus *Flavivirus*, and the type-species of the family Flaviviridae. The genome has 10.233 base pairs (bp), which encodes structural (Capsid – C, Membrane – Pre M/M, Envelope – E) and non-structural (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) proteins. NS1 is an essential gene required for an efficient RNA viral replication. The most used diagnosis test to confirm yellow fever is the MAC-ELISA for the detection of IgM (survey about recent antibodies). The cross-reactivities between the amarilic virus and other flaviviruses are factors that hinder the serological diagnosis, especially in endemic areas with multiple flaviviruses. Hence, in this work, the NS1 protein of the yellow fever virus was expressed in prokaryotic (*Escherichia coli*) as well as in eucariotic systems (insect cells) with the aim of using this protein in the early diagnosis of yellow fever virus infection. For the expression of the YFV NS1 protein in a prokaryotic system it was used the site-specific recombinant system Gateway® (Invitrogen). The recombinant protein expressed in *E. coli* was purified and inoculated in mice for the production of polyclonal anti-serum anti-NS1. For the expression of the NS1 in a eukaryotic system, the Bac-to-Bac® (Invitrogen) site-specific transposition was used. The NS1 gene was fused to the polyhedrin gene of the baculovirus AcMNPV and introduced into the viral genome. The recombinant virus was used to infect insect cells and the recombinant protein detected by *Western blot*. Both expression systems were used with success and the recombinant proteins will be tested as antigens for the development of new diagnostic methods for yellow fever virus infection.

Key-words: NS1; Baculovirus; Yellow Fever; Polyhedrin; AcMNPV.

Índice de figuras

Figura 1. Mosquitos transmissores da febre amarela	17
Figura 2. Ciclos epidemiológicos (silvestre e urbano) da febre amarela.	19
Figura 3. Estrutura genômica do vírus da febre amarela.	28
Figura 4. Representação esquemática da partícula de flavivirus e ciclo de infecção viral	32
Figura 5. Processo inicial de infecção viral no intestino médio de uma lagarta infectada por baculovírus.	37
Figura 6. Bac-to-Bac® Expression System	42
Figura 7. Infecção de uma célula bacteriana por um bacteriófago.	46
Figura 8. A tecnologia Gateway®.	47
Figura 9. Mapa físico do plasmídeo pGem – YFV NS1	51
Figura 10. Mapa físico do plasmídeo pFastBac1/AccI-PSX.....	53
Figura 11. Esquema representativo da clonagem do gene NS1 através de fusão com o gene da poliedrina de AcMNPV.....	54
Figura 12. Mapa físico do plasmídeo comercial pENTR™ 11	57
Figura 13. Mapa físico do plasmídeo comercial pDEST™ 17.....	58
Figura 14. Mapa físico do plasmídeo pFasTBac1/AccI-PSX NS1	65
Figura 15. Gel de agarose 0.8% mostrando os fragmentos gerados pela digestão do plasmídeo pFastBac1/Acc-PSX NS1 com as enzimas de restrição <i>EcoRI</i> e <i>Sal I</i>	66
Figura 16. Sequência do gene NS1 fusionado ao gene da poliedrina.....	68
Figura 17. Colônias brancas geradas pela transformação do plasmídeo pFastBac1/Acc- PSXNS1 em células DH10Bac™.....	69

Figura 18. Efeito citopático da infecção de células BTI-Tn5B1-4 com diferentes baculovírus	70
Figura 19. Análise do perfil da proteína recombinante NS1 fusionada à proteína poliedrina em células de inseto.....	71
Figura 20. Mapa físico do plasmídeo pENTR11-NS1 e gel de agarose 0.8 % mostrando a confirmação da clonagem.	72
Figura 21. Mapa físico do plasmídeo pDEST17-NS1.....	73
Figura 22. Gel de agarose 0.8 % mostrando a confirmação da obtenção do plasmídeo pDEST17-NS1.....	74
Figura 23. Análise do perfil de expressão da proteína NS1 em <i>E. coli</i>	75
Figura 24. Análise do grau de pureza da proteína NS1 e sua detecção.	76
Figura 25. <i>Dot blot</i> realizado para analisar a especificidade do anti-soro policlonal anti-NS1	77
Figura 26. SDS-PSGE 12 % das amostras vAcOcc+, vSynNS1 e 3 diferentes clones do vírus recombinante vAcPolNS1.	78
Figura 27. <i>Western blot</i> confirmando a marcação das proteínas NS1 com o anti-soro policlonal anti-NS1.....	79

Índice de tabelas

Tabela 1. Quadro clínico de pacientes infectados com febre amarela.....	21
Tabela 2. Lista de oligonucleotídeos utilizados no trabalho.	51

Abreviaturas e símbolos

Amp	ampicilina
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
DENV	vírus da dengue
dNTP	deoxinucleotídeos
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
g	grama
h	hora
h p.i.	horas após infecção
HCl	ácido clorídrico
IPTG	isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
kDa	quilodaltons
L	litro
M	molar: mol/L
MW	peso molecular
mg	miligrama = 10^{-6} grama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
NaCl	cloreto de sódio

NaOH	hidróxido de sódio
NBT	<i>Nitro blue tetrazolium chloride</i>
ng	nano grama
bp	pares de base
PBS	tampão fosfato salino
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial de hidrogênio
RT-PCR	transcriptase reversa- PCR
RNA	ácido ribonucléico
r.p.m.	rotação por minuto
s	segundo
SDS	dodecilsulfato de sódio
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
U	unidade enzimática
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactopiranosídeo
YFV	vírus da febre amarela
μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar (micromol por litro)
μm	micrometro
° C	grau Celsius

Índice

1. Introdução.....	17
1.1. Febre Amarela	17
1.1.1. Epidemiologia.....	18
1.1.2. Manifestações clínicas e alterações laboratoriais	20
1.1.3. Diagnóstico.....	22
1.1.4. Tratamento e prevenção.....	25
1.1.5. Vírus da Febre Amarela.....	27
1.1.6. NS1	33
1.2. Baculovírus.....	35
1.2.1. Taxonomia.....	35
1.2.2. Partícula viral e modo de infecção <i>in vivo</i>	36
1.2.3. Modo de infecção <i>in vitro</i> e regulação gênica.....	38
1.2.4. Baculovírus como vetor de expressão	39
1.3. <i>Escherichia coli</i> e sistema de expressão bacteriano	43
1.3.1. Bacteriófago λ	44
1.3.2. Genoma do fago	45
2. Objetivo	48
2.1. Estratégias.....	48
3. Materiais e Métodos	49
3.1. Vírus e células	49
3.2. Fusão do gene NS1 na porção 5' do gene da poliedrina de AcMNPV	50
3.3. Clonagem do gene NS1 nos vetores pENTR™ 11 e pDEST™ 17	56
3.4. Análise da expressão da proteína NS1 expressa em sistema procariótico	59
3.4.1. Purificação da proteína recombinante	61

3.5. Análise da expressão da proteína NS1 expressa em sistema eucariótico	62
3.6. Produção do anti-soro policlonal anti-NS1	63
4. Resultados.....	65
4.1. Fusão do gene NS1 na porção 5' do gene da poliedrina de AcMNPV	65
4.2. Obtenção do baculovírus recombinante vAcPolNS1	68
4.3. Confirmação da clonagem do gene NS1 de febre amarela no vetor pENTR TM 11 e pDEST TM 17	71
4.4. Obtenção da proteína NS1 de febre amarela expressa em <i>Escherichia coli</i>	74
4.5. Obtenção do anti-soro policlonal anti-NS1	76
5. Discussão	79
6. Conclusões e perspectivas	85
7. Referências Bibliográficas.....	86

1. Introdução

1.1. Febre Amarela

Febre amarela é uma doença infecciosa, endêmica em florestas tropicais da África, Américas central e do Sul. É causada por um arbovírus da ordem Nidovirales, pertencente à família Flaviridae do gênero *Flavivirus* (Lindenbach *et. al.*, 2007; Volk *et. al.*, 2009). O gênero *Flavivirus* é subdividido em mais de 50 espécies distintas de vírus de artrópodes, incluindo os principais patógenos humanos, como o vírus da febre do Nilo, febre amarela, encefalite japonesa e os quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV tipos 1- 4) (Mackenzie *et. al.*, 2004).

A febre amarela é transmitida por um arbovírus, que é o termo utilizado para designar vírus transmitidos por um vetor artrópode (“Arthropod Borne Virus”). Os principais vetores da febre amarela são as fêmeas dos insetos hematófagos da família Culicidae, em especial dos gêneros *Aedes* e *Haemagogus* (Vasconcelos, 2003) (Figura 1).

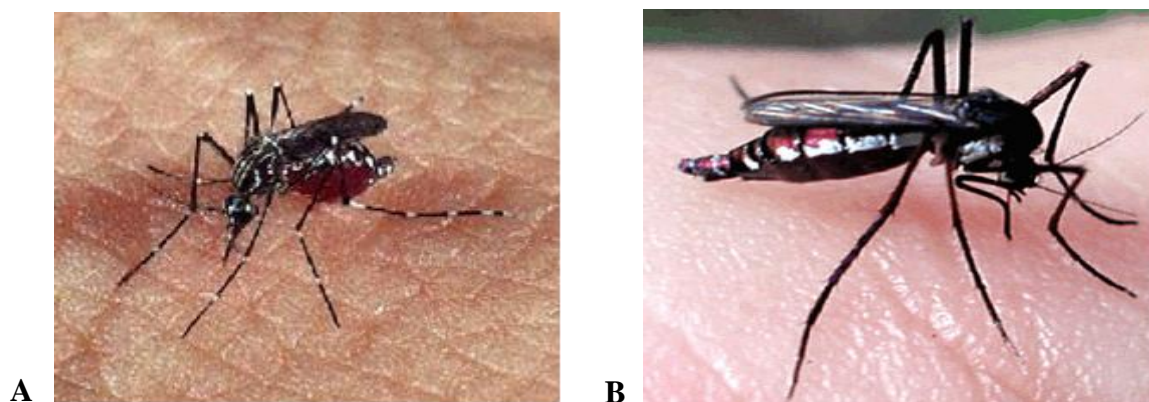


Figura 1. Mosquitos transmissores da febre amarela. A) *Aedes aegypti* B) *Haemagogus janthinomys*.

<http://www.invivo.fiocruz.br>

1.1.1. Epidemiologia

Nos séculos 18 e 19, a febre amarela invadiu e devastou colônias nas Américas e na África ocidental. Em 1900, com a descoberta de que os mosquitos eram os responsáveis pela transmissão da doença e que essa era evitável através do controle do vetor, bem como o desenvolvimento de vacinas (em 1930), o medo associado à doença e seu impacto médico foram reduzidos. Entretanto, a febre amarela continua a ser endêmica em diversas áreas da África tropical e América do Sul, tornando-se assim, uma ameaça contínua para pessoas que viajam para essas regiões sem vacinação (Monath, 2001).

Embora a espécie *A. aegypti* seja encontrada em grande parte da Ásia tropical e Oceania, casos de febre amarela nunca foram relatados nessas regiões (Neilson, 2010).

A febre amarela faz parte da lista de doenças de notificação compulsória e como tal, qualquer caso suspeito deve ser imediatamente notificado à autoridade sanitária local, estadual ou nacional e esta notifica os organismos internacionais. Posteriormente, havendo confirmação laboratorial, a notificação do caso é confirmada e a autoridade nacional ratifica a autoridade sanitária internacional (Robertson, 1993).

Cerca de 200.000 casos de febre amarela ocorrem anualmente nas regiões tropicais da África e América do Sul; 90% deles ocorrem na África (Barnett, 2007; Monath, 2001).

Nos últimos 31 anos do século XX, cobrindo o período de 1970-2000 e mais o ano de 2001, foram notificados 4.543 casos de febre amarela na América do Sul, todos da forma silvestre. O Peru, com 2.341 casos (51,5%) e a Bolívia com 912 casos (20,1%) são os dois países que mais reportaram casos. O Brasil ocupa o terceiro lugar com 849 casos (18,7%) notificados no período. Na última década, o número anual de casos

notificados raramente excedeu 60 notificações, mas a letalidade mostrou-se elevada e a tendência tem sido de aumento do número de ocorrências. A mortalidade global da febre amarela situa-se entre 5-10%, percentual elevado quando comparado a outras viroses, inclusive dengue. Mas a letalidade dos casos graves revelou-se maior e no Brasil oscila entre 40% - 60% (Vasconcelos, 2003).

A doença é caracterizada por dois ciclos de transmissão: silvestre, transmitida entre os primatas não humanos através de mosquitos *Haemagogus janthinomys* e *Sabethes chloropterus*; e urbano, transmitida para os seres humanos a partir de mosquito *Aedes aegypti* infectado (Chaves *et. al.* 2009) (Figura 2).

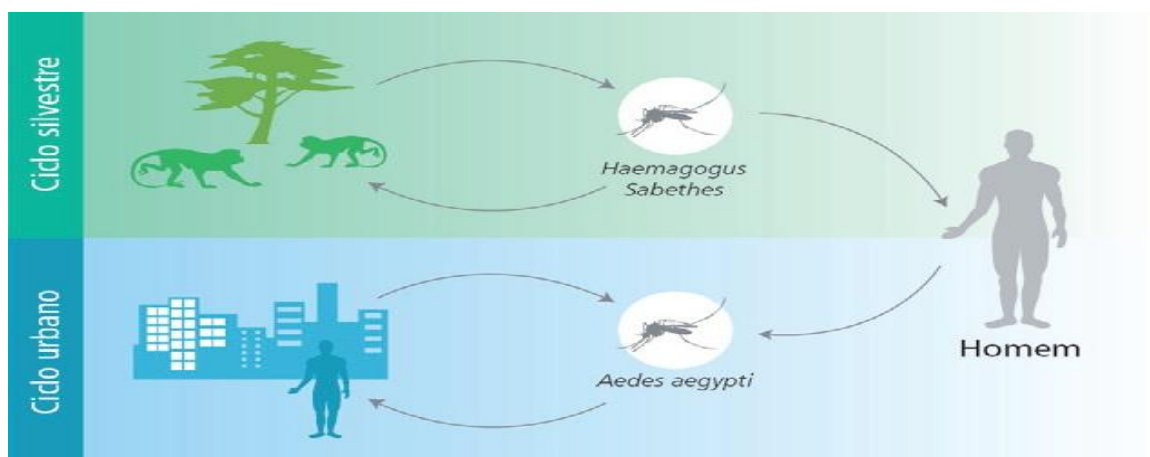


Figura 2. Ciclos epidemiológicos (silvestre e urbano) da febre amarela. Fonte: <http://sanidaderural.blogspot.com/2010/04/febre-amarela-serie-situacao.html>

No ciclo urbano, a doença é uma antroponose, sem hospedeiros animais de importância epidemiológica conhecida. O *Aedes aegypti* é o vetor mais importante, tanto na América do Sul quanto na África. Apesar do mosquito *Aedes albopictus* ser suscetível à infecção pelo vírus da febre amarela no laboratório, ele nunca foi encontrado infectado na natureza (Tauil, 2010).

Com relação ao ciclo silvestre, até o ano de 1999, no Brasil, casos endêmicos de Febre Amarela Silvestre estavam localizados nos estados das regiões Norte, Centro-Oeste e pré-amazônica (entre a massa florestal da Amazônia e os cerrados do Brasil Central e as caatingas do Nordeste Semiárido). Desde então, a doença vem progressivamente expandindo seu território de ocorrência, sendo registrados casos além das fronteiras tradicionais de endemismo. Neste contexto se insere o estado de São Paulo que, após décadas sem registro de casos autóctones da doença, reportou em 2000 e 2008-2009 epizootias em primatas não humanos e 30 casos humanos (Moreno & Barata, 2011).

1.1.2. Manifestações clínicas e alterações laboratoriais

A febre amarela pode ser definida como uma doença infecciosa viral aguda de curta duração cuja gravidade varia, podendo ocorrer sob formas oligossintomáticas (manifestações clínicas discretas), até formas fulminantes, em que os sintomas clássicos de icterícia, albuminúria e hemorragias estão presentes. A febre amarela ainda causa infecções assintomáticas ou sub-clínicas que junto com as formas leves da doença, somente são diagnosticadas pelos exames laboratoriais específicos (Vasconcelos, 2003).

A maioria das pessoas com a doença em sua forma leve recuperam-se sem sequelas a longo prazo. Para aqueles com doença na sua forma grave, envolvendo disfunção hepato-renal, a duração da doença é variável e a proporção de letalidade é de 20% - 50% (Monath *et. al.* 2008).

Podem ocorrer formas atípicas fulminantes, levando à morte precoce em 24 a 72 horas após o início da doença (início dos sintomas). A apresentação clínica é bizarra, com início abrupto dos sintomas, predominando os prodrômicos (conjunto de sintomas

que podem indicar o início de uma doença antes dos sintomas específicos), com discreta ou mesmo ausência de comprometimento hepato-renal. O quadro toxêmico pode instalar-se antes do 4º dia, não havendo evolução bifásica. O prognóstico é grave, registrando-se alta letalidade, mesmo em regime de terapia intensiva. Esses quadros são raros e geralmente são devidos à coagulação intravascular disseminada. Em síntese, o quadro clínico pode se apresentar de acordo com a classificação mostrada na Tabela 1.

Tabela 1. Quadro clínico de pacientes infectados com febre amarela. Adaptado de: Manual de Vigilância Epidemiológica de Febre Amarela, FUNASA, 1999.

FORMA		QUADRO CLÍNICO	DURAÇÃO MÉDIA
LEVE OU FRUSTA		Discreto aumento de temperatura e cefaleia, de duração fugaz e evolução para a cura	Até 2 dias
MODERADA		Febre e cefaleia de início abrupto, náuseas, vômitos, epistaxe, icterícia e sinal de Faget (dissociação pulso-temperatura)	Até 2 dias
GRAVE			
Períodos	Infecioso ou congestivo	Início súbito, febre alta, cefaleia, mialgias, artralgia, dores ósseas generalizadas, náuseas, vômitos e sinal de Faget	Geralmente até 2 dias
	Remissão	Melhora clínica dos sintomas	Poucas horas a 2 dias
	Toxêmico	Novo aumento de temperatura exacerbação das manifestações clínicas descritas nas formas anteriores, insuficiência renal, do tipo pré-renal que evolui para a insuficiência renal intrínseca, apresentando oligúria e anúria. Os sintomas de insuficiência hepática são evidenciados pela icterícia, melena, hematêmese e outras manifestações hemorrágicas (epistaxes, gengivorragias e otorragias)	Até 2 dias

Infecções anteriores por outros flavivirus podem modular a expressão e o grau de manifestação da febre amarela. O efeito depende exclusivamente do vírus causador

da primeira infecção. Evidências sugerem que infecções pelo vírus da dengue, em particular, podem oferecer uma reação de proteção cruzada (Monath, 2001).

Anormalidades laboratoriais múltiplas podem ser observadas em pacientes com febre amarela, as quais podem variar dependendo da gravidade e do estágio da doença. Na primeira semana da doença, leucopenia (redução no número de leucócitos no sangue), no entanto, leucocitose (aumento do número de leucócitos no sangue) também pode ocorrer durante a segunda semana da doença. Discrasias sanguíneas (alterações sanguíneas) também podem ocorrer, juntamente com elevados de protrombina e tempo parcial de tromboplastina (exame laboratorial que avalia a eficiência da via intrínseca na medição da formação do coágulo de fibrina), diminuição da contagem de plaquetas e presença de produtos de degradação de fibrina. Hiperbilirrubinemia pode estar presente já no terceiro dia, mas geralmente os picos estão presentes no final da primeira semana de doença. Elevações dos níveis das transaminases séricas podem ocorrer na doença hepato-renal grave e podem permanecer elevadas por até 2 meses após o início dos sintomas (Centers for Disease Control and Prevention. MMWR, 2010).

1.1.3. Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial da febre amarela requer pessoal especialmente treinado, infraestrutura apropriada e reagentes confiáveis. O pessoal do laboratório incluindo o pessoal de manutenção e administrativo deve estar vacinado. Seu estado imunológico deve ser avaliado periodicamente e a revacinação deverá ser feita a intervalos de 10 anos ou quando for detectado o declínio dos anticorpos protetores. As regras de biossegurança devem ser observadas rigorosamente nesses casos (Manual de Vigilância Epidemiológica de Febre Amarela, FUNASA, 1999).

A confirmação laboratorial de febre amarela é realizada através de:

- Diagnóstico virológico e/ou
- Diagnóstico sorológico e/ou
- Diagnóstico histopatológico.

O diagnóstico virológico é dividido em isolamento e identificação viral, pesquisa de anticorpos e detecção de ácidos nucleicos virais. Faz-se o isolamento do vírus em diferentes sistemas: camundongos recém-nascidos ou cultivo celular em células de mamífero VERO (linhagem derivada de rim de macaco *Cercopithecus aethiops*) ou células de mosquito clone C6/36 (linhagem derivada de *Aedes Albupictus*). Após a inoculação da amostra suspeita, obtêm-se evidências da replicação viral em torno do 5º ao 7º dias de cultura. Ao isolar-se a amostra identifica-se o vírus em testes de imunofluorescência indireta usando-se anticorpos monoclonais ou alternativamente mediante testes de fixação do complemento (Vasconcelos, 2003).

A detecção de antígenos virais e/ou ácido nucleico viral, não é utilizada na rotina. Podem ser detectados antígenos ou ácido nucleico viral no sangue e tecidos humanos, de macacos e mosquitos, mediante os seguintes métodos: Imunofluorescência: a detecção de antígenos virais em tecidos criopreservados pode ser feita pela técnica de imunofluorescência direta ou indireta; Imunohistoquímica: na mesma amostra de tecidos usada para diagnóstico histopatológico pode-se fazer a detecção de antígenos virais em tecidos fixados em formalina, utilizando anticorpo marcado com uma enzima (fosfatase alcalina ou peroxidase); Hibridização “*in situ*”: é possível detectar os genomas virais específicos usando sondas radiotivas (radioisótopos) ou não radiotivas (enzimas), inclusive em materiais conservados por muitos anos; Reação em cadeia da polimerase (PCR): permite a detecção de quantidades reduzidas de ácido nucleico viral presente nos espécimes, pela amplificação do c-DNA obtido a partir

do RNA viral (Manual de Vigilância Epidemiológica de Febre Amarela, FUNASA, 1999).

O Diagnóstico Sorológico é baseado em reações imunoenzimáticas, sendo assim, os testes identificam antígenos ou anticorpos, utilizando anticorpos conjugados com enzimas. Observações qualitativas ou de avaliações espectrofotométricas (quantitativa) da coloração produzida na reação também permitem realizar a detecção da infecção. Para a febre amarela, utiliza-se o teste MAC-ELISA para a detecção de IgM (pesquisa de anticorpos recentes) (Santos *et. al.*, 2002). A presença de IgM decorre de infecção recente (2-3 meses) ou corrente (atual), assim, a necessidade da história clínica completa para a boa interpretação do resultado laboratorial. Vale lembrar que a vacinação anti-amarílica também induz a formação de IgM e, por isso, importa conhecer os antecedentes vacinais do caso suspeito. Quando o paciente sobrevive, comparam-se os resultados sorológicos das amostras aguda e convalescente. Títulos de anticorpos aumentados 4 vezes ou mais na amostra convalescente em comparação aos títulos da amostra da fase aguda, depõem a favor de infecção recente pelo vírus amarílico (Vasconcelos, 2003).

As reações cruzadas entre o vírus amarílico e outros flavivirus são fatores que dificultam o diagnóstico sorológico, principalmente em áreas endêmicas de múltiplos flavivirus (Monath, 2001). Além disso, a utilização de teste imunoenzimático para a detecção de IgM circulante durante a infecção viral, só é eficaz a partir do quinto dia após o início dos sintomas, quando os títulos de anticorpos IgM são evidenciados. Quando o objetivo é subsidiar as ações da vigilância epidemiológica e de controle de vetores, o prejuízo causado pela emissão de um resultado falso positivo é menor do que aquele causado pelo falso negativo. Por isso, a escolha por um teste diagnóstico deverá sempre levar em consideração a alta sensibilidade. A utilização de kits de diagnóstico

rápido para a detecção de antígenos virais (como a proteína NS1 de flavivirus, que está presente no soro de indivíduos infectados desde o primeiro dia de doença, permanecendo na forma solúvel até o quinto ou sexto dia) pode ser uma importante ferramenta, se utilizados como teste de triagem de amostras destinadas ao isolamento de vírus (Silva *et. al.*, 2011)

O diagnóstico histopatológico da febre amarela grave é realizado a partir de espécimes obtidos “post-mortem”. As lesões anatomo-patológicas podem ser encontradas no fígado, rins, baço, coração e linfonodos. As maiores alterações encontram-se no fígado e rins (Manual de Vigilância Epidemiológica de Febre Amarela, FUNASA, 1999).

1.1.4. Tratamento e prevenção

A base do tratamento continua sendo cuidados de suporte. Terapias antivirais não são eficazes contra este vírus, e nenhuma terapia específica é disponível (Lupi, 2011).

Tratamento de suporte intensivo pode não resgatar o paciente com febre amarela do curso inexorável da infecção fatal. Alguns especialistas recomendam manutenção de nutrição e prevenção de hipoglicemia; sucção nasogástrica para evitar distensão gástrica e aspiração; cimetidina intravenosa para prevenir sangramento gástrico; tratamento de hipotensão por reposição de líquidos e drogas vasoativas (dopamina); administração de oxigênio; correção da acidose metabólica; tratamento de sangramento com plasma fresco congelado; diálise se indicado por insuficiência renal e tratamento de infecções secundárias com antibióticos (Monath, 2001). A aspirina deve

ser evitada devido ao risco de complicações hemorrágicas (Centers for Disease Control and Prevention, MMWR, 2010).

Como droga específica, o medicamento ribavirina foi testado em modelo animal com resultados promissores (Monath, 1987). Tratando-se de doença aguda, o tratamento da febre amarela deve ser feito pela via endovenosa. A ribavirina disponível no mercado brasileiro para tratamento da hepatite C só é oferecida em comprimidos (Vasconcelos, 2003).

O método mais eficaz para se prevenir a febre amarela é a vacinação com a cepa 17D. Atualmente, duas subcepas são usadas na produção de vacinas: 17DD no Brasil e 17D-204 no resto do mundo (Galler *et. al*, 2001).

A vacinação contra a febre amarela produz altos níveis de proteção, com taxas de soroconversão de 195% em crianças e adultos e duração da imunidade, de 10 anos (Poland *et. al*, 1981). 90 % das pessoas vacinadas desenvolvem anticorpos neutralizantes dentro de 10 dias após a imunização e aproximadamente 99% desenvolvem anticorpos neutralizantes após 30 dias. Embora seja provável que a imunidade permaneça ao longo da vida após uma única dose, o Regulamento Sanitário Internacional recomenda a revacinação em intervalos de 10 anos para aqueles que permanecem em risco (áreas endêmicas) (Barnett, 2007).

Como a vacina é produzida com vírus vivo atenuado, não é recomendada a vacinação de pessoas com imunodeficiência, já que há riscos de reversão da virulência num hospedeiro com depressão do sistema imune (Vasconcelos, 2003). Além disso, o vírus é cultivado em embriões de galinha, e a vacina pode conter microgramas de ovo. Esta vacina também não é indicada para pacientes com hipersensibilidade a ovo (Chernin *et. al*. 2011).

A vacinação ainda é um essencial, embora muitas vezes subutilizado, modo de proteção. Programas da Organização Mundial de Saúde para a detecção laboratorial de surtos de febre amarela e a dispensação (ato do farmacêutico de orientação e fornecimento ao usuário de medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos, a título remunerado ou não) de vacinas tanto preventivas quanto para uso de emergência (em conjunto com a Aliança Global para Vacinas e Imunização) já estão em vigor. A vacina, embora não seja perfeita, desempenha um papel importante na prevenção e / ou interrupção de surtos de febre amarela, uma vez que essa doença é o flagelo de tantas comunidades (Frierson, 2010).

1.1.5. Vírus da Febre Amarela

O agente etiológico da febre amarela é o vírus da febre amarela (YFV) pertencente ao gênero *Flavivirus*, e espécie-tipo da família *Flaviviridae* (Lee *et. al.*, 2000). Pertencem também a esse gênero, os vírus causadores da encefalite japonesa, encefalite de St. Louis, dengue e da febre do Nilo (Chambers *et. al.*, 1990).

O vírus da febre amarela apresenta uma partícula esférica, com 50 nm de diâmetro, apresenta um capsídeo icosaédrico contendo uma molécula de RNA fita simples, não segmentado, polaridade positiva, com genoma de 10.862 nucleotídeos, que codifica o precursor de uma única poliproteína (Chambers *et. al.*, 2005). Este genoma é organizado em uma única fase aberta de leitura (“Open Reading Frame” – ORF), codificando as proteínas estruturais (Capsídeo – C, Membrana – Pré M/M, Envelope – E) e não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Monath, 2001) (Figura 3).

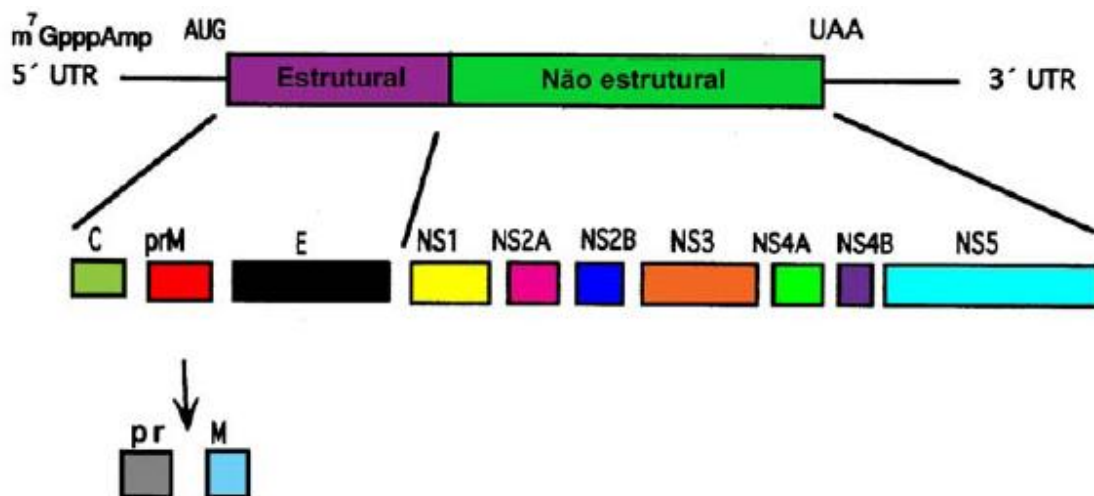


Figura 3. Estrutura genômica do vírus da febre amarela com genes estruturais, não estruturais, regiões não traduzidas 5' UTR e 3' UTR e a formação das proteínas virais após o processamento proteolítico. Fonte: Machado, 2007.

A poliproteína é processada por uma combinação de proteases virais e do hospedeiro para gerar as proteínas virais maduras (Rice, 1996). Depois da tradução da proteína pré-M, o polissomo fica associado ao RER sendo a tradução de todas as proteínas virais dependentes de uma associação de membrana (Chambers *et. al.*, 1990; Santos *et. al.*, 2002; Wu *et. al.*, 2005).

As proteínas estruturais são incorporadas na partícula viral madura, enquanto as proteínas responsáveis pela replicação (proteínas NS) permanecem nas células infectadas. O envelope viral consiste de uma bicamada lipídica derivada da célula infectada, com dímeros de proteína do envelope (E) ancorada na superfície em suas caudas hidrofóbicas. A proteína E é responsável pela entrada do vírus na célula do hospedeiro e também é um alvo principal para a resposta imune (Monath, 2001). É o

principal componente da superfície do vírion. É o imunógeno primário e desempenha o papel central na ligação aos receptores e fusão de membrana (Heinz & Allison, 2003).

A proteína C que codifica a formação do nucleocapsídeo viral é pequena (12-14 kDa) e é carregada positivamente (27% Lys + Arg) (Chambers *et. al.*, 1990; Lindenbach *et. al.*, 2007). Durante uma infecção, o organismo humano responde com a produção de anticorpos inibidores de hemaglutinação (IH) contra as glicoproteínas do envelope e anticorpos neutralizantes (N) contra a proteína C (Vasconcelos, 2003).

NS1 é uma glicoproteína de 48 kD não-estrutural que está ausente do vírion. NS1 é um gene essencial, pois é um co-fator exigido para a polimerase NS5 durante a replicação de RNA viral (Mackenzie *et. al.*, 1996;. Lindenbach & Rice, 1997; Khromykh *et. al.*, 1999).

NS2A é uma proteína hidrofóbica pequena, cerca de 22 kDa (Chambers *et. al.*, 1989). É encontrada em associação às membranas celulares e está envolvida no processamento e maturação da proteína NS1 (Vasconcelos, 2003); na montagem dos vírions; na replicação do RNA além de interagir com a região 3`UTR (Lindenbach *et. al.*, 2007).

NS2B forma um complexo com NS3 e é um co-fator necessário para a atividade de protease de NS3 (Chambers *et. al.*, 1991; Arias *et. al.*, 1993; Chambers *et. al.*, 1993; Falgout *et. al.*, 1993). A proteína NS3 tem uma função fundamental na replicação dos flavivirus e na maturação de proteínas virais. Ela consiste de dois domínios funcionais, protease e helicase no N- e C-terminal, respectivamente (Mackenzie *et. al.*, 2004). É a segunda maior proteína viral, possui massa molecular entre 68-70 kDa sendo altamente conservada entre os flavivirus (Lindenbach *et. al.*, 2007).

As proteínas NS4A e NS4B são pequenas proteínas como a NS2A e pouco conservadas entre os flavivirus. NS4A e NS4B são possíveis componentes da replicase

encontrando-se associadas à membrana celular (Vasconcelos, 2003; Lindenbach *et. al.*, 2007).

A proteína NS5 é a maior proteína viral com massa molecular de 103-104 kDa. (Chambers *et. al.*, 1990; Lindenbach *et. al.*, 2007). NS5 tem atividade de RNA polimerase dependente de RNA (RDRP) e tem homologia com metiltransferases, que estão envolvidas na metilação da estrutura 5' cap RNA (Liu *et. al.*, 2010).

A biossíntese viral inicia-se com a adsorção, ligação específica irreversível de uma glicoproteína viral a um constituinte da célula hospedeira (receptor). Ainda é desconhecida a estrutura responsável pela ligação do vírus amarelo à superfície celular. Sabe-se que a proteína do envelope, no grupo dos flavivirus, é responsável pela maioria das ligações com receptores específicos celulares (Santos *et. al.*, 2002).

Os vírions se agregam em regiões de grande concentração da proteína clatrina na superfície celular e, posteriormente, são internalizados em vesículas. Essas vesículas sofrem um desnudamento, perdendo a cobertura de clatrina, e uma reação de acidificação leva a fusão de membranas, liberando os nucleocapsídeos ao citoplasma. Devido à queda do pH intravesicular, a proteína do envelope sofre mudanças conformacionais necessárias para a fusão e liberação dos vírions no meio citoplasmático (Chambers *et. al.*, 1990; Santos *et. al.*, 2002, Lindenbach *et. al.*, 2007). A síntese do RNA pode ser detectada entre 3 e 6 horas após o início da infecção e a liberação das partículas infectivas ocorre por volta de 12 horas pós-infecção (Lindenbach *et. al.*, 2007).

A replicação ocorre no citoplasma e começa com a síntese de uma fita de RNA complementar com polaridade negativa. Esta servirá de molde para a produção de novas fitas de RNA com polaridade positiva. O mRNA é traduzido em uma única poliproteína que, posteriormente, é clivada em proteínas estruturais e não estruturais que farão parte

da partícula viral (Santos *et. al.*, 2002). As proteínas não estruturais, NS3 e NS5, formam um complexo de replicação viral, com diversas funções enzimáticas, entre elas, função de RNA polimerase dependente de RNA (RDRP), metiltransferase e helicase (Jones *et. al.*, 2003).

A Montagem do vírus ocorre no retículo endoplasmático (RE) e inicialmente leva à formação de partículas imaturas não infecciosas, que são ornamentadas com estruturas contendo um complexo de proteínas prM - E. Após o transporte do vírion imaturo através da via celular exocítica, o complexo prM - E de proteínas sofre uma mudança conformacional, induzida pelo baixo pH na rede trans-Golgi (TGN), que permite prM ser clivada por proteínas furina (ou uma protease relacionada a furina) antes que as partículas de vírus sejam liberadas da célula. Esta clivagem provoca um rearranjo importante de proteínas E na superfície da partícula, levando à formação de partículas maduras infecciosas, que carregam a proteína dimérica E em uma conformação metaestável (Stiasny *et. al.*, 2009), que agora esta preparada para fusão de membrana mediada por baixo pH no endossomo após endocitose mediada por receptor (Liu *et. al.*, 2010) (Figura 4).

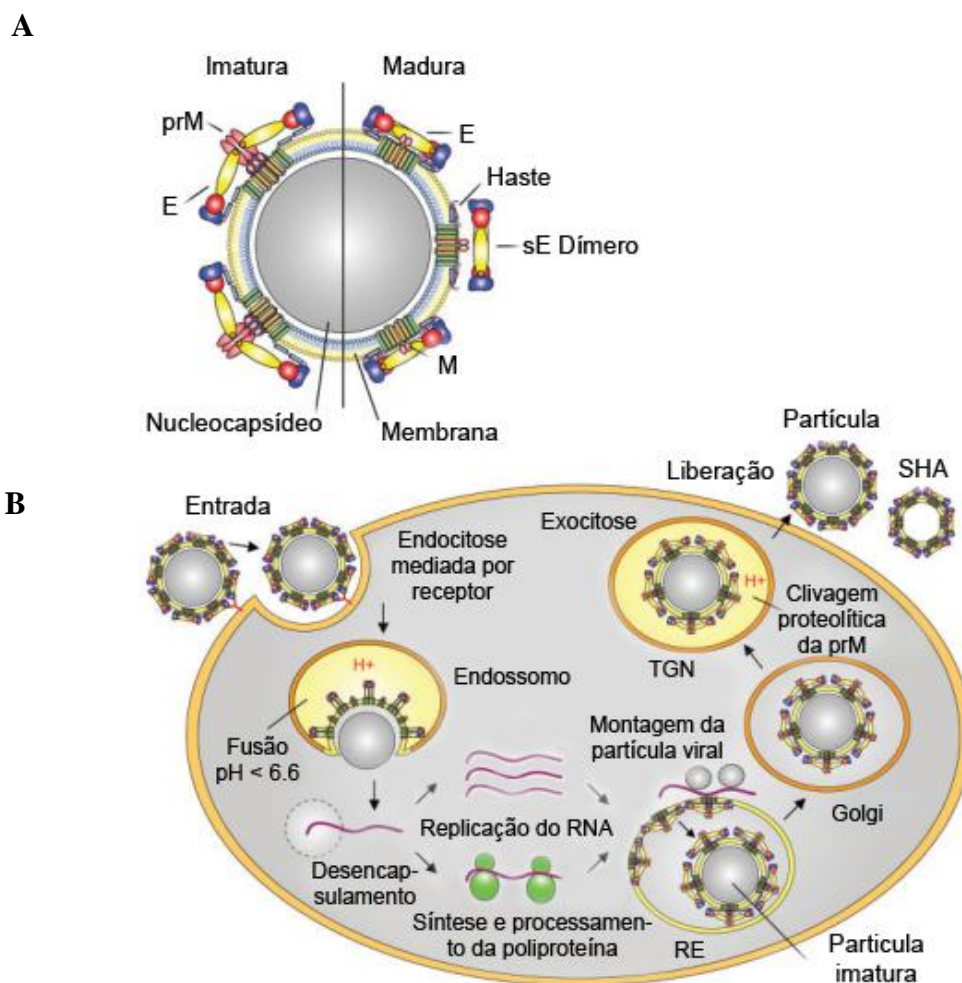


Figura 4. Representação esquemática da partícula de flavivirus e ciclo de infecção viral (A) Partícula de flavivirus: vírions imaturos contêm duas proteínas associadas à membrana (prM e E) que formam um complexo heterodimérico apertado. No curso de maturação do vírus, a proteína prM é clivada, resultando no rearranjo de E (vírions maduros). O produto de clivagem carboxi-terminal da prM (M) permanece associado com a membrana viral. (B) Ciclo de infecção viral: entrada do vírus ocorre por endocitose mediada pelo receptor, e o pH ácido no endossomo induz alterações estruturais em E que levam a fusão da membrana e ao lançamento do nucleocapsídeo no citoplasma. Depois do desencapsulamento, a fita de RNA é traduzida para iniciar a replicação do vírus. Montagem do vírus ocorre no retículo endoplasmático (ER) e leva à formação de partículas imaturas (contendo prM) que são transportadas através de uma via exocítica. O pH ácido na rede trans-Golgi (TGN) provoca uma irreversível mudança conformacional no complexo prM-E, que é necessário para a maturação da partícula viral. Partículas maduras infecciosas são liberadas por exocitose (Stadler *et. al.*, 1997) Adaptado de: Stiasny *et. al.*, 2009.

1.1.6. NS1

A glicoproteína não-estrutural NS1 foi identificada originalmente como um antígeno solúvel de fixação do sistema complemento no meio extracelular (Brandt *et. al.*, 1970) e posteriormente detectada na superfície de células infectadas com flavivirus (Stohlman *et. al.*, 1975; Cardiff & Lund, 1976; Gould *et. al.*, 1985).

NS1 é um gene essencial requerido para eficiente replicação do RNA viral (Lindenbach *et. al.*, 1997).

NS1 pode ser detectada dentro das células infectadas, na superfície celular, e é eficientemente secretada pelas células. É bem conservado entre flavivirus (exibindo 20-40% de identidade e de 60 a 80% de similaridade) (Lindenbach & Rice, 1997). Contém 12 resíduos de cisteína invariantes e dois potenciais sítios de N-glicosilação (Muylaert *et. al.*, 1997). Em células de mamíferos infectadas, NS1 é sintetizada como um monômero solúvel, dimeriza após modificações pós-traducionais no lúmen do retículo endoplasmático, é transportada para a superfície celular e acumula extracelularmente como grandes oligômeros, incluindo hexâmeros (Flamand *et. al.*, 1999).

NS1 solúvel se liga de volta a membrana plasmática de células não-infectadas através de interações com glicosaminoglicanos sulfatados. Em células infectadas é transportada e expressa na membrana plasmática, embora ela não tenha um domínio transmembrana. O mecanismo de expressão de NS1 de flavivirus na superfície de células infectadas permanece incerto, embora alguma fração possa ser ligada através de uma âncora glicosil-fosfatidilinositol atípica ou jangadas lipídicas. Estudos recentes mostraram que NS1 na membrana plasmática de células infectadas reflete um transporte de dentro para fora das células e que a região N- terminal da NS1 regula o fenótipo de

expressão, determinado se a NS1 deve ser secretada ou expressa na superfície celular (Youn, *et. al.*, 2010).

Imunidade a YFV tem sido geralmente relacionada com a presença de anticorpos neutralizantes contra glicoproteína do envelope (E), no entanto, foi mostrado uma transferência passiva de anticorpos monoclonais direcionados para a glicoproteína NS1, ausente no vírion (Schlesinger, *et. al.*, 1990).

Embora NS1 esteja ausente no vírion, anticorpos contra NS1 podem proteger contra a infecção *in vivo*. A ativação tipo-específica, do sistema complemento e grupos reativos de epítomos definidos para a NS1 levam as hipóteses de que essa proteína atua em diversos aspectos da imunidade de proteção (Lindenbach *et. al.*, 2007). Imunização com NS1 purificada ou administração passiva de alguns anticorpos monoclonais anti-YFV e anti-DENV NS1 (MAbs) protegeram ratos contra doses letais do vírus (Després, *et. al.*, 1991; Falgout, *et. al.*, 1990; Jacobs, *et. al.*, 1994).

NS1 é fortemente imunogênica, e o tipo específico de anticorpos anti-NS1 desempenham um papel na proteção contra a doença. Altos níveis de NS1 são encontrados na circulação de pacientes infectados com DENV durante a fase aguda da doença (Avirutnan, *et.al.*, 2006).

O antígeno NS1 é encontrado juntamente com endotélio, livre ou solúvel no soro de pacientes a partir de um dia antes do início dos sintomas, e pode ser detectado, pelo menos, até cinco dias após o início dos sintomas, permitindo o diagnóstico precoce de DENV. Um estudo anterior, concluiu que o teste foi mais sensível com amostras coletadas até dia 3 após o início dos sintomas. Apesar de seus custos, a aplicação do teste NS1 na detecção de DENV, como teste de diagnóstico de rotina em laboratórios, é confiável. Em conclusão, o ensaio de NS1 é altamente adequado para amostras submetidas à triagem para isolamento do vírus (Bisordi *et. al.*, 2011).

1.2. Baculovírus

Os baculovírus são vírus de insetos usados no controle biológico de insetos da ordem Lepidoptera e na expressão de proteínas heterólogas em células de insetos e *in vivo* (Castro *et. al.*, 1999). Possuem alto potencial como ferramenta biotecnológica devido a sua alta especificidade de inseto-alvo, não afetando o ser humano (Gröner, 1986). São usados como agentes de controle biológico (Payne, 1986; Moscardi, 1999; Castro *et. al.*, 1999), e principais vetores de expressão utilizados em células de insetos (O'Reilly *et. al.* 1992). Além disso, são candidatos a vetores de terapia gênica, capazes de infectar organismos não-artrópodes sem a capacidade de se replicarem (Boyce & Bucher, 1996; Ribeiro & Crook, 1998; Tani *et. al.*, 2003).

1.2.1. Taxonomia

Os baculovírus pertencem à família Baculoviridae e foram até pouco tempo atrás, divididos em dois gêneros: os *Nucleopolyhedrovirus* (NPVs) e *Granulovirus* (GVs) (Theilmann, *et. al.*, 2005). Corpos de oclusão (OB, do inglês: “Occlusion Bodies”) é a denominação para a oclusão cristalina de natureza protéica que envolve os vírus dessa família (Ribeiro *et. al.*, 1998) nos *Nucleopolyhedrovirus* (NPV), os OBs são constituídos (95%) por subunidades da proteína poliedrina e são denominados poliedros variando entre 0,15 a 15µm em diâmetro (Theilmann *et. al.*, 2005).

Baseado em análises genômicas, uma nova revisão da taxonomia e da classificação dos baculovírus foi proposta. A família Baculoviridae agora é composta por quatro gêneros: *Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus*, *Gammabaculovirus* e *Deltabaculovirus*. (Jehle *et. al.*, 2006).

1.2.2. Partícula viral e modo de infecção *in vivo*

A partícula viral dos baculovírus possui formato cilíndrico, genoma de DNA dupla-fita circular, que variam de 80-180 kb e nucleocapsídeo envelopado (Theilmann *et. al.*, 2005).

Para o baculovírus AcMNPV e outros NPVs (nucleopolyhedrovirus) relativamente bem caracterizados em lepidópteros, existem dois tipos de vírions produzidos durante a infecção por baculovírus; em insetos a infecção é iniciada por vírus derivados de oclusão de (ODV) que são liberados no intestino médio do inseto após a dissolução dos corpos de oclusão. O fenótipo ODV inicia a infecção no epitélio do intestino médio do inseto e os vírus produzidos nestas células são os vírus extracelulares ou “budded virus” (BVs) que saem das células na direção da membrana basal e espalham a infecção em todo o inseto. Em períodos tardios na infecção viral, vírions são oclusos nos corpos de oclusão dentro do núcleo das células infectadas e são liberados no ambiente após a morte e desintegração do inseto (Rohrmann, 2008).

Os ODVs são compostos de uma matriz protéica que oclui os vírions. A principal proteína que constitui os corpos de oclusão é poliedrina (nos *nucleopolyhedrovirus*) ou granulina (nos *granulovirus*) (Rohrmann, 2008).

Os vírus (ODVs) derivados dos corpos de oclusão dão início a uma infecção primária, nas células epiteliais do intestino médio, e os vírus extracelulares (BVs) estabelecem uma infecção secundária de caráter sistêmico (Volkman *et. al.*, 2000). A larva do inseto ingere alimentos contaminados com corpos de oclusão que seguem pelo sistema digestivo. Devido ao pH alcalino e as proteases presentes no intestino médio das lagartas, a matriz protéica é dissolvida liberando os ODVs que irão atravessar a membrana peritrófica e infectar as células epiteliais colunares por fusão dos

nucleocapsídeos virais com as microvilosidades (Horton & Burand, 1993). Depois da replicação do seu genoma, os novos vírions são encaminhados para a região celular basolateral e liberados para a hemolinfa, estabelecendo uma infecção sistêmica (Volkman *et. al.*, 2000) (Figura 5).

Em células de inseto, a infecção é iniciada por BVs, que entram nas células, via endocitose adsortiva. Diferentemente, os ODVs atingem as células através de fusão direta de membranas (Horton & Burand, 1993).

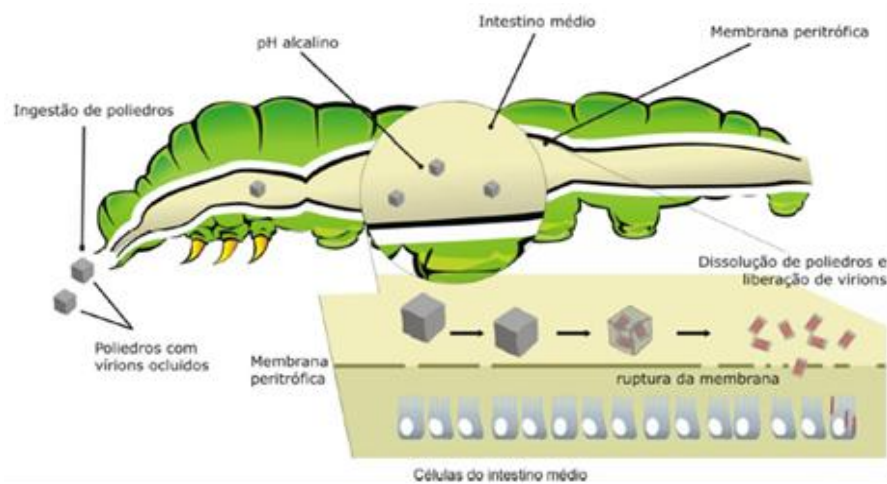


Figura 5. Processo inicial de infecção viral no intestino médio de uma lagarta infectada por baculovírus. A larva do inseto ingere os poliedros e, após a ingestão, estas seguem pelo trato digestivo. No intestino médio, devido ao pH altamente alcalino, as partículas virais são liberadas, passando pela membrana peritrófica e infectando as células colunares (caracterizando a infecção primária). Fonte: Castro & Souza, 2006 – ilustração adaptada de Kalmakoff & Ward, 2003.

1.2.3. Modo de infecção *in vitro* e regulação gênica

Em cultura de células é possível analisar em detalhes a expressão gênica em baculovírus, que pode ser dividida em duas fases principais: inicial (*early*) e tardia (*late*) (Maruniak, 1986). A fase inicial ocorre antes da replicação viral, o vírus está se preparando para a replicação traduzindo proteínas que irão atuar como fatores de transcrição e que são necessárias para as próximas fases. A fase tardia começa com a replicação viral, o desligamento da expressão gênica da célula hospedeira e a produção das proteínas essenciais para a montagem dos BVs (Ribeiro *et. al.*, 1998).

Na fase muito tardia, a partir de 18h h.p.i, ocorre a produção dos OBs com a superexpressão dos genes das proteínas envolvidas na formação dos poliedros, ou seja, relacionados ao processo de oclusão e a produção de grandes quantidades de poliedrina (Lu & Miller, 1997; Ribeiro *et. al.*, 1998).

A poliedrina é o principal constituinte do poliedro, que ao ser ingerido pelo inseto é dissolvido no pH alcalino do intestino médio (Funk *et. al.*, 1997). Ela compreende mais de 95% de todas as proteínas virais na fase tardia (Jarvis, 1997). Devido a sua alta produção, o locus da poliedrina é comumente utilizado para construção de baculovírus recombinantes como vetores de expressão (Kost *et. al.*, 2005).

1.2.4. Baculovírus como vetor de expressão

Como vetores de expressão de genes heterólogos, os baculovírus são capazes de expressar diversas proteínas em células de insetos. Essas proteínas são ativas biologicamente, imunologicamente similares às naturais, sendo expressas em altos níveis. Além de seguro, esse sistema é vantajoso por ser um ambiente eucariótico, permitindo a expressão de proteínas complexas e a coexpressão de dois ou mais genes. A introdução de genes no genoma do baculovírus precisa ocorrer no lugar de um gene não-essencial para a replicação e que esteja sob o comando de um promotor forte (O'Reilly *et. al.*, 1992; Ribeiro *et. al.*, 1998). A recente aprovação do baculovírus pela Agência Européia de Medicamentos (EMA) para a produção de vacinas abre caminho para a utilização do baculovírus também na terapia gênica (Airene, 2010). Muitas linhagens de células de mamífero são eficientemente transduzidas por baculovírus (Kost & Condreay, 2002). Assim, baculovírus recombinantes constituem uma ferramenta poderosa para entrega e expressão de genes heterólogos em células de mamíferos (Kost & Condreay, 2002).

O *Autographa californica multiple nucleopolyedrovirus* (AcMNPV) é o baculovírus mais estudado a nível molecular e os vetores de expressão são baseados nesse vírus (O'Reilly *et. al.*, 1992).

O método mais simples de expressão em baculovírus é a troca do gene da poliedrina por um gene heterólogo sob o comando do promotor da poliedrina (*polh*) (Miller *et. al.*, 1983). Vários vetores foram desenvolvidos ao longo de mais de duas décadas no uso de sistema para expressão de proteínas (Kost *et. al.*, 2005). Entre esses vetores, alguns são capazes de incorporar uma proteína heteróloga ao corpo de oclusão (Je *et. al.*, 2003) pela fusão do gene de interesse ao gene da poliedrina, além de

possuírem o gene da poliedrina selvagem. Esses vetores capazes de expressar a poliedrina fusionada a outra proteína são usados para expressar corpos de oclusão que proporcionam a purificação rápida e fácil da proteína recombinante (Rho *et. al.*, 2010). O método mais utilizado para purificação de proteínas recombinantes, geradas por fusão com a proteína poliedrina, é a ultracentrifugação em gradiente de sacarose, que é um método rotineiro de purificação de corpos de oclusão viral (O'Reilly *et. al.*, 1992; King & Possee, 1992).

Dentre as vantagens para utilização desses vetores estão: a) potencial para expressão de proteínas heterólogas em altos níveis; b) existência de promotores fortemente ativos durante a fase tardia da infecção (não interferindo no ciclo viral); c) diferentes fases na regulação gênica do ciclo viral, oferecendo oportunidade de expressão de genes heterólogos sob diferentes condições celulares; d) capacidade para clonagem de grandes inserções; e) eficiência na expressão de genes de eucariotos contendo região codificantes e não codificantes, exons e introns, respectivamente; e f) simplicidade de manipulação (Castro *et. al.*, 1999).

A construção desses vetores pode ser feita por recombinação homóloga ou utilizando a técnica de transposição. No procedimento original, o plasmídeo de transferência com as regiões flanqueadoras do gene que se pretende substituir no genoma viral, o seu promotor e um sítio de clonagem (Miller *et. al.*, 1983) é co-transfectado na célula do inseto juntamente com o DNA do vírus parental. Por recombinação homóloga, durante o processo de infecção viral, o gene original do vírus é substituído pelo gene de interesse contido no plasmídeo. Forma-se o vírus recombinante e este é selecionado por plaqueamento em células infectadas (Castro *et. al.*, 1999).

Na técnica de transposição, o gene de interesse é clonado em um plasmídeo que possui regiões flanqueadoras de transposição. Este plasmídeo é inserido em uma bactéria que contém além do seu genoma, o genoma do baculovírus na forma de uma grande plasmídeo (bacmídeo), e outro plasmídeo com o gene da transposase (pHelper). A transposase efetua a transposição do gene de interesse no genoma do baculovírus utilizado na transfecção em células de inseto. Este sistema elimina a fase de seleção e facilita a purificação de vírus recombinantes, além de obter uma maior quantidade de vírus produzido (Kost *et. al.*, 2005). Comercialmente, o sistema Bac-to-Bac® é um sistema de expressão baseado em baculovírus que utiliza a técnica de transposição, o sistema é produzido pela empresa Invitrogen e é amplamente utilizado na expressão gênica. Com o sistema Bac-to-Bac®, o cassete de expressão do pFastBac™ recombina com o bacmídeo presente em células competentes *Escherichia coli* DH10Bac™ para formar um bacmídeo de expressão. O bacmídeo é então transfectado em células de insetos para a produção de partículas de baculovírus recombinante. O bacmídeo presente em *E. coli* DH10Bac™ contém um segmento do gene *lacZα*. O gene *lacZα* interrompido sobre a transposição do cassete de expressão no bacmídeo permitindo a seleção azul (*lacZα+*) / branco (*lacZα* interrompido) de recombinantes. Isto torna a identificação das colônias recombinantes fácil e rápida (Manual Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System, Invitrogen, 2004) (Figura 6).

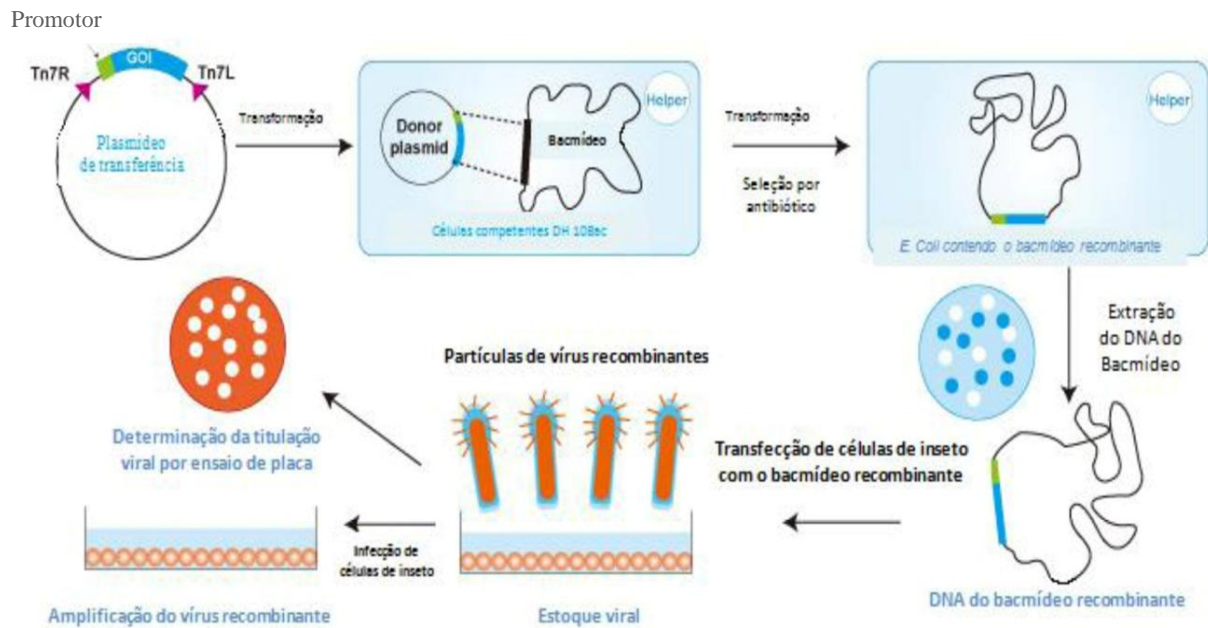


Figura 6. Geração de baculovírus recombinante e expressão gênica com o Bac-to-Bac® Expression System. O gene de interesse é clonado em um plasmídeo doador pFastBac™, e o plasmídeo recombinante é transformado em células competentes DH10Bac™ que contém um bacmídeo com um sítio de transposição mini-attTn7 e o plasmídeo auxiliar (pHelper). O sítio mini-Tn7 no plasmídeo pFastBac™ doador pode transpor para o sítio de destino mini-attTn7 no bacmídeo através de proteínas de transposição no plasmídeo auxiliar. Colônias contendo bacmídeos recombinante são identificados pelo rompimento do gene *lacZα*. Mini-*prep* para DNA de alta massa molecular e ocorre a seleção de clones de *E. coli* contendo o bacmídeo recombinante, e este DNA é então usado para transfecção em células de insetos. Fonte: Adaptado de Bac-to-Bac® Expression System Manual (Invitrogen).

1.3. *Escherichia coli* e sistema de expressão bacteriano

A *Escherichia coli* é uma espécie de bactéria intensamente estudada. Serviu durante muito tempo como um organismo modelo para bioquímica, genética e biologia molecular, e mais recentemente tem sido amplamente utilizada em estudos experimentais de evolução. A *E. coli* vive normalmente na microbiota do trato gastrointestinal de mamíferos, incluindo seres humanos, e normalmente é inofensiva (Elena *et. al.*, 2005).

A *E. coli* tem a forma de um bacilo e pertence à família das Enterobacteriaceae. São aeróbias e anaeróbias facultativas. Possui múltiplos flagelos dispostos em volta da célula. O genoma tem quase 5 milhões de pares de base e vários milhares de genes codificando mais de 4000 proteínas (o genoma humano tem 3 bilhões de pares de bases e cerca de 27 mil proteínas) (Murray, 2004).

Nos organismos procarióticos, a bactéria *Escherichia coli* é bastante utilizada como sistema de expressão, devido à facilidade de manipulação, e na literatura está descrita a produção de proteínas estruturais do vírus da febre amarela, como a do envelope (E) (Sugrue *et. al.*, 1997), proteínas não estruturais (NS1) (Srivastava *et. al.*, 1995), e expressão de alguns domínios protéicos específicos intimamente ligados à função antigênica da proteína (Jaiswal *et. al.*, 2004).

Sistemas de expressão bacterianos, devido à sua simplicidade, muitas vezes não são capazes de produzir uma proteína recombinante idêntica a selvagem. Bactérias não possuem mecanismos sofisticados para a realização de modificações pós-traducionais que estão presentes em organismos superiores. Como consequência, um número crescente de proteínas recombinantes é expressa em células de mamíferos. No entanto o baixo custo e simplicidade do cultivo bacteriano é uma vantagem imbatível sobre

qualquer outro sistema de expressão e, portanto, a *E. coli* é sempre a escolha preferível tanto em escala laboratorial quanto industrial (Kamionka, 2011).

1.3.1. Bacteriófago λ

Um dos vetores mais utilizados nos processos de clonagem molecular é derivado do bacteriófago λ (Landy, 1989), um vírus de *E. coli*. O fago λ é um parasita obrigatório da *E. coli*, o qual necessariamente deve injetar o seu DNA na bactéria hospedeira para a sua multiplicação (Nascimento *et. al.*, 2003).

Bacteriófago λ é um bacteriófago que pode reproduzir e desenvolver-se em um estado lítico ou lisogênico. Quando λ infecta a célula bacteriana *Escherichia coli*, o fago pode desenvolver-se liticamente, causando a lise celular e liberando progênie viral. O fago λ pode abortar o desenvolvimento lítico parando de expressar genes virais, alternativamente o genoma do fago poderá entrar em um estágio dormente (profago) por meio da integração do genoma viral ao genoma bacteriano através de recombinação sítio - específica; durante esta fase, o DNA viral é propagado juntamente com o genoma do hospedeiro na progênie subsequente. Este estágio é denominado lisogênico. Alterações ambientais e condições fisiológicas podem ativar o estágio lisogênico ou desencadear eventos líticos (Kuzminov, 1999; Chauthaiwale *et. al.*, 1992).

1.3.2. Genoma do fago

O bacteriófago λ é uma partícula viral constituída de aproximadamente 50% de proteínas e 50% de DNA. O DNA do fago λ , na forma como ele é isolado da partícula viral, é uma molécula linear com dupla fita de aproximadamente 48.500 pares de bases. As extremidades da molécula contêm uma fração de DNA fita simples com cerca de 12 nucleotídeos, os quais são complementares na sequência de bases e através delas é que o DNA assume a forma circular quando ele é injetado na célula hospedeira. Estas extremidades são denominadas de **sítios cos**. O genoma do fago λ codifica aproximadamente 50 proteínas, cujos genes têm um cronograma de expressão bem definido, o que determina a instalação do estado lítico ou lisogênico (Nascimento, 2003) (Figura 7).

Durante o ciclo lítico, os genes envolvidos no processo de lisogênia são dispensáveis e conseqüentemente a região de integração do genoma do fago pode ser totalmente substituída por outro fragmento de DNA, sem que haja qualquer alteração nos processos envolvidos na via lítica. Uma das maiores vantagens de usar o fago λ como vetor de clonagem é que o DNA inserido no fago é empacotado *in vitro*. Embora a eficiência de empacotamento seja cerca de 10%, uma vez que os fagos são empacotados tem-se 100% de eficiência na infecção da *E.coli* hospedeira. Este processo é altamente eficiente quando comparado com o da transformação bacteriana com plasmídeos. Neste caso, os melhores resultados situam-se ao redor de 10^8 transformantes por μg de DNA o que significa que menos de 1 em 1000 plasmídeos são incorporados na *E.coli* hospedeira (Nascimento, 2003).

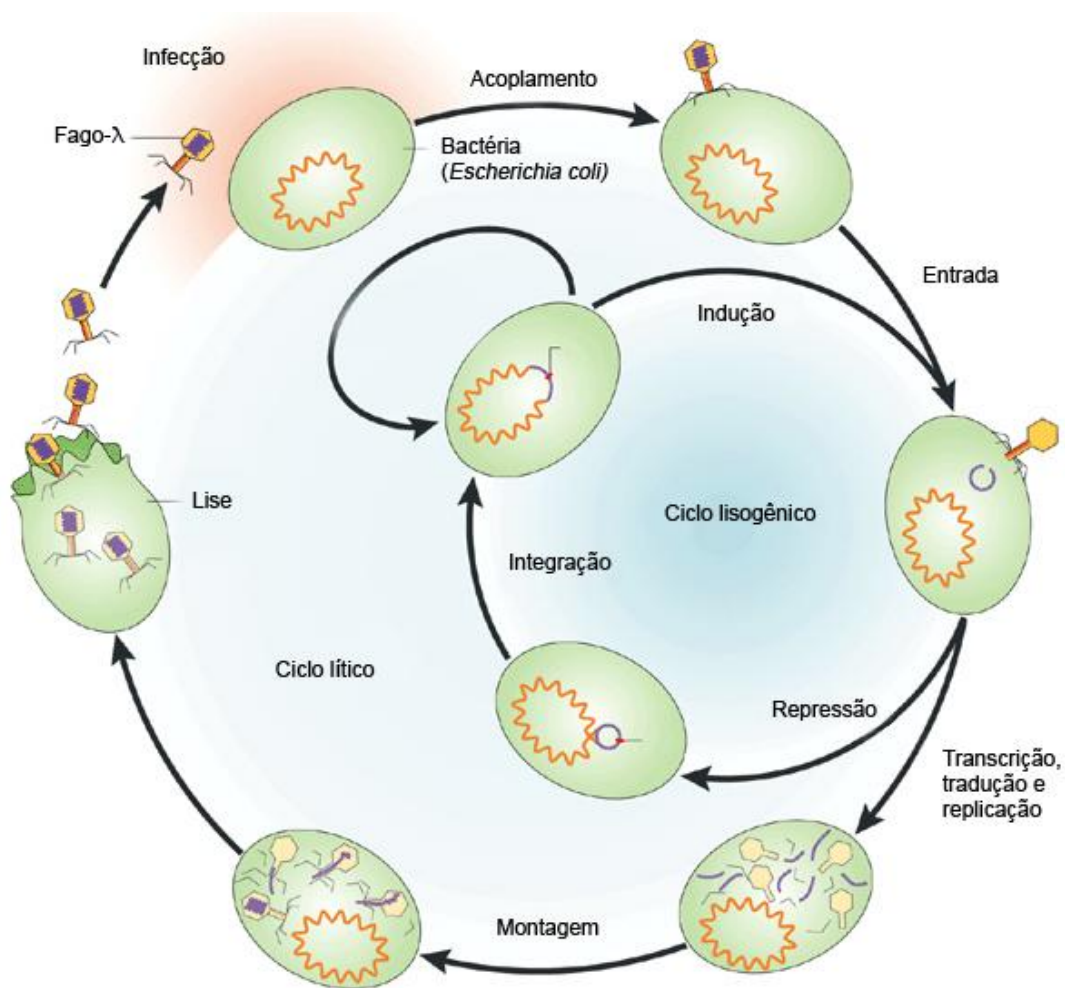
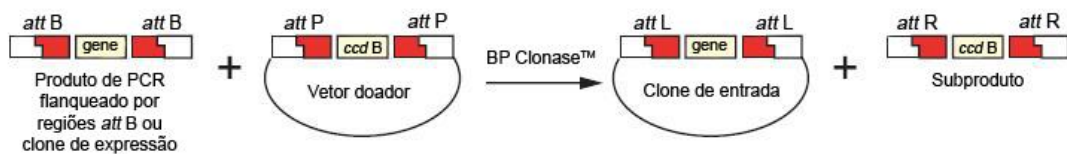


Figura 7. A partícula de fago encontra e ataca à superfície da célula, liberando seu DNA através da ponta de sua cauda, deixando o capsídeo vazio anexado no exterior da célula. Em seguida, as extremidades da molécula de DNA linear se juntam para formar um círculo. O ponto de encerramento é chamado de **sítio cos**. Em algumas células infectadas, o DNA é transcrito, traduzido e replicado, caracterizando o ciclo lítico. Em outras células infectadas, o desenvolvimento do fago é reprimido e DNA do fago integra-se ao cromossomo bacteriano. A célula resultante lisogênica pode replicar indefinidamente, mas pode ser induzida para retornar para o ciclo lítico com a excisão do DNA do fago a partir do cromossomo. Adaptado de: Campbell, 2003.

A tecnologia Gateway® é um método de clonagem universal baseado na propriedade de recombinação sítio - específica do bacteriófago λ . A tecnologia Gateway® proporciona uma rápida e eficiente via para transferir sequências de DNA para dentro do vetor de expressão, afim de análise funcional e expressão de proteínas (Hartley *et. al.*, 2000) (Figura 8).

A



B



Figura 8. A tecnologia Gateway® usa o sistema de recombinação λ para facilitar a transferência de sequências de DNA heterólogas (flanqueadas por sítios de recombinação *att*) entre vetores. Duas reações constituem a base do sistema Gateway® A) Reação BP, facilita a recombinação de substratos *attB* (produto de PCR ou clone de expressão linearizado flanqueado por sítios *attB*) com substratos *attP* (vetor doador) para gerar o clone contendo regiões *attL*. Essa reação é catalisada por um mix de enzimas BP Clonase™ B) Reação LR, facilita a reação de substratos contendo regiões *attL* com substrato contendo regiões *attR* (vetor de destino) para gerar o clone de expressão contendo regiões *attB*. Essa reação é catalisada por um mix de enzimas LR Clonase™. Adaptado de: Manual Gateway® Technology, 2010.

A utilização da tecnologia Gateway® proporciona uma série de vantagens: permite a rápida e eficiente transferência de sequências de DNA para múltiplos sistemas de expressão, seguindo de expressão de proteínas e análise funcional mantendo a orientação e fase de leitura; permite o uso e expressão de diferentes tipos de sequências de DNA (produtos de PCR, clones de cDNA e fragmentos de restrição); permite facilmente a transferência de um grande número de sequências de DNA para múltiplos vetores de destino; permite a fácil conversão de um vetor utilizado em um vetor de destino Gateway® (Manual Gateway® Technology, 2010).

2. Objetivo

Este trabalho teve como objetivo a expressão da proteína NS1 do vírus da febre amarela em células de inseto e células de bactéria (*Escherichia coli*), visando o uso dessa proteína como insumo para diagnóstico.

2.1. Estratégias

Sistema de expressão eucariótico:

- Clonagem do gene NS1 no vetor pFactBac1/Acc-PSX, fusionado à região 5'-terminal do gene da poliedrina de AcMNPV
- Construção do baculovírus recombinante vAcPoINS1 através do sistema de transposição sítio específico Bac- to- Bac® (Invitrogen)

- Infecção de células de inseto com o baculovírus recombinante vAcPolNS1 e confirmação da infecção das células por *Western blot*, utilizando anticorpo policlonal anti-poliedrina

Sistema de expressão procariótico:

- Clonagem do gene NS1 no vetor doador PENTR™ 11
- Clonagem através de recombinação sítio - específica do gene NS1 no vetor de destino pDEST™ 17
- Indução da expressão da proteína NS1 em células BL21-AI (derivadas de *Escherichia coli*)
- Purificação da proteína NS1
- Produção de antisoro policlonal anti-NS1 em camundongos BALB/c

3. Materiais e Métodos

3.1. Vírus e células

O vírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) e baculovírus recombinantes derivados do AcMNPV na forma de bacmídeo bMON14272, Bac-to-Bac® “Baculovirus Expression System” da empresa Invitrogen foram utilizados nesse trabalho.

Os vírus foram propagados em cultura de células *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4 ou Tn5B) (Granados *et. al.*, 1994). Essas células foram mantidas em meio TC-100 (Gibco-BRL) com 10 % de soro fetal bovino a 27 °C (Invitrogen).

Células de *Escherichia coli* DH5- α (Invitrogen) foram utilizadas como hospedeiras para a maior parte dos plasmídeos utilizados no presente trabalho.

Os experimentos envolvendo Bac-to-Bac® “Baculovirus Expression System” (Invitrogen) foram utilizadas células *Escherichia coli* DH10Bac (Invitrogen).

Para o sistema de expressão utilizando *Escherichia coli*, células de *Escherichia coli* BL21-AI foram utilizadas para expressão da proteína recombinante.

3.2. Fusão do gene NS1 na porção 5' do gene da poliedrina de AcMNPV

RNA total de cérebro de camundongo infectado com o vírus vacinal da febre amarela 17 DD foi usado em uma reação de RT-PCR, para a amplificação do cDNA do gene (Machado, 2007). A reação de RT foi conduzida seguindo as instruções do fabricante da enzima Superscript (Invitrogen). O cDNA construído foi, então, usado em uma reação de PCR para amplificação do gene NS1 usando os oligonucleotídeos YF3710R e YF2438F (Tabela 2) que possuem um sítio para a enzima *Bgl* II. O fragmento de PCR amplificado, foi clonado no vetor de clonagem pGEM-T vector (Promega), seguindo as instruções do fabricante (dados não mostrados), gerando o plasmídeo pGem – YFV NS1 (Machado, 2007) (Figura 9).

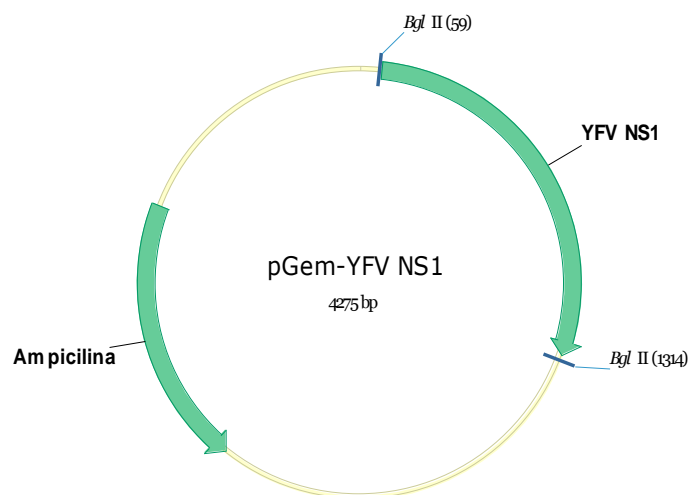


Figura 9. Mapa físico do plasmídeo pGem – YFV NS1 que contém o gene NS1 (YFV NS1) do vírus vacinal da febre amarela 17 DD (Machado, 2007). Os sítios de restrição para a enzima *Bgl*II e sua posição no mapa, além do gene de resistência ao antibiótico ampicilina então indicadas na figura.

Tabela 2. Lista de oligonucleotídeos utilizados no trabalho.

Oligonucleotídeos	Sequência 5' → 3'
YF3710 R	CATTGTAGATCTCATGGAAATGCAATCCCTAAGC
YF2438 F	CTAGGAGATCTATGGATCAAGG
YFF NS1 <i>Bam</i> HI F	GCCGCCATGGCCGCGGGATTCTAGGGATCCTATGGATC
YFR NS1 <i>Bam</i> HI R	GATCTCATGGAAATGCGGATCCCAAGCCACTGTG
pPolAcAg310-348 F	GAAGACAGCTTCCCCATTGTAAACGACCAAGAAGTGAT
pPolAcAg310-348 R	ATCACTTCTTGGTCGTTTACAATGGGGAAGCTGTCTTC

O plasmídeo pGem – YFV NS1 foi utilizado como molde para uma reação de PCR utilizando os primers YFF NS1 *Bam*HI e YFR NS1 *Bam*HI (Tabela 2) que acrescentaram sítios de *Bam*HI flanqueando o gene. Foram utilizados 1µL do tampão de reação 10X da enzima Taq DNA polimerase (LongAmp® Taq PCR Kit), 0,4µL de MgCl₂ (solução estoque 50mM - PHT), 0,3µL da mistura dos quatro dNTPs (solução estoque 10mM), 0,4µL do oligonucleotídeo YFF NS1 *Bam*HI F (solução estoque 10µM), 0,4µL do oligonucleotídeo YFR NS1 *Bam*HI R (solução estoque 10µM) (Tabela 2), 1µl do DNA – pGem -YFV NS1 (~60 ng/ µl), 5U (unidades) da enzima Taq DNA polimerase (LongAmp® Taq PCR Kit) e água “milli-Q” para um volume final de 10µL. O seguinte programa foi utilizado: 94°C/30 s, 30 ciclos de 94°C/30 s, 50°C/1 min, 65°C/1min e 72°C/10 min para o término da extensão.

O resultado da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0.8% de acordo com o protocolo descrito em Sambrook *et. al.* (1989). O fragmento de DNA com o tamanho esperado (1230 bp), correspondente ao gene NS1 e os nucleotídeos adicionados pelos oligonucleotídeos, foi extraído do gel, eluído e purificado com o Kit GFX DNA and Gel Band Purification (GE) segundo instruções do fabricante.

Esse produto de PCR foi utilizado para clonagem no vetor pFastBac1/AccI-PSX, (cedido e construído pelo aluno de mestrado Daniel Mendes Pereira Ardisson de Araújo) que contém o gene da poliedrina de AcMNPV e sítio de *Bam*HI para fusão gênica na porção 5'-terminal do gene (Figura 10).

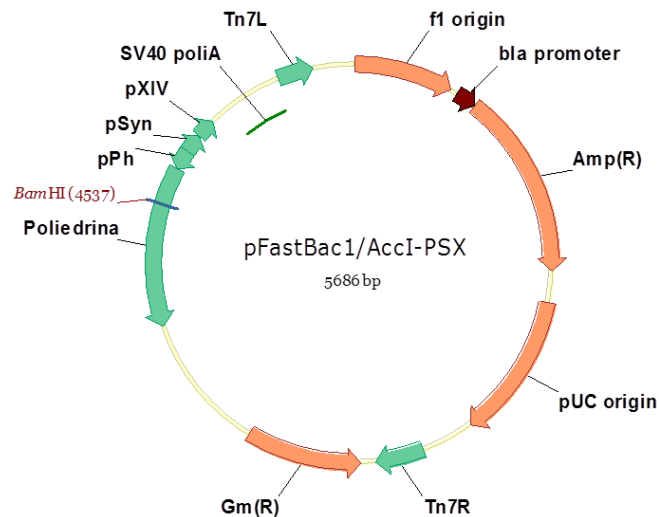


Figura 10. Mapa físico do plasmídeo pFastBac1/AccI-PSX que contém o gene da poliedrina de AcMNPV. Na figura é possível ver o sítio de restrição da enzima *Bam*HI, que foi utilizado para clonagem do gene NS1 de febre amarela, gene de resistência a Ampicilina (Amp), gene de resistência a Gentamicina (Gm), regiões de transposição Tn7R e Tn7L, sinal de poliadenilação SV40, promotores pSyn, pXIV e pPh, origem de replicação pUC, origem de replicação f1 (esse plasmídeo possui duas origens de replicação para gerar um maior número de cópias) e promotor do gene de resistência a ampicilina bla.

Para a clonagem, inicialmente o plasmídeo pFastBac1/ AccI-PSX foi digerido utilizando 10µl de DNA plasmidial (200 ng/µl), 2 µl de BSA (albumina de soro bovino), 2 µl do tampão de reação 10X da enzima *Bam*HI (Invitrogen), 10U (unidades) da enzima *Bam*HI (Invitrogen) e água “milli-Q” para um volume final de 20µL. A reação para digestão com a enzima de restrição foi mantida a 37° C por 16 h (“overnight”). Após a digestão, o vetor foi desfosforilado, utilizando 30 µl de DNA plasmidial digerido, 3,5 µl do tampão de reação 10X da enzima SAP (fosfatase alcalina de camarão – Promega), 1U (unidade) da enzima SAP (fosfatase alcalina de camarão – Promega) e água “milli-Q” para um volume final de 35µL. A reação foi incubada 15 min a 37°C e 15 min a 70°C. O plasmídeo pFastBac1/ Acc1-PSX digerido e

desfosforilado foi utilizado em reação de ligação, onde foi utilizada a enzima T4 DNA ligase (Promega) seguindo protocolo do fabricante (Figura 11).

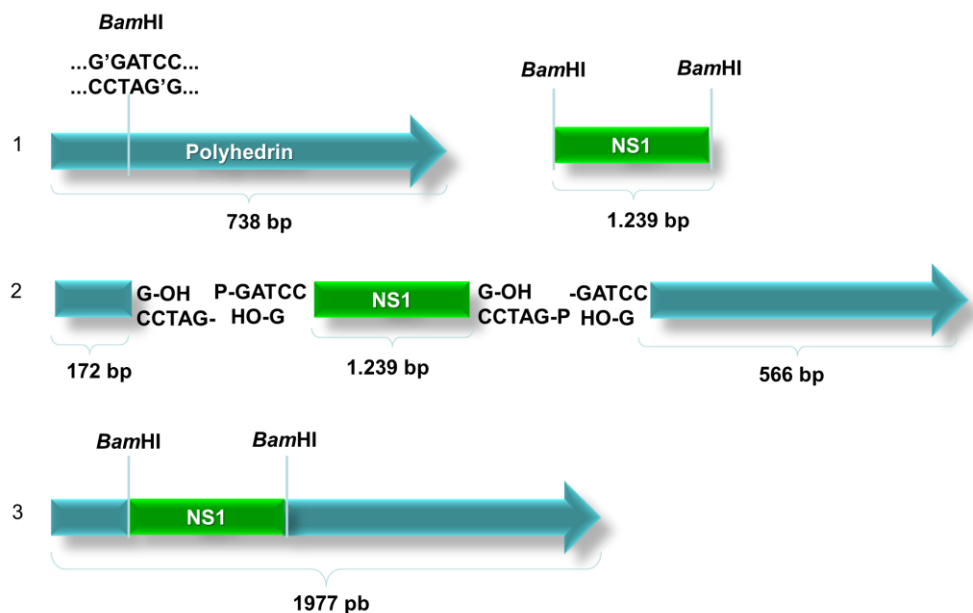


Figura 11. Esquema representativo da clonagem do gene NS1 através de fusão com o gene da poliedrina de AcMNPV. Em 1, são mostrados os genes da poliedrina (738 bp) e NS1 (1239 bp) e as posições dos sítios de *Bam*HI nos dois genes. Em 2, é mostrado a ligação entre os dois genes e em 3, o construto formado pela fusão.

Foi realizada uma transformação por choque térmico (Sambrook *et. al.*, 1989). Para essa transformação foram utilizadas células *Escherichia coli* DH5a quimio-competentes comerciais. Os clones resultantes foram selecionados pela resistência a ampicilina e gentamicina. Posteriormente, foi feita uma purificação por lise alcalina, onde 1 ml de pré-inóculo foi centrifugado 30 s a 14.000 rpm (Centrífuga 5418 – Eppendorf), o sobrenadante foi removido e o precipitado ressuspenso em 100 µl de solução I (50mM glicose, 25mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) seguido de

incubação em gelo por 2 min, foram acrescentado 200 µl de solução II (NaOH 0,2 M, SDS 1%) e incubado 5 min no gelo, acrescentados mais 150 µl de solução III (acetato de potássio 5M, ácido acético glacial, H₂O) e incubado 20 min no gelo, após incubação a amostra foi centrifugada por 10 min a 14.000 rpm (Centrífuga 5418 – Eppendorf) e o sobrenadante transferido para outro tubo, ao sobrenadante foram acrescentados 200 µl de clorofórmio, seguido de centrifugação por 5 min a 14.000 rpm (Centrífuga 5418 – Eppendorf). A fase superior formada na parte de cima do tubo foi coletada e transferida para outro tubo, onde foram adicionados 350 µl (0,6%) de isopropanol, seguido de centrifugação por 10 min a 14.000 rpm (Centrífuga 5418 – Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 500 µl de etanol 70%, a amostra foi centrifugada por 10 min a 14.000 rpm (Centrífuga 5418 – Eppendorf), o sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado foi ressuscitado em 50 µl de água.

A confirmação da clonagem foi feita através de digestão com as enzimas de restrição *SalI* e *EcoRI*. Foram utilizados para essa reação de digestão 2µl de DNA plasmidial, 2 µl do tampão de reação 10X (FastDigest® - Fermentas), 1U (unidade) da enzima *Sal I* (FastDigest® - Fermentas), 1U (unidade) da enzima *EcoRI* (FastDigest® - Fermentas) e água “milli-Q” para um volume final de 20µL. O DNA plasmidial confirmado foi então, sequenciado (Macrogen, Coréia do sul).

O construto gerado foi utilizado na construção do baculovírus recombinante vAcPolNS1, utilizando o sistema Bac-to-Bac® (Invitrogen).

3.3. Clonagem do gene NS1 nos vetores PENTR™ 11 e PDEST™ 17

Para o sistema de expressão utilizando *Escherichia coli*, foi utilizado o sistema Gateway® (Invitrogen). Inicialmente o plasmídeo pGem YFV NS1 foi digerido com as enzimas de restrição *Sal* I e *Not* I. O plasmídeo pGem YFV NS1 foi digerido utilizando 17 µl de DNA plasmidial (~100 ng/µl), 2,5 µl do tampão de reação 10X (FastDigest® - Fermentas), 1U (unidade) da enzima *Not* I (FastDigest® - Fermentas), 1U (unidade) da enzima *Sal* I (FastDigest® - Fermentas) e água “milli-Q” para um volume final de 25µL. Essa reação foi incubada a 37° C “overnight”. O plasmídeo comercial pENTR™ 11 (Invitrogen) foi digerido com as enzimas de restrição *Not*I e *Sal*I, sob as mesmas condições (Figura 12). A digestão do plasmídeo pGem YFV NS1 liberou o fragmento de 1100 bp do gene de 1230 bp da NS1, que foi analisado em gel de agarose 0.8%. Esse fragmento foi extraído do gel, eluído e purificado com o Kit GFX DNA and Gel Band Purification (GE) segundo instruções do fabricante. O fragmento de 1100 bp foi utilizado em reação de ligação com o plasmídeo pENTR™ 11 (Invitrogen) digerido, onde foi utilizada a enzima T4 DNA ligase (Promega) seguindo protocolo do fabricante. Foi realizada uma transformação por choque térmico (Sambrook *et. al.*, 1989) utilizando células *Escherichia coli* DH5a quimio-competentes comerciais. As colônias geradas, selecionadas pela resistência a Kanamicina, foram purificadas por lise alcalina (mesmas condições descritas no item 3.2), digeridas novamente utilizando 14.5 µl de DNA plasmidial (~50 ng/µl), 2,5 µl do tampão de reação 10X (FastDigest® - Fermentas), 1 U (unidade) da enzima *Not* I (FastDigest® - Fermentas), 1 U (unidade) da enzima *Sal* I (FastDigest® - Fermentas) e água “milli-Q” para um volume final de 25µL, essa digestão foi analisada em gel de agarose 0.8% para confirmação da obtenção do plasmídeo pENTR 11-NS1.

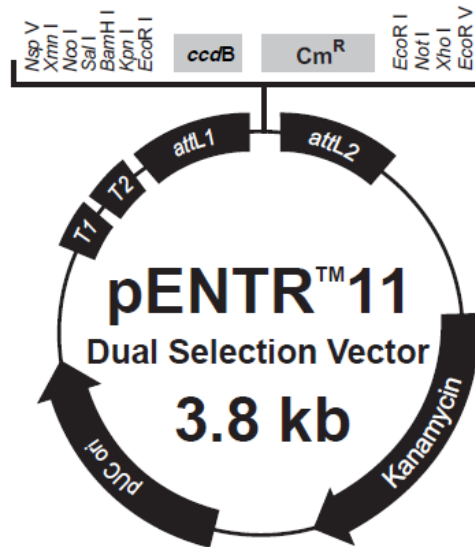


Figura 12. Mapa físico do plasmídeo comercial pENTR™ 11, sítios de restrição, origem de replicação pUC, gene de resistência a kanamicina, gene de resistência à cloranfenicol (Cm), regiões de recombinação *attL1* e *attL2*, *rrnB* T1 *rrnB* T2 seqüências de terminação da transcrição e gene *ccdB* (gene que codifica uma proteína que interfere na atividade da DNA girase bacteriana) são mostrados na figura. Fonte: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/A10467>.

O plasmídeo pENTR 11-NS1 foi utilizado para recombinação sítio específica com o plasmídeo comercial pDEST™17, através da tecnologia Gateway® (ítem 1.3.2.) (Figura 13). Para a reação de recombinação, foram utilizados 5 µl de DNA plasmidial pENTR11-NS1 (30 ng/µl), 5 µl de DNA plasmidial pDEST™17 (30 ng/µl), 4 µl do mix de enzima LR Clonase™. A reação foi incubada a 25° C “overnight”. Após incubação, foram acrescentados à reação 2 µl de 2 µg/µl de solução de Proteinase K, seguido de incubação a 37° C por 10 min. Foi realizada uma transformação por choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989) utilizando células *Escherichia coli* DH5α quimio-competentes comerciais. Os clones resultantes foram selecionados pela resistência a ampicilina. Posterior purificação por lise alcalina (descrito no ítem 3.2) e a confirmação da

recombinação foi feita através de digestão dos clones selecionados com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*. Para isso, foram utilizados 5 µl de DNA plasmidial 2,5 µl do tampão de reação 10X de cada enzima (Promega), 1U (unidade) de enzima *EcoRI* / *HindIII* (Promega) e água “milli-Q” para um volume final de 25µL, a análise da digestão para confirmação da clonagem foi analisada em gel de agarose 0.8%. O clone pDEST-NS1 foi confirmado e utilizado para expressão da proteína NS1.

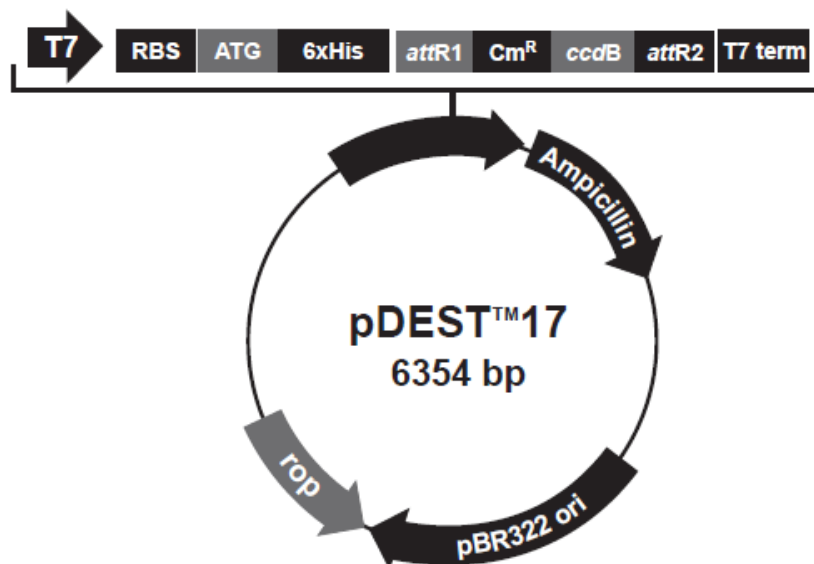


Figura 13. Mapa físico do plasmídeo comercial pDEST™ 17. A figura mostra o promotor T7, sítio de ligação do ribossomo (RBS), códon de iniciação ATG, cauda 6xHis, genes de resistência a cloranfenicol (Cm) e ampicilina, região de terminação da transcrição T7, sítios de recombinação attR1 e attR2, gene *ccdB* (gene que codifica uma proteína que interfere na atividade da DNA girase bacteriana), origem de replicação pBR322 e ORF *rop*. Fonte: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/11803012?ICID>.

3.4. Análise da expressão da proteína NS1 expressa em sistema procariótico

A proteína recombinante gerada pelo sistema de expressão utilizando *E.coli* foi expressa utilizando a linhagem BL21-AI de *E. coli* que é derivada da linhagem BL21 (Grodberg & Dunn, 1988; Studier & Moffatt, 1986). Inicialmente foi realizada uma transformação por choque térmico (Sambrook *et. al.*, 1989) utilizando as células BL21-AI como hospedeiras para o plasmídeo pDEST17-NS1, as colônias foram selecionadas por resistência à ampicilina. As colônias selecionadas foram pré-inoculadas em 2,5 ml de meio LB líquido (10 g triptona, 10 g NaCl, 5g de extrato de levedura, H₂O) com 2,5 µl de ampicilina (100 mg/ml) “overnight”. Esse pré-inóculo foi inoculado em 50 ml meio LB novo e mantido a 37° C sob agitação. A absorbância da cultura foi medida em espectrofotômetro (SmartSpec™ Plus - Bio-Rad) até que a OD₆₀₀ atingisse 0,9. Com a OD₆₀₀ de 0,9, foi acrescentado ao meio 500 µl de L-arabinose 0,2% para indução da proteína NS1. Após o acréscimo da L-arabinose ao meio, a amostra foi coletada em intervalos de 0 h (controle), 1 h, 2 h, 3 h e 4 h pós-indução. 4 h após indução, a amostra foi centrifugada a 5000 rpm (Centrífuga Beckman J2-MI rotor 14) durante 15 min, o precipitado foi armazenado a - 80° C.

A indução da proteína NS1 foi analisada em SDS-PAGE 12% (Laemmli,1970) utilizando o aparato Mini Protean II (BioRad). Após a análise em SDS-PAGE 12%, foi realizado um *Western blot*, para confirmação da expressão da proteína, Para este procedimento, foi utilizado o anticorpo policlonal anti-His (GE), seguindo o protocolo abaixo.

Foram feitos dois géis, utilizando 10 µL de cada amostra para análise usando o aparato Mini Trans-Blot Cells de acordo com o protocolo de instruções do fabricante

(Bio-Rad). Um dos géis foi corado e fixado em solução de 40% de metanol e 10% de ácido acético, 0,1% de corante Azul brilhante de Coomassie R-250 por 4h, com leve agitação. O outro foi utilizado para transferência das proteínas em uma membrana de nitrocelulose (Gibco BRL- Life Technologies) para o experimento de imunodeteção de proteínas (*Western blot*) descrito abaixo.

Com o auxílio do aparato de transferência Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad), as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose. As instruções foram seguidas de acordo com o protocolo do fabricante. Foi utilizado tampão de transferência *Bjerrum and Schafer-Nielsen* (48mM de Tris, 39mM de glicina, 20% de metanol, pH 9,2). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de PBS 1X e 3% de leite em pó desnatado adicionado de azida sódica por 16 h.

Depois, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS Tween (0,05%) por 5 min para retirar toda a solução de bloqueio. Adicionou-se uma solução de PBS/albumina bovina (BSA) 0,5% com o anticorpo primário policlonal anti-His (GE Healthcare) produzido em camundongos por 1 h. A seguir, a membrana foi lavada novamente 3 vezes em PBS Tween (0,05%) por 5 min e incubada em PBS/BSA 0,5% com o anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo, conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma) por mais 1 h sob agitação. Retirou-se a solução, membrana foi lavada 3 vezes com PBS Tween (0,05%) e 1 vez com o tampão da enzima fosfatase alcalina por 5 min. A solução reveladora, NBT/BCIP (Roche) foi adicionada servindo de substrato para a ação da fosfatase alcalina. O sistema foi mantido protegido da luz até a metabolização do substrato marcando, assim, a proteína de interesse devido à presença da enzima conjugada ao anticorpo secundário que se ligou ao anticorpo primário específico. Por fim, a reação foi interrompida com lavagens de água destilada evitando a marcação inespecífica.

3.4.1. Purificação da proteína recombinante

Após o ensaio de indução, a proteína recombinante foi purificada em condições desnaturantes seguindo protocolo The QIAexpressionist™ (QIAGEN). De acordo com esse protocolo, foram acrescentados 5 ml de tampão B (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris·Cl, 8 M urea, pH 8.0) para cada 1 g de precipitado, seguindo de incubação no gelo por 15 min, para lisar a amostra. Após incubação no gelo, a amostra foi agitada lentamente por 15-60 min, até que ficasse translúcida. Após a mudança de cor, a amostra (lisado) foi centrifugada 10.000 x g por 20-30 min. Ao sobrenadante foi acrescentado 1 ml de resina de resina Ni-NTA (50%) para cada 5 ml de amostra, seguindo de incubação, sob agitação, à temperatura ambiente por 60 min. Seguindo o protocolo de purificação, a amostra incubada com a resina foi colocada em uma coluna de cromatografia com o canal de saída fechado. Depois que a resina precipitou no fundo da coluna, formando uma banda, o canal de saída da coluna foi aberto para coleta do lisado. Após a coleta do lisado, a resina foi lavada duas vezes com 4 ml de tampão C (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris·Cl, 8 M urea, pH 6.3), a amostra lavada também foi coletada. Para a eluição da proteína, foram utilizado 0,5 ml de tampão D (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris·Cl, 8 M urea, pH 5.9) por 4 vezes e 0.5 ml de tampão E (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris·Cl, 8 M urea, pH 4.5) por 4 vezes, todas as amostras eluídas foram coletadas. Após a análise das amostras (lisado, lavagens e eluições) em gel SDS-PAGE 12 % (Laemmli, 1970), a amostra foi dialisada em membrana de diálise 0,025 µm - Millipore (para retirar a uréia presente nas soluções desnaturantes), analisada em SDS-PAGE 12% (Laemmli, 1970) e confirmada por *Western blot*, utilizando anticorpo policlonal anti-his (GE Healthcare), seguindo o protocolo descrito no ítem 3.4.

3.5. Análise da expressão da proteína NS1 expressa em sistema eucariótico

Para expressão da proteína NS1 utilizando células de inseto, o vetor pFasTBac1/AccI-PSX NS1 foi utilizado para construção do baculovírus recombinante vAcPolNS1 através do sistema Bac-to-Bac® (Invitrogen). O DNA do plasmídeo pFasTBac1/AccI-PSX NS1 foi inserido em células DH10Bac™ de acordo com as instruções do kit Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System (Invitrogen). As células foram incubadas em placas de Petri a 37°C por 48 h contendo os seguintes antibióticos: tetraciclina (10µg/mL), gentamicina (7µg/mL) e Kanamicina (50µg/mL); e também os marcadores de seleção IPTG (40µg/mL) e X-Gal (100µg/mL). As colônias brancas foram coletadas e purificadas por lise alcalina (lise alcalina adaptada, onde só foram utilizadas as soluções I, II, III e precipitação com isopropanol, descritos no item 3.2). Para a construção do baculovírus recombinante, 1 µg do DNA plasmidial da célula DH10-Bac contendo o bacmídeo recombinante, foi utilizado para transfectar células de inseto BTI-Tn5B1-4 (Granados *et. al.*, 1994). Foram adicionados 250 µL de meio de cultura TC-100 sem soro no DNA plasmidial (bacmídeo) em um placa de 35 mm (TPP). A mesma diluição foi realizada com 10 µL de lipossomos (Cellfectin®, Invitrogen). Os dois sistemas foram misturados e incubados por 15 min à temperatura ambiente. O meio de cultura da placa de células foi, posteriormente, substituído por 500 µL da mistura DNA/lipossomos, possibilitando a cobertura da monocamada de células. Após 3h de incubação da placa, à temperatura ambiente, foram adicionados 1,5 ml de meio de cultura TC-100 contendo 10 % de soro fetal bovino e as células incubadas a 27°C por sete dias. Depois deste intervalo, o sobrenadante da placa foi utilizado para a amplificação do vírus em nova placa de 100 mm (TPP) contendo células de inseto BTI-Tn5B1-4 (Granados *et. al.*, 1994). Extrato total das células infectadas BTI-TN5B1-4

(Granados *et. al.*, 1994) com o DNA plasmidial da célula DH10-Bac contendo o bacmídeo recombinante foi coletado e utilizado para confirmação da construção do baculovírus recombinante (vAcPolNS1). A confirmação foi feita em gel SDS-PAGE 12% (Laemmli, 1970) utilizando o aparato Mini Protean II (BioRad) e por *Western blot* utilizando o anti-soro policlonal anti-poliedrina (Ribeiro *et. al.*, 2009) nas mesmas condições descritas no item 3.4.

A infecção com o baculovírus recombinante vAcPolNS1 e análise morfológica de células BTI-Tn5B1-4 (Granados *et. al.*, 1994) foram analisadas utilizando microscopia de luz (Axiovert 100, Zeiss).

3.6. Produção do anti-soro policlonal anti-NS1

A proteína NS1 expressa em *E.coli*, utilizando o sistema Gateway® (Invitrogen) foi utilizada para produção de anti-soro policlonal anti-NS1. Antes da imunização dos animais, foram retirados aproximadamente 50 µl de sangue de cada animal através de punção retro-orbital. Esse sangue foi centrifugado 5000 rpm (Centrífuga 5418 – Eppendorf) por 5 min e armazenado -4° C para posterior análise. Foram utilizados 5 camundongos BALB/c machos, imunizados com 5µg de proteína purificada mais adjuvante completo de Freund's (Sigma). Após 15 dias da primeira imunização, os camundongos foram imunizados com 5µg de proteína mais adjuvante incompleto de Freund's (Sigma), seguindo 15 dias da segunda imunização os camundongos foram imunizados com somente 5µg de proteína purificada. Sete dias após a última imunização, os camundongos foram sacrificados (sangria pelo plexo retro-orbital) e aproximadamente 1 ml de soro foram coletados de cada animal. As imunizações foram feitas através de injeções intramusculares em cada animal. Logo após o sacrifício dos

animais foi realizado um *Dot blot* adaptado para testar a capacidade de imunodeteção da proteína NS1 pelo anticorpo. Foram utilizados pedaços de aproximadamente 1,5 cm x 1,5 cm de membrana de nitrocelulose (Gibco BRL – Life Technologies), a cada pedaço de membrana foi colocado aproximadamente 5µl de extrato total de células BL21-AI induzidas por 4 h. As membranas secaram em temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com solução de PBS 1X e 3% de leite por 4 h. Depois, as membranas foram lavada 3 vezes com PBS Tween (0,05%) por 5 min para retirar toda a solução de bloqueio. Adicionou-se uma solução de PBS/albumina bovina (BSA) 0,5% com o soro dos camundongos (imunizados e não-imunizados) (1:500) por 1 h. A seguir, as membranas foram lavada novamente 3 vezes em PBS Tween (0,05%) por 5 min e incubadas em PBS/BSA 0,5% com o anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo, conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma) por mais 1 h sob agitação. Retirou-se a solução, e as membranas foram lavada 3 vezes com PBS Tween (0,05%) e 1 vez com o tampão da enzima fosfatase alcalina por 5 min. A solução reveladora, NBT/BCIP (Roche) foi adicionada servindo de substrato para a ação da fosfatase alcalina. O sistema foi mantido protegido da luz até a metabolização do substrato marcando, assim, a proteína de interesse devido à presença da enzima conjugada ao anticorpo secundário que se ligou ao anticorpo primário específico. Por fim, a reação foi interrompida com lavagens de água destilada evitando a marcação inespecífica.

A confirmação da obtenção do anti-soro policlonal anti-NS1 foi feita através de *Western blot* (mesmas condições descritas no item 3.4) utilizando extrato de células infectadas com o baculovírus recombinante vAcPOLNS1.

4. Resultados

4.1. Fusão do gene NS1 na porção 5' do gene da poliedrina de AcMNPV

O gene NS1 do YFV foi clonado no na porção 5' do gene da poliedrina presente no vetor pFastBac1/ AccI-PSX, gerando o plasmídeo pFastBac1/AccI-PSX-NS1 (Figura 14).

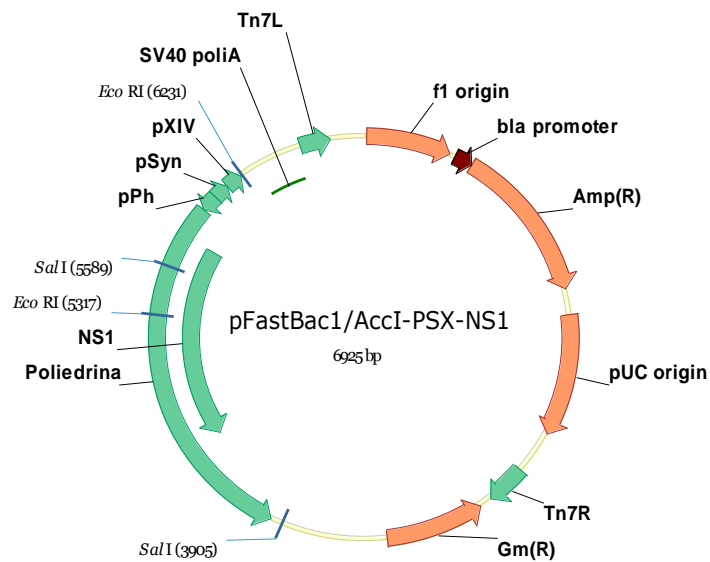


Figura 14. Mapa físico do plasmídeo pFastBac1/AccI-PSX NS1 gerado pela fusão do gene da poliedrina com o gene NS1 do vírus da febre amarela e localização dos sítios de restrição para as enzimas *SalI* e *EcoRI*

A clonagem foi confirmada por digestão do DNA do plasmídeo recombinante com as enzimas de restrição *Sal I* e *EcoRI*, que além de confirmarem a inserção do gene NS1, confirmaram também a correta orientação do gene. A digestão com a enzima de restrição *Sal I* liberou um fragmento de 1684 bp, e a digestão com a enzima de restrição *EcoRI* liberou um fragmento de 914 bp, confirmando, assim, a correta inserção e orientação do gene NS1. A digestão com as enzimas de restrição foi analisada em gel de agarose 0.8% (Figura 15).

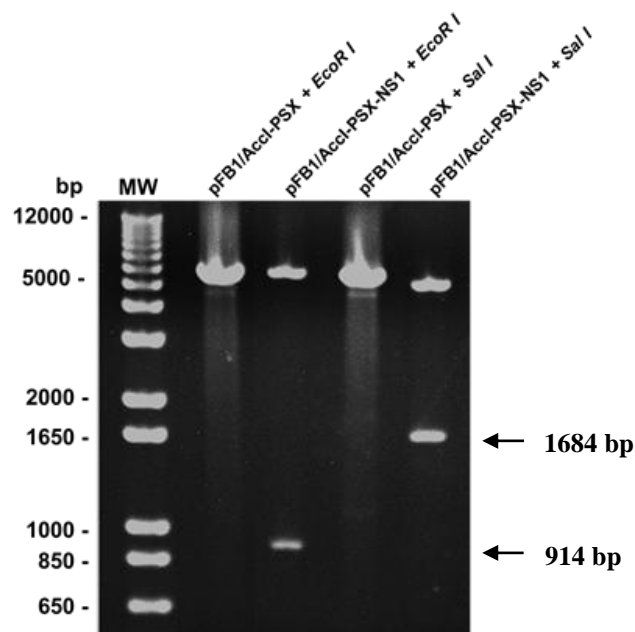


Figura 15. Gel de agarose 0.8% mostrando os fragmentos gerados pela digestão do plasmídeo pFastBac1/Acc-PSX-NS1 com as enzimas de restrição *EcoRI* e *Sal I*. Os fragmentos de 1684 bp e 914 bp estão indicados na figura e representam a correta inserção do gene NS1 na porção 5' do gene da poliedrina

O clone recombinante contendo o gene da poliedrina e da proteína NS1, foi então sequenciado para confirmação de sua sequência (Figura 16).

```
1 atgccggattattcataccgtcccaccatcgggcgtacctactgtg
M P D Y S Y R P T I G R T Y V
46 tacgacaacaagtactacaaaaattaggtgccgttatcaagaac
Y D N K Y Y K N L G A V I K N
91 gctaagcgcaagaagcacttcgccgaacatgagatcgaagaggct
A K R K K H F A E H E I E E A
136 accctcgaccccctagacaactacctagtggctgaggatccctatg
T L D P L D N Y L V A E D P M
181 gatcaaggatgtgcaataaactttggcaagagagaactcaagtgt
D Q G C A I N F G K R E L K C
226 ggggatggcatcttcgtttttagagattcagatgactggctgaac
G D G I F V F R D S D D W L N
271 aagtattcatactatccagaggaccagtaaaacttgcttcaata
K Y S Y Y P E D P V K L A S I
316 gtgaaagcttcctttgaagaaggaaagtgtggcctgaactcagtc
V K A S F E E G K C G L N S V
361 gactccctggaacatgaaatgtggagaagcagggcagatgagatc
D S L E H E M W R S R A D E I
406 aatgccattcttgaggagaatgaggtagacatctcagtggtggtc
N A I L E E N E V D I S V V V
451 caagactcaaaaaacatttatcagagagggacacatccgttttcc
Q D S K N I Y Q R G T H P F S
496 agaatacgtgatggcctgcaatacggctggaagacttggggcaaa
R I R D G L Q Y G W K T W G K
541 aaccttggttctctccaggaagaagaatggaagcttcatcata
N L V F S P G R K N G S F I I
586 gatgggaagtccaggaagagtgctcgttttcaaacagagtgtgg
D G K S R K E C P F S N R V W
631 aattccttcagatagaagagtttgggacaggagtgttcaccact
N S F Q I E E F G T G V F T T
676 cgcgtgtacatggatgcagtcctttgaatacactatggattgtgat
R V Y M D A V F E Y T M D C D
721 ggatctatcctgggtgcagcagtgatgaaagaagagcgcgcat
G S I L G A A V N G K K S A H
766 gggccccaacattctggatgggaagccatgaggtgaatggaaca
G S P T F W M G S H E V N G T
811 tggatgattcataccctagagacactggactacaaggaatgtgaa
W M I H T L E T L D Y K E C E
856 tggccactgacacacacagattggaacatcagttgaagagagtgc
W P L T H T I G T S V E E S D
901 atgttccatgccgaggtcaattgggggtccagtttagctcccacaac
M F M P R S I G G P V S S H N
946 cacattccgggatataaggtccagacaaacggaccctggatgcag
H I P G Y K V Q T N G P W M Q
991 gtgccactagaggtgaaaagggaagcttgcccaggaaccagtggtg
V P L E V K R E A C P G T S V
1036 gttgttgacggaggtgtgatgggcgtggaaaatcgactagatcg
V V D G G C D G R G K S T R S
1081 accactgacagcgggaagatcattcctgaatggtgctgccgctca
T T D S G K I I P E W C C R S
1126 tgcacaatgccaccagtgagcttccacgggagtgatggttgctgg
C T M P P V S F H G S D G C W
1171 tattctatggagattagaccaaagaagacacatgatagccacctg
Y S M E I R P K K T H D S H L
1216 gtccgctcatgggtgacggctggagagatccatgcagtcctttt
V R S W V T A G E I H A V P F
1261 ggattggtgagcatgatgatagccatggaaagtggattagggaag
G L V S M M I A M E V V L R K
1306 agacagggacccaagcaaatactgggtggaggcatgggtcttcta
R Q G P K Q I L G G G M V L L
1351 ggagccatgttagttggacaggtgactatcttgacttgctaaag
```

```

      G A M L V G Q V T I L D L L K
1396 ctcacagtggcttgggatccctttcctgggacccggcaagaaccaa
      L T V A W D P F L G P G K N Q
1441 aaactcactctcttcaaggaaatccgtaatgttaaacccgacacg
      K L T L F K E I R N V K P D T
1486 atgaagcttgtcgttggatggaaaggaaaagagttctacagggaa
      M K L V V G W K G K E F Y R E
1531 acttggacccgcttcatggaagacagcttccccattgttaacgac
      T W T R F M E D S F P I V N D
1576 caagaagtgatggatgtttcccttgttcaacatgctgccact
      Q E V M D V F L V V N M R P T
1621 agaccaaccgcttgttacaattcctggccaacacgctctgcgt
      R P N R C Y K F L A Q H A L R
1666 tgcgaccccgactatgtacctcatgacgtgattaggatcgctcgag
      C D P D Y V P H D V I R I V E
1711 ccttcatgggtgggagcaacaacgagtagcgcacgctggct
      P S W V G S N N E Y R I S L A
1756 aagaagggcggcgctgccaataatgaaccttactctgagtac
      K K G G G C P I M N L H S E Y
1801 accaactcgttcgaacagttcatcgatcggtcatctgggagaa
      T N S F E Q F I D R V I W E N
1846 ttctacaagcccatcgtttacatcggtaccgactctgctgaagag
      F Y K P I V Y I G T D S A E E
1891 gaggaatttccttgaagtttccctgggttcaaagtaaaggag
      E E I L L E V S L V F K V K E
1936 ttgaccagacgcacctctgttccactggtccggcgtattaa 1977
      F A P D A P L F T G P A Y *

```

Figura 16. Sequência do gene NS1 fusionado ao gene da poliedrina. As bases realçadas em vermelho são correspondentes ao gene da poliedrina e as bases de cor preta são correspondentes ao gene NS1. Os nucleotídeos em negrito e realçados em verde representam os sítios de restrição *Bam*HI (GGATCC). Os asteriscos representam o sítio de iniciação e de terminação. Essa sequência foi confirmada através de sequenciamento parcial do plasmídeo pFastBac1/AccI-PSX NS1, para isso foram utilizados os oligonucleotídeos pPolAcAg310-348 F e pPolAcAg310-348 R (Tabela 2) que anelam na posição 310 do gene da poliedrina.

4.2. Obtenção do baculovírus recombinante vAcPolNS1

O plasmídeo pFastBac1/Acc-PSXNS1 foi utilizado para transposição sítio específica, através do sistema Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System (Invitrogen). As colônias brancas, que indicam (por interrupção da α -complementação

do gene *lacZ*) transposição gênica, foram coletadas e utilizadas para transfecção em células de inseto BTI-Tn5B1-4 (Figura 17).

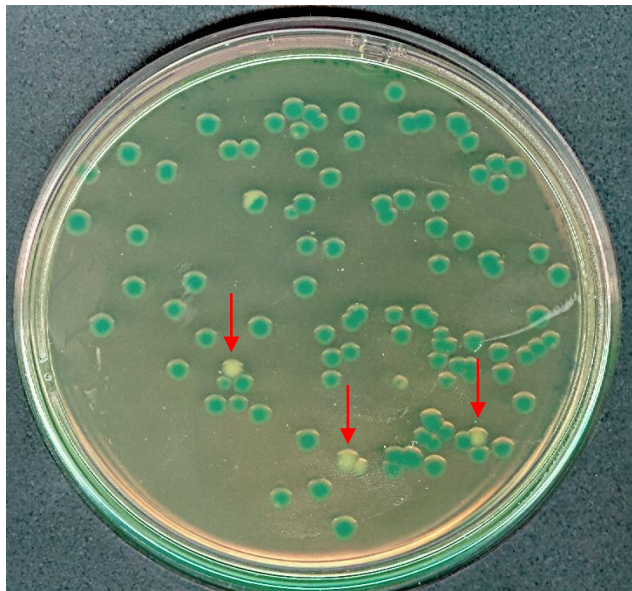


Figura 17. Colônias brancas (setas) geradas pela transformação do plasmídeo pFastBac1/Acc-PSXNS1 em células DH10Bac™, através do Bac-to-Bac® Baculovírus Expression System (Invitrogen).

O DNA do bacmídeo recombinante (vAcPolNS1) foi utilizado para transfecção em células BTI-Tn5B1-4 e sete dias pós-transfecção, o sobrenadante foi coletado e usado para infectar células Tn5B. A figura 18 mostra que a infecção das células com os vírus selvagem e recombinante (vAcPolNS1) induziram uma mudança morfológica (células ficaram arredondadas e núcleo hipertrofiado), característicos de infecção viral, porém observa-se formação de massa escura no interior das células infectadas com o vAcPolNS1 (seta vermelha e detalhe), diferentemente do observado nas células infectadas com o vírus selvagem, que apresentou o corpo de oclusão formado pela proteína poliedrina típico do fenótipo de infecção ODV (seta preta no detalhe).

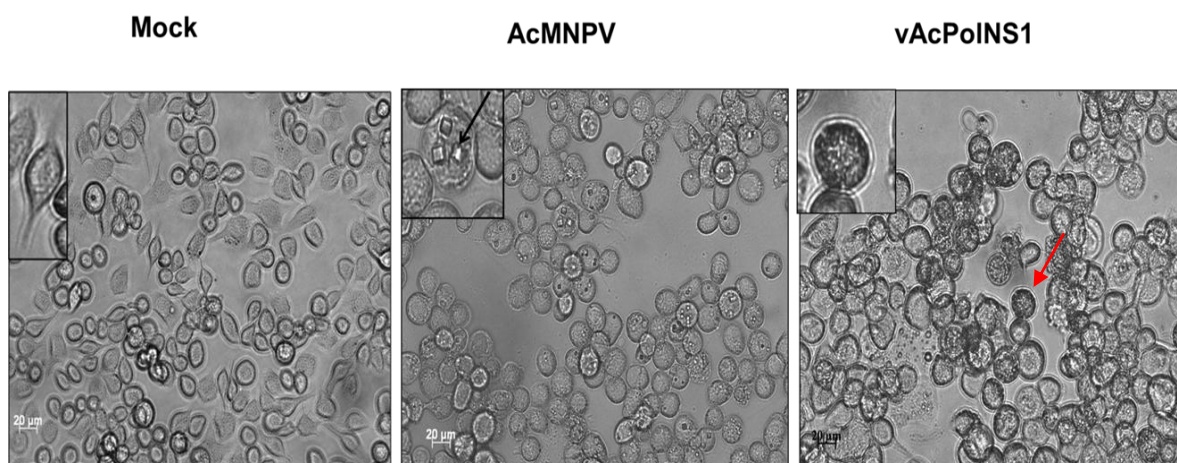


Figura 18. Efeito citopático da infecção de células BTI-Tn5B1-4 com diferentes baculovirus a 72 h.p.i. A seta preta no detalhe mostra o corpo de oclusão típico do fenótipo infectivo ODV de baculovirus. A seta vermelha destaca uma célula arredondada (típica de infecção viral) com massa escura em seu interior.

O SDS-PAGE 12% confirmou a expressão de uma proteína de aproximadamente 78 kDa (seta vermelha), compatível com o tamanho da proteína fusionada. A expressão foi confirmada por *Western blot*, utilizando um anti-soro policlonal anti-poliedrina (Ribeiro *et. al.*, 2009) feito em coelho como marcador (seta verde). A seta laranja, mostra a marcação da proteína poliedrina do vírus AcMNPV (Figura 19).

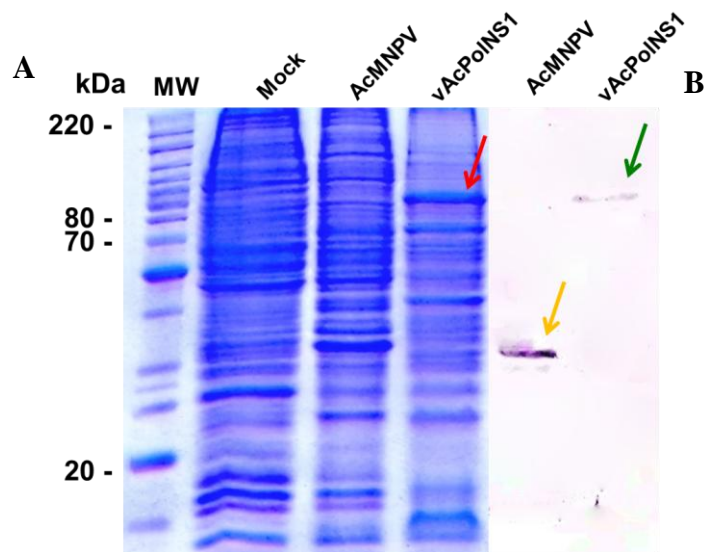


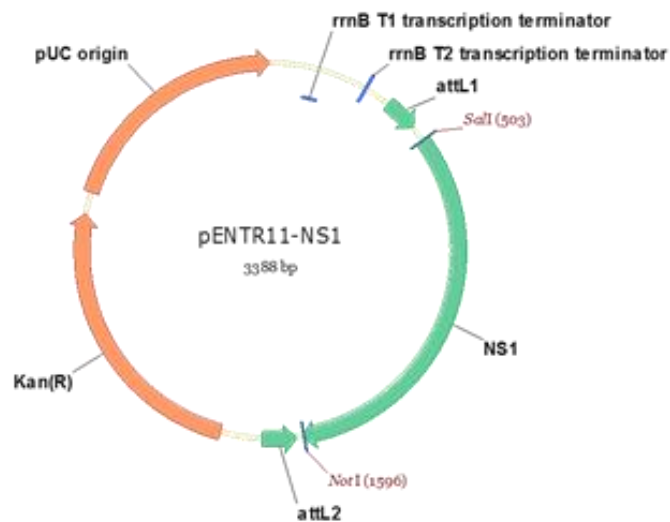
Figura 19. Análise do perfil da proteína recombinante NS1 fusionada à proteína poliedrina em células de inseto. (A) SDS-PAGE 12 mostrando células BTI-Tn5B1-4 infectadas com: baculovírus selvagem AcMNPV e baculovírus recombinante, contendo gene NS1 fusionado a poliedrina vAcPoINS1 (seta vermelha, mostrando a expressão da proteína recombinante de aproximadamente 78 kDA). A confirmação da expressão da proteína recombinante foi feita através de *Western blot* (B), utilizando anti-soro policlonal anti-poliedrina (seta amarela mostrando a proteína poliedrina do vírus selvagem AcMNPV e seta verde mostrando a marcação da proteína recombinante).

4.3. Confirmação da clonagem do gene NS1 de febre amarela no vetor pENTRTM11 e pDESTTM17

Para confirmar a clonagem do gene NS1 de febre amarela no vetor comercial pENTRTM11 foi feita a digestão com as enzimas *SalI* e *NotI* e o resultado analisado em gel de agarose 0.8%. Observou-se a liberação do fragmento de 1100 bp, correspondente

ao tamanho reduzido do gene da NS1 e assim confirmando a obtenção do plasmídeo pENTER11-NS1 (Figura 20).

A



B

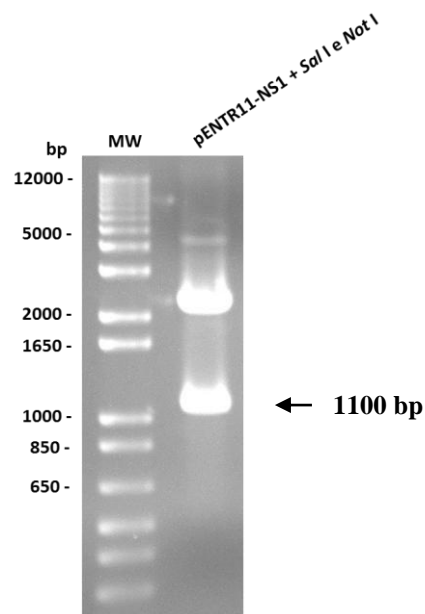


Figura 20. A) Mapa físico do plasmídeo pENTER11-NS1 e sítios de restrição *SalI* e *NotI* B) Gel de agarose 0.8% mostrando fragmentos gerados a partir da digestão do plasmídeo recombinante com as enzimas de restrição *SalI* e *NotI*. A seta indica o fragmento de 1100 bp correspondente ao gene NS1.

Após confirmação da clonagem e confirmação do plasmídeo pENTR11-NS1, seguindo protocolo Gateway® Technology (Invitrogen), foi conduzida a recombinação para o plasmídeo pDEST™ 17, para a obtenção do plasmídeo pDEST17-NS1 (Figura 21).

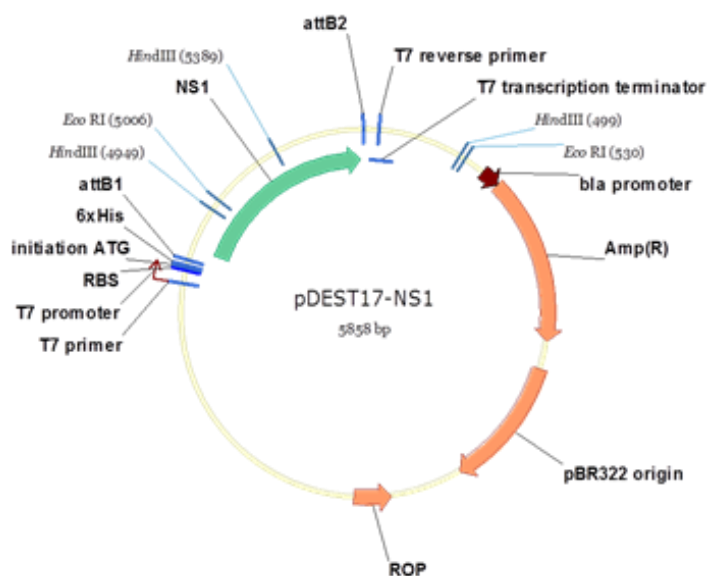


Figura 21. Mapa físico do plasmídeo pDEST17-NS1 e sítios de restrição para as enzimas *HindIII* e *EcoRI*

A confirmação da correta recombinação do gene NS1 de febre amarela no vetor foi feita através de digestão com as enzimas de restrição *HindIII* e *EcoRI*. A digestão foi analisada em gel de agarose 0.8% e mostrou um fragmento de 1382 bp quando o vetor foi digerido com *EcoRI* e dois fragmentos de 440 bp e 968 bp quando digerido com *HindIII*. Confirmando, assim, a obtenção do vetor pDEST17-NS1 (Figura 22).

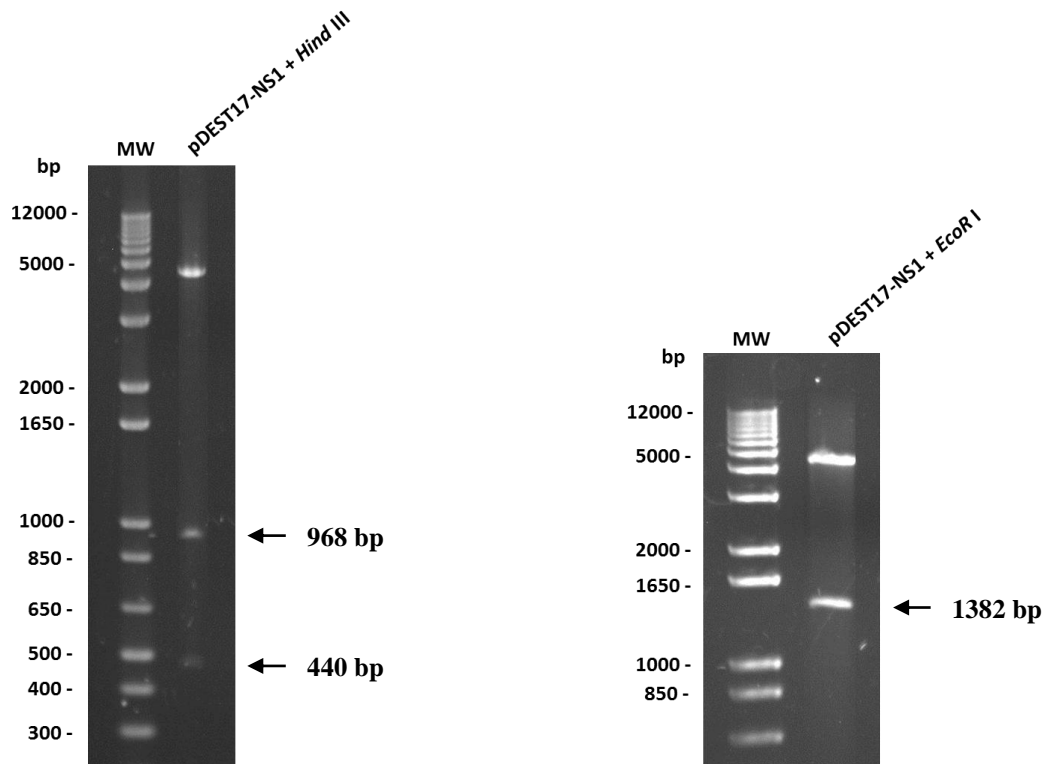


Figura 22. Gel de agarose 0.8 % mostrando fragmentos de 968 bp e 440 bp, gerados quando o plasmídeo pDEST17-NS1 foi digerido com *Hind*III e o fragmento de 1382 bp quando o plasmídeo foi digerido com *Eco*RI.

4.4. Obtenção da proteína NS1 de febre amarela expressa em *Escherichia coli*

O vetor pDEST17-NS1 foi utilizado para ensaio de indução da proteína NS1 com o indutor L-arabinose. O extrato total das células BL21-AI induzidas, foi utilizado para análise da expressão da proteína durante 0, 1, 2, 3 e 4 h pós-indução. O gel SDS-PAGE 12% mostrou que a partir de 1 h pós-indução é possível ver a expressão de uma banda protéica de aproximadamente 43 kDa, compatível com o tamanho reduzido da

proteína NS1. Como controle, não se observa a expressão da proteína de aproximadamente 43 kDa quando as células foram analisadas a 0h, ou seja, sem a presença do indutor. A confirmação da expressão da proteína NS1 foi feita por *Western blot*, utilizando anticorpo policlonal anti-His (Figura 23).

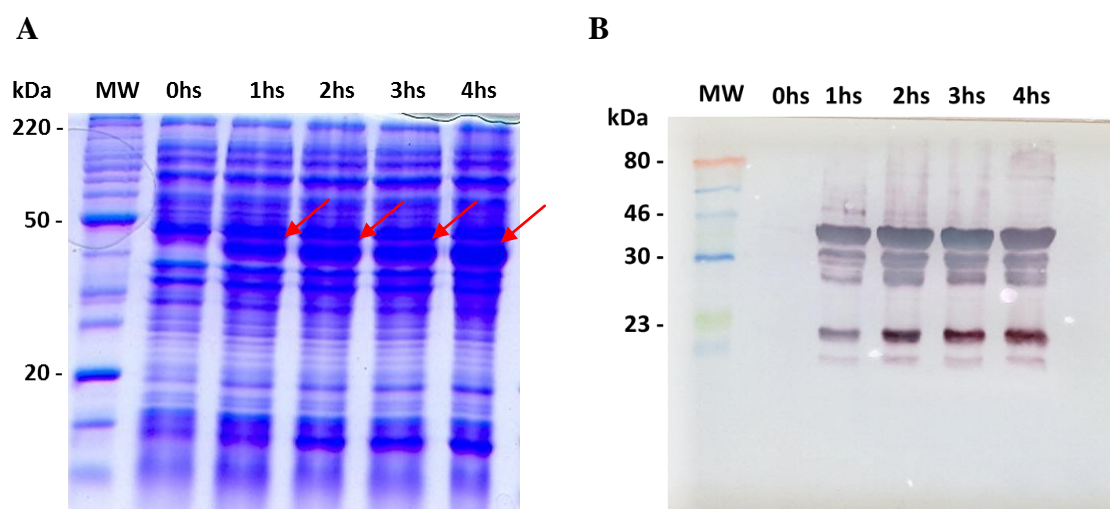


Figura 23. Análise do perfil de expressão da proteína NS1 em *E. coli*. A) SDS-PAGE 12% mostrando a expressão da proteína NS1 de 43 kDa durante 1, 2, 3 e 4 h (setas vermelhas) pós-indução com indutor L-arabinose, nota-se que não se observa a expressão da proteína a 0h pós-indução B) *Western blot* confirmando a expressão da proteína NS1, para esse experimento, foi utilizado anticorpo policlonal anti-His.

Após o ensaio de indução, foi feita a purificação da proteína (utilizando extrato total de células induzidas durante 4 h) em condições desnaturantes, seguindo o protocolo The QIAexpressionist™ (QIAGEN). Como resultado, uma proteína de aproximadamente 43 kDa foi purificada e confirmada por *Western blot*, utilizando anticorpo policlonal anti-His, confirmado a purificação da proteína NS1 (Figura 24).

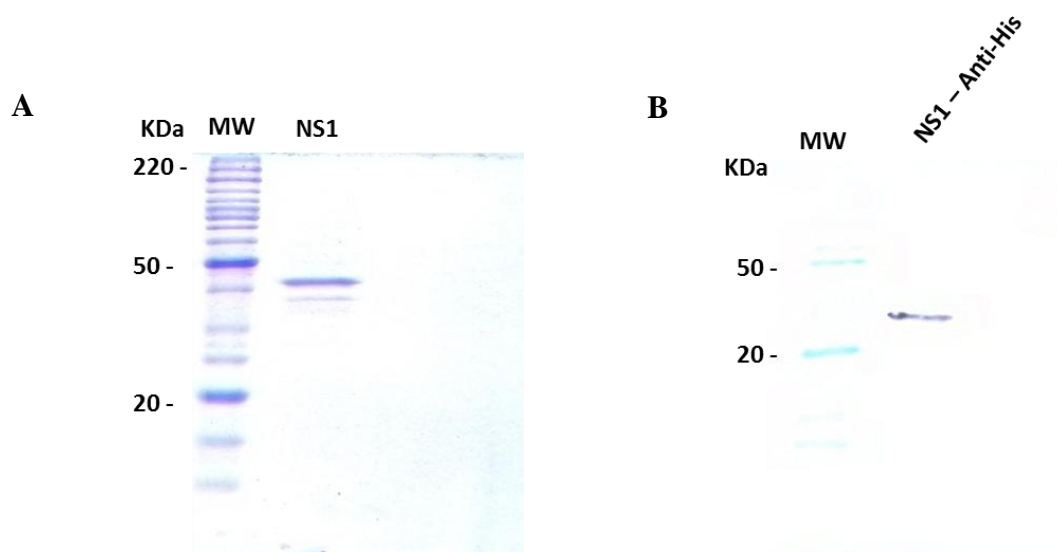


Figura 24. Análise do grau de pureza da proteína NS1 e sua detecção. A) SDS-PAGE 12% mostrando a purificação de uma proteína de aproximadamente 43 kDa. B) *Western blot* confirmando a purificação da proteína NS1.

4.5. Obtenção do anti-soro policlonal anti-NS1

A proteína NS1 expressa em *E.coli* foi utilizada para obtenção do anti-soro policlonal anti-NS1 produzido em camundongos BALB/c. Foi realizado um *Dot blot* logo após o sacrifício dos animais, que mostrou que o título do anti-soro policlonal anti-NS1 obtido foi similar em todos os animais analisados, e que este, marcou a proteína NS1 utilizada como antígeno neste experimento. Observa-se leve marcação inespecífica nas membranas que foram incubadas com soro dos animais não – imunizados (controle). Deve-se lembrar que o soro dos animais também terá anticorpos contra eventuais impurezas do antígeno, assim como anticorpos contra outros antígenos aos que o animal esteve exposto anteriormente. Outra hipótese para essa marcação

inespecífica é a grande quantidade de anti-soro utilizada na reação (1:500). Outras quantidades foram testadas e somente em alta concentração foi possível observar imunomarcação. Grandes quantidades de anticorpo em uma reação de imunodeteção podem aumentar a possibilidade de marcação inespecífica. Entretanto, deve-se ressaltar que mesmo havendo leve marcação inespecífica, o grau de especificidade do anti-soro foi satisfatório, tendo em vista a diferença de marcação da proteína NS1 quando comparados os soros dos animais imunizados e não-imunizados (Figura 25).

Camundongos	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5
Não-Imunizados					
Imunizados					

Figura 25. *Dot blot* realizado para analisar a especificidade do anti-soro policlonal anti-NS1. Foram imunizados 5 animais. Como controle foi utilizado soro de animais não-imunizados.

Para confirmação da especificidade do anti-soro anti-NS1 com a proteína NS1 expressa em células de inseto, extrato total de células infectadas com vAcOcc+ (vírus AcMNPV que produz corpos de oclusão), vSynNS1 (vírus derivado do AcMNPV, que contém o gene NS1 de febre amarela (Ramos *et. al.*, 2002) e 3 diferentes clones do vírus recombinante vAcPolNS1, foram utilizados para análise em gel SDS-PAGE 12% (Figura 26).

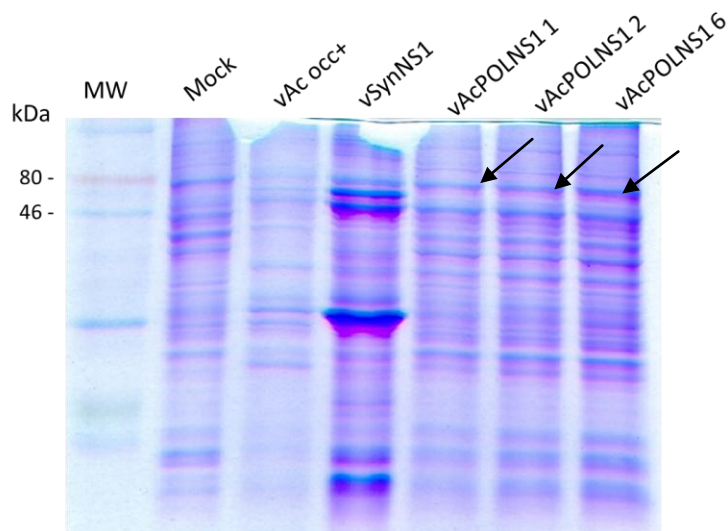


Figura 26. SDS-PSGE 12 % das amostras vAcOcc+, vSynNS1 e 3 diferentes clones do vírus recombinante vAcPolNS1 (setas pretas).

A confirmação da especificidade do anti-soro policlonal anti-NS1 foi feita por *Western blot*. Observa-se a marcação de duas bandas no extrato de células infectadas com o vírus vSynNS1, utilizado como controle. O tamanho esperado para a proteína recombinantes NS1, expressa pelo vírus vSynNS1 é de 45 kDa, entretanto, o anti-soro marcou uma banda acima de 46 kDa e outra logo acima de 30 kDa. A marcação da banda superior pode ter sido em função da alta quantidade de anti-soro utilizada (1:500). Outra possibilidade é contaminação do poço durante a aplicação do gel de poliacrilamida. Porém, não observa-se marcação inespecífica nos controles (Mock e vAcOcc+), e a banda de aproximadamente 78 kDa correspondente a proteína NS1 fusionada a poliedrina foi reconhecida nos extratos de células infectadas com os 3 clones diferentes da proteína recombinante, confirmando a especificidade satisfatória do anti-soro. Já a banda menor, acima de 30 kDa, pode ser devido a um processamento

proteolítico ocorrido nas células de inseto. Mais testes devem ser realizados para descartar as hipóteses acima citadas (Figura 27).

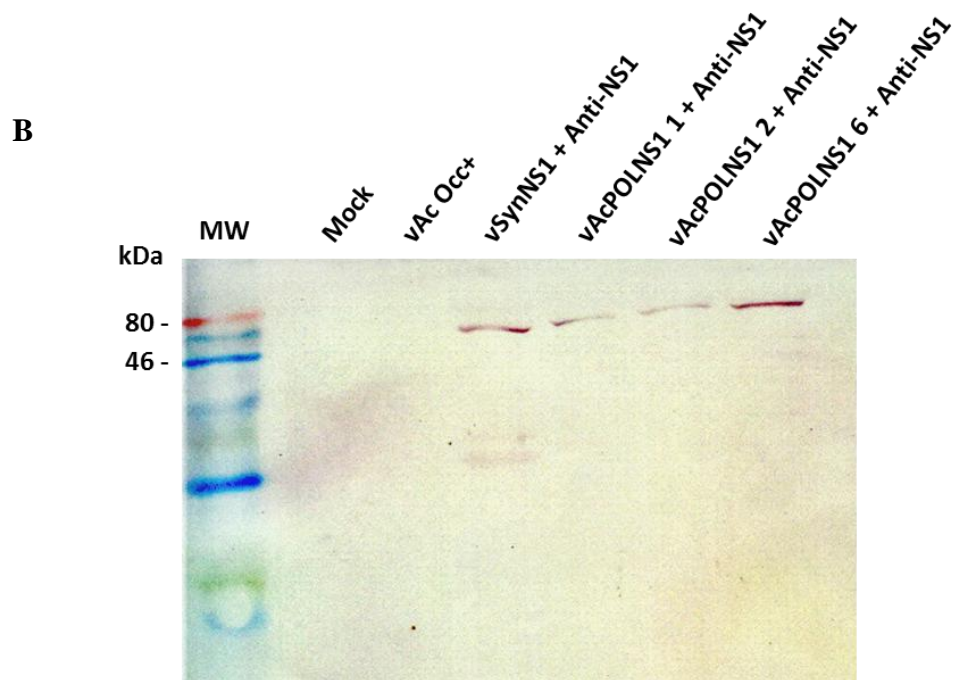


Figura 27. *Western blot* confirmando a marcação das proteínas NS1 com o anti-soro policlonal anti-NS1.

5. Discussão

A utilização de dois sistemas de expressão foi fundamental para análise do comportamento das proteínas NS1 recombinantes. Observou-se que ambos os sistemas expressaram com sucesso a proteína NS1 e que essas foram reconhecidas através de *Western blot* utilizando anticorpos específicos. A utilização de dois sistemas de

expressão diferentes para expressão dessa proteína mostra-se uma ferramenta importante para estabelecer um protocolo padrão pra expressão da proteína NS1 de febre amarela.

Apesar do cultivo de bactérias ser mais econômico que o de células de inseto, muitas vezes o custo do processo de purificação das proteínas expressas em bactérias é alto, tornando a expressão em células de inseto vantajosa (Montor & Sogayar, 2003). Mesmo com a disponibilidade de diversos sistemas para expressão de proteínas, as bactérias permanecem como a escolha da maioria dos sistemas de expressão, porém, devido à falta de maquinaria para modificações pós-traducionais em bactérias, a produção de proteínas recombinantes eucarióticas representa um desafio imenso, que invariavelmente leva à produção de proteínas biologicamente inativas neste hospedeiro (Sahdev *et. al.*, 2008). O sistema de expressão de baculovírus em células de inseto fornece um ambiente adequado para a síntese de proteínas eucarióticas oferecendo condições para que ocorra o dobramento adequado da estrutura da proteína, formação de pontes dissulfídicas, oligomerização e modificações pós-traducionais similares às produzidas em células de mamíferos (O'Reilly *et. al.*, 1992).

Vários estudos vêm sendo realizados a fim de estabelecer o melhor sistema de expressão para diversas proteínas. O estudo de Victor *et. al.*, 2010 utilizou ambos os sistemas eucariótico (células de inseto) e procariótico (*E. coli*) para expressar domínios da proteína PFD1235w de malária. O autor destaca que a produção de proteínas recombinantes com seu dobramento e estrutura tridimensional similar ao natural, é essencial para a elucidação da estrutura tridimensional de proteínas da malária e para determinar quais epítomos estruturais estão expostos na superfície de eritrócitos durante a infecção natural de malária. Além disso, destaca que o sistema de expressão utilizando baculovírus foi nitidamente superior ao sistema de expressão utilizando *E.coli* na

produção de um maior número de diferentes domínios da proteína recombinante PFD1235w, e estes foram significativamente mais fáceis de purificar com maior rendimento.

Neste trabalho, para expressar a proteína NS1 fusionado ao gene da poliedrina do baculovírus AcMNPV, em sistema eucariótico, foi utilizado o vetor pFastBac1/Accl-PSX NS1, que contém o gene da poliedrina do baculovírus AcMNPV, e para construir o baculovírus recombinante, foi utilizado o sistema Bac-to-Bac® (Invitrogen). Diferentemente do que se esperava, a fusão do gene NS1 com o gene da poliedrina no baculovírus recombinante parece não ser estável e a purificação da proteína recombinante através de gradiente de sacarose não foi possível. Além disso, a infecção de células de inseto utilizando o baculovírus recombinante, não apresentou a formação de corpos de oclusão como o esperado, mesmo com o gene da poliedrina (responsável pela formação dos corpos de oclusão) ter sido clonado de forma completa e sem modificações na sua sequência gênica. Deve-se ressaltar que o vetor pFastBac1/Accl-PSX utilizado para fusão do gene NS1 com o gene da poliedrina, possui sítio para clonagem interrompendo o gene da poliedrina na sua porção mais 5`-terminal. Essa estratégia de fusão é uma estratégia nova e sem trabalhos similares para comparação, assim, o resultado deste trabalho, mostra-se o primeiro passo para análise dessa nova estratégia de fusão com o gene da poliedrina.

Outros trabalhos vêm utilizando esta mesma técnica para expressão de proteínas heterólogas, porém sem interromper o gene da poliedrina, como foi descrito neste trabalho. Je *et. al.* (2003) e Chang *et. al.* (2003), demonstraram que é possível a produção de baculovírus recombinantes que possuem uma ou mais proteínas heterólogas incorporadas nos corpos de oclusão, mantendo o fenótipo dos vírus oclusos. Je *et. al.* (2003), construíram um vírus recombinante capaz de coexpressar a poliedrina

nativa e a poliedrina fusionada com a proteína fluorescência verde (GFP), demonstrando que a incorporação de uma proteína heteróloga nos corpos de oclusão depende da interação entre a poliedrina nativa e a poliedrina fusionada. Barros (2011) expressou a glicoproteína do vírus da Raiva em células de inseto fusionada com a poliedrina de AcMNPV. A proteína de fusão construída foi eficientemente expressa em células de inseto, formando corpos de oclusão e detectada com um anticorpo específico para cauda de histidina.

O baculovírus também vem sendo utilizado para expressar proteínas de flavivirus. Zhang *et. al.* (1988), utilizaram o sistema baculoviral para expressar três proteínas estruturais (proteínas C, pré-M e E) e duas não-estruturais (NS1 e NS2a) do vírus da dengue. Todas as proteínas foram corretamente expressas. Entretanto, coelhos imunizados com os produtos protéicos exibiram um baixo título de anticorpos contra as proteínas pré-membrana, do envelope e NS1. Li *et. al.* (2009) utilizaram um baculovírus recombinante (BV-G-E) para expressão da proteína E (envelope) do vírus da Encefalite Japonesa (JEV). Para construir esse baculovírus recombinante, o gene E foi clonado no vetor pFastBac-VSV/G, que possui o gene da glicoproteína do vírus da estomatite vesicular (VSVG). Esse plasmídeo é uma ferramenta para que a proteína E do vírus da encefalite japonesa (JEV) seja expressa no envelope viral do baculovírus. O gene VSVG já foi descrito na literatura como um veículo atraente para entrega de genes em células de mamíferos e um potencial vetor para o desenvolvimento de vacinas. O baculovírus recombinante foi utilizado, para infectar camundongos do tipo BALB/c. Análise de anticorpos neutralizantes, expressão de INF- γ (Interferon – gamma) e taxa de sobrevivência dos animais imunizados com o baculovírus recombinante BV-G-E foram feitas em comparação a animais imunizados com vacina de DNA codificando a mesma proteína. Os animais imunizados com o baculovírus recombinante BV-G-E

demonstraram maior nível de anticorpos neutralizantes específicos JEV, além de níveis mais altos de INF- γ . Desta forma, o autor destaca o baculovírus recombinante BV-G-E como estratégia alternativa para o desenvolvimento de novas vacinas contra a encefalite japonesa. Despres *et. al.* (1991), também utilizando o sistema baculoviral, expressaram os antígenos virais da Proteína E e NS1 sozinhas e fusionadas em células de inseto. Camundongos foram imunizados com lisados celulares infectados com os baculovírus recombinantes. Apesar de baixos, níveis significantes de anticorpos neutralizantes foram obtidos quando a proteína do envelope é expressa sozinha ou fusionada com a NS1.

No presente estudo, também foi utilizado o sistema procariótico para expressão da proteína NS1. Foi utilizado o sistema Gateway® de recombinação sítio específica. Para utilizar essa técnica, foi necessário clonar somente 1100 bp da proteína NS1 do vírus vacinal 17 DD que tem 1233 bp originalmente. Porém a redução do tamanho do gene e, conseqüentemente, da proteína, não afetou a correta expressão da proteína e também não afetou a obtenção do anti-soro policlonal anti-NS1 derivado da proteína recombinante expressa nesse sistema de expressão.

Apesar de neste trabalho, a proteína NS1 produzida em sistema procariótico utilizando *E. coli*, ter sido expressa e ter sido utilizada sem maiores problemas para a construção do anti-soro policlonal anti-NS1, alguns estudos vêm destacando a facilidade e superioridade do sistema de expressão eucariótico utilizando baculovírus para expressão de proteínas de flavivirus. Khromykh *et. al.* (1996) utilizaram ambos os sistemas, procariótico (*E.coli*) e eucariótico (baculovírus), para expressar 7 proteínas não - estruturais do flavivirus Kunjin (entre elas, a proteína NS1) fusionadas ou não com Glutathione-S-transferase (GST). Como resultado, alto nível de expressão de proteínas recombinantes foi alcançado em células *Spodoptera frugiperda* (Sf9) usando o

sistema de expressão baculovírus, em contraste com o baixo nível de expressão em *E. coli*.

Sabe-se que a proteína NS1 de flavivirus desempenha um importante papel durante a infecção viral e que este trabalho objetivou sua expressão em ambos os sistemas de expressão para utilização da proteína NS1 como insumos para diagnóstico rápido e fácil de pacientes infectados com febre amarela. Alguns estudos têm demonstrado que a proteína NS1 de flavivirus forma auto-anticorpos que reagem com proteínas da matriz extracelular e de plaquetas (Falconar, 1997). Foi observado também altos níveis de NS1 detectados no soro de pacientes infectados pelo DENV que foram correlacionados com doença grave (Libraty *et. al.*, 2002; Avirutnan *et. al.*, 2006).

Estudos mostraram que NS1 do vírus da dengue é abundante no soro de pacientes na fase precoce da infecção viral e que a aplicação de kits de captura de antígeno NS1 para demonstrar a presença do DENV pode fornecer uma melhor compreensão do tropismo viral em casos fatais e podem ser úteis para estudos de patogenia *in vivo* e em animais experimentais. Além disso, ELISAs de captura NS1, são rápidos, baratos e requerem menos experiência de laboratório do que técnicas moleculares e imuno-histoquímicas atualmente utilizadas para detectar DENV nos tecidos (Lima *et. al.*, 2011).

Testes para diagnóstico precoce da infecção por DENV baseados na detecção da proteína NS1 no plasma ou sangue total já vêm sendo comercializados, como exemplo o teste Dengue DX™ NS1 Antigen Rapid Test (FOCUS Diagnostics). Porém, ainda não foi desenvolvido nenhum teste capaz de diagnosticar a infecção precoce por febre amarela.

Uma combinação de fatores são associados com o ressurgimento da febre amarela nas regiões sul e sudeste do Brasil (epizootias e epidemias recentes): exposição

de uma população de humanos suscetível; alta densidade de vetores e hospedeiros primários (primatas não-humanos); condições favoráveis de clima; e circulação de pessoas e / ou macacos infectados. Há uma necessidade de um programa de vigilância eficaz para evitar o ressurgimento de febre amarela em outros estados brasileiros (Vasconcelos, 2010).

Portanto, faz-se necessário, experimentos que visem controlar o ressurgimento de focos de febre amarela. Esse trabalho é a etapa inicial para o estabelecimento de uma técnica de diagnóstico precoce de febre amarela, utilizando a proteína NS1 como insumo.

6. Conclusões e perspectivas

Este trabalho visou expressar a proteína NS1 de febre amarela em dois sistemas de expressão: procariótico e eucariótico. Além de estabelecer o melhor sistema para expressão dessa proteína, este trabalho tem como objetivo, utilizar a proteína NS1 como insumo para diagnóstico rápido de febre amarela.

Perspectivas:

- Obtenção de um método eficiente para produção e purificação de NS1 de YFV em sistema eucariótico

- Expressar a proteína NS1 de febre amarela em sistema procariótico e em sistema eucariótico de forma ocluída e co-ocluída (com mais um gene da poliedrina de AcMNPV intacto)
- Expressão de proteínas do vírus da febre amarela no envelope do baculovírus
- Comparação do perfil de dobramento das diferentes proteínas NS1 produzidas
- Avaliação da imunogenicidade e antigenicidade das diferentes proteínas em camundongos saudáveis
- Avaliação do reconhecimento da proteína NS1 presente em soro de pacientes infectados com febre amarela e em cultura de células infectadas com YFV

7. Referências Bibliográficas

AIRENNE, K. J.; MAKKONEN, K. E.; MAHONEN, A. J.; YLA-HERTTUALA, S. In vivo application and tracking of baculovirus. **Current Gene Therapy**, v 10, 2010.

ARIAS, C. F.; PREUGSCHAT, F.; STRAUSS, J. H. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. **Virology** v.193(2), p. 888-99, 1993.

AVIRUTNAN, P.; PUNYADEE, N.; NOISAKRAN, S.; KOMOLTRI, C.; THIEMMECA, S.; AUETHAVORNANAN, K.; JAIRUNGSR, A.; KANLAYA, R.; TANGTHAWORNCHAIKUL, N. Vascular leakage in severe Dengue virus infections: a potential role for the non-structural viral protein NS1 and complement. **J Infect Dis** v. 193, p. 1078–1088, 2006.

BARROS, M. C. E. S. Atividade de baculovirus selvagens em camundongos *in vivo* e *in vitro* e expressão da proteína do vírus da Febre Amarela (YFE) e da glicoproteína do vírus da Raiva (RVGP) em células de inseto. 2011. Tese Doutorado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, 2011.

BARNETT, E.D. Yellow Fever: epidemiology and prevention. **Clinical Infections Disease** v.44, p.850-856, 2007.

BRANDT, W. E.; CHIEWSLIP, D.; HARRIS, D. L.; RUSSELL, P. K. Partial purification and characterization of a dengue virus soluble complement-fixing antigen. **J Immunol** v. 105, p. 1565–1568, 1970.

BILIMORIA, S.L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: Kurstak E. (Ed.). **Viruses of invertebrates** New York: Marcel Dekker, p.1-72, 1991.

BISORDI, I.; ROCCO, I. M.; SUZUKI, A.; KATZ, G.; SILVEIRA, V. R.; MAEDA, A. Y.; SOUZA, R. P.; BASSI, M. G.; DEL TEDESCO, E. F.; FREITAS, E.; BESSA, T. A. F.; & DENGUE-NS1 GROUP. Evaluation of dengue NS1 antigen detection for

diagnosis in public health laboratories, São Paulo State, 2009. **Rev. Inst. Med. trop** v. 53 (6), 2011.

BOYCE, F. M; BUCHER, N. L. R. Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. **Genetics** v.93, p.2348-2352, 1996.

CAMPBELL, A. The future of bacteriophage biology. **Nature Reviews Genetics** v. 4, p. 471-477, 2003.

CASTRO, M. E. B. & SOUZA, M. L. Baculovirus: Agentes de Controle Biológico. In: OLIVEIRA-FILHO, E.C & MONNERAT, R.G. **Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas.** v.1, p.175-194, 2006.

CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L.; SIHLER, W.; RODRIGUES, J. L. C. M.; RIBEIRO, B. M. Biologia Molecular de baculovírus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.34, p.1733-1761, 1999.

CARDIFF, R. D.; LUND, J. K. Distribution of dengue-2 antigens by electron immunocytochemistry. **Infeci Jmmun** v. 3, p. 1699- 1709, 1976.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, MMWR, 2010.

Disponível em: <http://www.cdc.gov/yellowfever/>.

CHAMBERS, T. J.; DROLL, D.A.; TANG, Y.; LIANG, Y.; GANESH, V.K.; MURTHY, K.H.M.; NICKELLS, M. Yellow fever virus NS2B-NS3 protease: characterization of charged-to-alanine mutant and viruses and analysis of polyprotein-cleavage activities. **Journal of General Virology** v.86, p. 1403-1413, 2005.

CHAMBERS, T. J. GRAKOU, A.; RICE, C. M. Processing of the yellow fever virus nonstructural polyprotein: a catalytically active NS3 proteinase domain and NS2B are required for cleavages at dibasic sites. **J Virol** v. 65(11), p. 6042-50, 1991

CHAMBERS, T. J.; HAHN, C. S.; GALLER, R.; RICE, C. M. Flavivirus: genome organization, expression, and replication. **Annu Rev Microbiol** v.44, p.649-60, 1990

CHAMBERS, T. J.; MCCOURT, D. W.; RICE, C. M. Yellow fever virus proteins NS2A, NS2B, and NS4B: identification and partial N-terminal amino acid sequence analysis. **Virology** v. 169, p. 100–109, 1989.

CHAMBERS, T. J.; NESTOROWICZ, A, AMBERG, S. M; RICE, C. M. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication. **J Virol** v. 67(11), p. 6797-807, 1993.

CHANG, J. H.; CHOI, J. Y.; JIN, B. R.; ROH, J. Y.; OLSZEWSKI, J. A.; SEO, S. J.; O'REILLY, D. R.; JE, Y. H. An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin. **Journal of Invertebrate Pathology** v.84, p.30-37, 2003.

CHAUTHAIWALE, V. M.; THERWATH, A.; DESHPANDEI, V. V. Bacteriophage Lambda as a Cloning Vector. **Microbiological reviews** v. 56(4), p. 577-591, 1992.

CHAVES, T. S. S.; VASCONCELOS, M. J.; FILHO, N. O.; ALVES, J. R. Yellow Fever in a Brazilian Family Returning From Vacation in an Endemic Area: Relevant Clinical Features and Epidemiological Issues. **Journal of Travel Medicine** v. 16, p. 433-435 , 2009.

CHERNIN, L. R.; SWENDER, D.; HOSTOFFER, R. W. JR. Cracking the shell on egg-hypersensitive patients and egg-containing vaccines. **J Am Osteopath Assoc** v. 10 Suppl 6 pS. 5-6, 2011.

DESPRES, P. J.; DIETRICH, M. G.; BOULOY, M. Recombinant baculoviruses expressing yellow fever virus E and NS1 proteins elicit protective immunity in mice. **J. Gen. Virol** v. 72:2811, p. 2816, 1991.

ELENA, S. F.; WHITTAM, T. S.; WINKWORTH, C. L.; RILEY, M. A.; LENSKI, R. E. Genomic divergence of Escherichia coli strains: evidence for horizontal transfer and variation in mutation rates. **International microbiology** v. 8, p. 271-278, 2005.

FALCONAR, A. K. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesion proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. **Arch Virol** v. 142(5), p. 897–916, 1997.

FALGOUT, B.; BRAY, M.; SCHLESINGER, J. J.; LAI, C. J. Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus. **Annu Rev Entomol** v. 44, p. 257-89, 1990.

FALGOUT, B.; MILLER, R. H.; LAI, C. J. Deletion analysis of dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: identification of a domain required for NS2B-NS3 protease activity. **J Virol** v. 67(4), p. 2034-42, 1993.

FLAMAND, M.; MEGRET, F.; MATHIEU, M.; LEPAULT, J.; REY F. A.; DEUBEL, V. Dengue-1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. **J. Virol** v. 73, p. 6104-6110, 1999.

FRIERSON, J. G. The yellow fever vaccine: a history. **Yale j biol med** v. 82(2), P. 77-85, 2010.

FUNK, C. J.; BRAUNAGEL, S. C.; ROHRMANN, G. Baculovirus structure. **The Baculoviruses**. New York: Plenum Prest. 7-32, 1997.

GALLER, R.; PUGACHEV, K. V.; SANTOS, C. L. S.; OCHRAN, S. W.; JABOR, A. V.; RODRIGUES, S. G.; MARCHEVSKY, R. S.; FREIRE, M. S.; ALMEIDA, L. F. C.; CRUZ, A. C. R.; YAMAMURA, A. M. Y.; ROCCO, I. M.; ROSA, E. S. T.; SOUZA, L. T. M.; VASCONCELOS, P. F. C.; GUIRAKHOO, F.; MONATH, T. P. Phenotypic and molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil. **Virology** v.290, p.309-319, 2001.

GOULD, E. A.; BUCKLEY, A.; CAMMACK, N.; BARRETT, A. D. T.; CLEGG, J. C. S.; ISHAK, R.; VARMA, M. G. R. Examination of the immunological relationships between flaviviruses using yellow fever virus monoclonal antibodies. **Journal of General Virology** v. 66, p. 1369-1382, **1985**.

GRANADOS, R.R; LI, G.X; DERKSEN, A.C.G; McKENNA, K.A. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.64, p. 260-266, 1994.

GRODBERG, J. & DUNN, J. J. compT Encodes the Escherichia coli Outer Membrane Protease that Cleaves T7 RNA Polymerase During Purification. **J Bacteriol** v. 170, p. 1245-1253, 1988.

GRÖNER, A. Specificity and safety of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Eds.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC. v.1, p. 177-202 , 1986.

HARTLEY, J. L.; TEMPLE, G. F.; BRASCH, M. A. Cloning Using in vitro Site-Specific Recombination. **Genome Research** v. 10, p. 1788-1795, 2000.

HEINZ, F. X. & ALLISON, S. L. Flavivirus structure and membrane fusion. **Adv Virus Res** v.59, p.63–97, 2003.

HORTON, H.M. & BURAND, J.P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. **Journal of Virology** v.67, p.1860, 1993.

JACOBS, S. C.; STEPHENSON, J. R.; WILKINSON, G. W. G. Protection elicited by a replication-defective adenovirus vector expressing the tick-borne encephalitis virus non-structural glycoprotein NS1. **Journal of General Virology** v. 75, p. 2399±2402, 1994.

JAISWAL, S.; KHANNA, N.; SWAMINATHAN, S. High-level expression and one-step purification of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification** v. 33, p. 80-91, 2004.

JARVIS, D. L. Baculovirus expression vectors. **The baculoviroses**. New York: Plenum Press, 1997.

JE, Y. H.; JIN, B. R.; PARK, H. W.; ROH, J. Y.; CHANG, J. H.; SEO, S. J.; OLSZESKI, J. A.; O'REILLY, D. R.; & KANG S. K. Baculovirus Expression Vectors that Incorporated the Foreign Protein into Viral Occlusion Bodies. **Biotechniques** v. 34, p.81-87, 2003.

JEHLE, J. A.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B. C.; On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. **Archives of Virology** v. 151(7), p. 1257–1266, 2006.

JONES, C.T.; MA, L.; BURGNER, J.W.; GROESCH, T.D.; POST, C.B.; KUHN, R.J. Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. **Journal of Virology** v. 77(12), p.7143-7149,2003.

KALMAKOFF, J.; WARD, V.K. **Baculoviruses**. Dunedin: University of Otavo, 2003. Disponível em: <<http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/kalmakoff/baculo/baculo.html>>.

KAMIONKA, M. Engineering of Therapeutic Proteins Production in *Escherichia coli* **Current Pharmaceutical Biotechnology** v. 12, p. 268-274, 2011.

KHROMYKH, A. A.; HARVEY, T. J.; ABEDINIA, M.; WESTAWAY, E. G. Expression and purification of the seven nonstructural proteins of the flavivirus Kunjin in the E. coli and the baculovirus expression systems. **J Virol Methods** v. 61(1-2), p. 47-58, 1996.

KHROMYKH, A. A.; SEDLAK, P. L.; GUYATT, K. J.; HALL, R. A.; WESTAWAY, E. G. 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** v. 73, p. 10272–10280, 1999.

KING, L. A. & POSSEE, R. D. The Baculovirus Expression System. A Laboratory Guide, **Chapman & Hall**, London, 1992.

KOST, T. A.; CONDREAY, J. P. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. **Trends in Biotechnology** v. 20(4), p. 173-80, 2002.

KOST, T. A.; CONDREAY, J. P.; JARVIS, D. L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. **Nat.Biotechnol.** v.23(5), p.567-75, 2005.

KUZMINOV, A. Recombinational Repair of DNA Damage in *Escherichia coli* and Bacteriophage λ . **Microbiol Mol Biol Rev** v. 63(4), p. 751-813, 1999.

KYUNG, M. C. & DIAMOND, M.S. Defining the Levels of Secreted Non-Structural Protein NS1 After West Nile Virus Infection in Cell Culture and Mice. **J Med Virol** v.80(3), p.547-556, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** v.227, p.680-685, 1970.

LANDY, A. Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda Site-specific Recombination. **Ann Rev Biochem** v. 58, p. 913-949, 1989.

LEE, E.; STOCKS, C. E.; AMBERG, S. M.; RICE, C. M.; LOBIGS, M. Mutagenesis of the signal sequence of Yellow Fever virus prM protein: enhancement of signalase cleavage in vitro is lethal for virus production. **Journal of Virology** v. 74(1), p. 24-32, 2000.

LI, Y.; YE, J.; CAO, S.; XIAO, S.; ZHAO, Q.; LIU, X.; JIN, M.; CHEN, H. Immunization with pseudotype baculovirus expressing envelope protein of Japanese

encephalitis virus elicits protective immunity in mice. **J Gene Med** v.11(2), p.150-9, 2009.

LIBRATY, D. H.; ENDY, T. P.; HOUNG, H. S.; GREEN, S.; KALAYANARO, O. J. S.; SUNTAYAKORN, S.; CHANSIRIWONGS, W.; VAUGHN, D. W., NISALAK, A.; ENNIS, F.A.; ROTHMAN, A. L.; Differing Influences of Virus Burden and Immune Activation on Disease Severity in Secondary Dengue-3 Virus Infections. **The Journal of Infectious Diseases** v.185, p. 1213-21, 2002.

LIMA, M. R. Q.; NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G.; FILIPPIS, A. M. B.; LIMONTA, D.; SANTOS, F. B. A. New Approach to Dengue Fatal Cases Diagnosis: NS1 Antigen Capture in Tissues. **PLoS Negl Trop Dis** v. 3(5), 2011.

LINDENBACH, B. D. & RICE, C. M. trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. **J. Virol** v.71, p.9608–9617, 1997.

LINDENBACH, B. D; THIEL, H-J; RICE, C. M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: D. M. Knipe and P. M. Howley, Eds. **Fields Virology**, 5th Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p. 1101-1152, 2007.

LIU, L.; DONG, H.; CHEN, H.; ZHANG, J.; LING, H.; LI, Z.; SHI, P. Y.; LI, H. Flavivirus RNA cap methyltransferase: structure, function, and inhibition. **Front Biol** v. 5(4), p. 286-303, 2010.

LU, A. & MILLER, L. K. Regulation of baculoviruses late and very late expression. In: Miller, L.K. (Eds). **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, p.193-216, 1997.

LUPI, O. Mosquito-Borne Hemorrhagic Fevers. **Dermatologic Clinics** v 29(1), P. 33-38, 2011.

MACHADO, T. G. C. Expressão da proteína do envelope do vírus da Febre Amarela em células de inseto. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Ciências da Saúde. Patologia Molecular, Universidade de Brasília, 2007.

MACKENZIE, J. M.; JONES, M. K.; YOUNG, P. R. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. **Virology** v. 220, p. 232–240, 1996.

MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nat Med** v.10, 2004.

**MANUAL DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DA FEBRE AMARELA –
BRASÍLIA : MINISTÉRIO DA SAÚDE : FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE,
1999**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manu_feam.pdf.

MARUNIAK, J. E. Baculovirus structural proteins and protein synthesis. **The biology of baculovirus**. Boca Ranton : CRC Press, 1986.

MILLER, L. K.; TRIMARCHI, R. E; BROWNE, D.; PENNOCK, G. D. A temperature-sensitive mutant of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus defective in an early function required for further gene expression. **Virology** v.126(1), p. 376-80, 1983.

MONATH, T. P. Yellow fever: a medically neglected infectious disease. **Reviews of Infectious Diseases** v.9, p.165-175, 1987.

MONATH, T. P. Yellow fever: an update. **Lancet Infectious Diseases** v.1, p.11-20, 2001.

MONATH, T.P. Yellow fever. **Medicine** v.33 (7), p.21-23, 2005.

MONATH, T.; CETRON, M. S.; TEUWEN, D. E. Yellow fever vaccine. **In: Plotkin, S. A.; Orenstein, W. A.; Offit, P. A., eds. Vaccines. 5th ed.** Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, p.959–1055, 2008.

MONTOR, W. R. & SOGAYAR, M. C. Insetos como biofábricas de proteínas humanas. **Ciência hoje, Biotecnologia** v. 33 (196), p. 16-23, 2003.

MORENO, E. S.; BARATA, R. C. B. Municipalities of higher vulnerability to Sylvatic Yellow Fever occurrence in the São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo** v. 53, 2011.

MOSCARDI, F. The use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 84, p. 51-56, 1989.

MURRAY, P. R. **Microbiologia Médica**. 4ª ed. Elsevier, 2004.

MUYLAERT, I. R.; GALLER, R.; RICE, C. Genetic analysis of Yellow Fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. **J Virol** v. 71, p. 291-298, 1997.

NASCIMENTO, A. A. C.; ESPREAFICO, E. M.; LARSON, M. L. P.; MONESI, N.; ROSSI, N. M. M.; RODRIGUES, V. **Tecnologia do DNA recombinante** Rib Preto: FMRP/USP, 2003. Disponível em: [http:// Morpheus.fmrp.usp.br/td/aulas](http://Morpheus.fmrp.usp.br/td/aulas). Acesso em: 06/Fev/2012.

NEILSON, A. A.; MAYER, C. A. Yellow fever - prevention in travellers. **Aust Fam Physician** v. 39(8), p. 570-3, 2010.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual**. New York: W.H. Freeman and Company, 1992.

PAYNE, C. C. Insect pathogenic viruses as pest control agents. **Fortschritte der Zoologie** v. 32, p. 183-200, 1986.

POLAND, J. D.; CALISHER, C. H.; MONATH, T. P. Persistence of neutralizing antibody 30–35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. **Bull World Health Organ** v.59, p.895–900, 1981.

RAMOS, P. P. C.; CHAIB, A. J. M.; RIBEIRO, B.M. . Cloning and expression of a non-structural gene of the yellow fever virus in insect cells. In: XIII Encontro Nacional de Virologia, 2002, Águas de Lindóia. **Virus Reviews & Research** São Paulo : Sociedade Brasileira de Virologia, 2002. v. 07. p. 120-121.

RIBEIRO, B. M.; CROOK, N. E. Construction of occluded recombinant baculoviruses containing the full-length cry1Ab and cry1Ac genes from *Bacillus thuringiensis*. **Brazilian Journal Medical Biological Research** v. 31(6), p. 763-769, 1998.

RIBEIRO, B. M.; GENERINO, A. P. M.; ACÁCIO, C. N.; KALAPOTHAKIS, E.; BÁO, S. N. Characterization of a new *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) polyhedral mutant. **Virus Research** v. 140, p. 1-7, 2009.

RIBEIRO, B. M. Nova estratégia para expressão da glicoproteína do vírus da Raiva (GPV) em células de inseto. **Edital Projeto Universa** Processo nº473352/2006-0, 2007.

RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. **In: Fields, B. N.; Knipe, D. Howley, M. P. M., eds. Fields virology, 3 rd ed.** Philadelphia PA: Lippincott-Raven Publishers, v. 1, p. 931–960, 1996.

ROBERTSON, S. E. The immunological basis for immunization series: Yellow fever. **World Health Organization (Document WHO/EPI/GEN/93.18)** Geneva, 1993.

ROH, J. Y.; CHOI, J. Y.; KANG, J. N.; WANG, Y.; SHIM, H. J.; LIU, Q.; TAO, X.; XU, H. G.; HYUN, J. H.; WOO, S. D.; JIN, B. R.; HO JE, Y. Simple Purification of a Foreign Protein Using Polyhedrin Fusion in a Baculovirus Expression System. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** v. 74, p. 1522-1526, 2010.

ROHRMANN, G. F. Baculovirus Molecular Biology. Bethesda (MD): **National Library of Medicine (US)**, National Center for Biotechnology Information; 2008.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Mol Cell Biochem** v. 307(1-2), p.249-64, 2008.

SAMBROOK, J.; FRITSH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

SANTOS, N. S. O; ROMANOS, M. T. V; WIGG, M. D. Introdução á Virologia Humana. **Editora Guanabara-Koogan**, 2002.

SCHLESINGER, J. J.; MICHAEL, B. W.; PUTNAK, J. R.; WALSH, E. E. Cell surface expression of yellow fever virus non-structural glycoprotein NSI: consequences of interaction with antibody. **Journal of General Virology** v.71, p. 593-599, 1990.

SILVA, F. G.; SILVA, S. J. S.; ROCCO, I. M.; SILVEIRA, V. R.; AKEMI SUZUKI ; KATZ, G.; BISORDI, I. Avaliação de *kits* comerciais para detecção de antígenos NS1-dengue – São Paulo. **Bepa** v. 8(91), p. 14-26, 2011.

SRIVASTAVA, A.K.; PUTNAK, J.R.; WARREN, R.L.;HOKE, C.H.Jr. Mice Immunized with a dengue type 2 virus E and NS1 fusion protein made in Escherichia coli are protected against lethal dengue virus infection. **Vaccine** v.56, p, 179-189, 1995.

STADLER, K.; ALLISON, S.L.; SCHALICH, J. & HEINZ, F.X. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. **Journal of Virology** v.71, p. 8475–8481, 1997.

STIASNY, K; FRITZ, R; PANGERL, K; HEINZ, F.X. Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. **Amino Acids**, 2009.

STOHLMAN, S. A.; C. L. WISSEMAN, O. R.; D. J. SILVERMAN. Dengue virus induced modifications of host cell membranes. **J. Virol** v.16, p. 1017-1026, 1975.

STUDIER, F. W. & MOFFATT, B. A. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes. **J Mol Biol** v. 189, p. 113-130, 1986.

SUGRUE, R. J.; CUI, T.; XU, Q.; FU, J.; CHAN, Y. C. The production of recombinant dengue virus E protein using Escherichia coli and Pichia Pastoris. **Journal of Virological Methods** v. 69, p. 159-169, 1997.

TANI, H.; LIMN, C.K.; YAP, C.C.; ONISHI, M.; NOZAK, M.; NISHIMUNE, Y.; OKAHASHI, N.; KITAGAWA, Y.; WATANABE, R.; MOCHIZUKI, R.; MORIISHI, K.; MATSUURA, Y. In Vitro and In Vivo Gene Delivery by Recombinant Baculoviruses. **Journal of Virology** v. 77(18), p. 9799-9808,2003.

TAUIL, P. L. Critical aspects of yellow fever control in Brazil. **Rev. Saúde Pública** v. 44, 2010 .

THEILMANN, D.A.; BLISSARD, G.W.; BONNING, B.; JEHLE, J.; O'REILLY, D.R.; ROHRMANN, G.F.; THIEM, S.; VLAK, J.M. Family Baculoviridae. In: FAUQUET CM; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (Ed.). Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Amsterdam: Elsevier Academic Press, p.177-186. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses, 2005.

VASCONCELOS, P. F. C. Febre amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.36(2), p 275-293, 2003.

VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. **Rev. Saúde Pública** v. 44, p. 1144–1149, 2010.

VICTOR, M. E.; BENGTSSON, A.; ANDERSEN, G.; BENGTSSON, D.; LUSINGU, J. P.; LASSE VESTERGAARD, L. S.; ARNOT, D. E.; THEANDER, T. G.; JOERGENSEN, L.; JENSEN, A. T. R. Insect cells are superior to *Escherichia coli* in

producing malaria proteins inducing IgG targeting PfEMP1 on infected erythrocytes. **Malar J** v.9, p.325, 2010.

VOLK, D. E.; MAY, F. J.; GANDHAM, S. H.; ANDERSON, A.; VON LINDERN, J. J.; BEASLEY, D. W.; BARRETT, A. D.; GORENSTEIN, D. G. Structure of yellow fever virus envelope protein domain III. **Virology** v. 394(1), p. 12–8, 2009.

VOLKMAN, L.E & HOM, G. *Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus* chiA is required for processing of V-CATH. **Virology** v. 277, p.178-183, 2000.

WU, J.; BERA, A.K.; KUHN, R.J.; SMITH, J.L. Structure of the Flavivirus helicase: implications for catalytic activity, protein interactions, and proteolytic processing. **Journal of Virology** v. 79(16), p.10268-10277, 2005.

YOUN S.; CHO H.; FREMONT D. H.; DIAMOND M. S. A short N-terminal peptide motif on flavivirus nonstructural protein NS1 modulates cellular targeting and immune recognition. **Journal of Virology**, v 84, p 9516-32, 2010.

ZHANG, Y-M.; HAYES, E.P.; McCARTY, T.C.; DUBOIS, D.R.; SUMMERS, P.L.; ECKELS, K.H.; CHANOCK, R.M.; LAI, C-J. Immunization of mice with dengue structural proteins and nonstructural protein NS1 expressed by baculovirus recombinant induces resistance to dengue virus encephalitis. **Journal of Virology** v.62(8), p. 3027-3031, 1988.