



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**Expressão da proteína do envelope do vírus da febre
amarela fusionada com a proteína poliedrina do
baculovírus AgMNPV em células de inseto**

Bruna Carolina C. Batista

Brasília
Julho/2010



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**Expressão da proteína do envelope do vírus da febre
amarela fusionada com a proteína poliedrina do
Baculovírus AgMNPV em células de inseto**

Bruna Carolina C. Batista

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

Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Co-orientadora: Dr. Tatsuya Nagata

Brasília

Julho/2010

Dedico este trabalho a minha mãe, Iara, minha amiga e heroína. Por todas as vezes que me segurou no colo, secou as minhas lágrimas e acreditou que eu era capaz mesmo quando vacilava. Ao meu grande pai, Márcio, pelo exemplo de força e perseverança, pela coragem que me ensinou a ter diante dos grandes obstáculos.

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos...

Á Deus, que sempre esteve no meu lado, iluminando todos os meus caminhos e permitindo que tudo que sempre desejei acontecesse.

Aos meus pais e irmão, Marcello, por sempre me incentivar e estar presente em todos os momentos com amor e carinho.

Ao meu namorado e amigo, Israel, pelo amor, carinho, paciência, ombro amigo, por todas as palavras de conforto e ânimo ao longo dessa jornada.

Ao professor Dr. Bergmann, obrigado pela oportunidade de realizar mais este sonho e pela maravilhosa orientação.

Ao professor Dr. Tatsuya Nagata pela grande co-orientação. Por todas as vezes que me auxiliou e pelos ensinamentos ao longo do caminho.

A minha grande amiga professora Dr. Gláucia Lima. Muito obrigada por todos os momentos de amizade e paciência. Pelo exemplo de que com força, coragem e muito trabalho tudo é possível.

Aos meus maravilhosos e ultrachiques amigos, Breno e Yara. Obrigada por estarem presentes em toda a minha jornada de UnB. Pelas risadas, choros, festas, provas...Enfim, vocês são **DEMAIS!**

As minhas super amigas Anabele e Aline. Por todas as conversas, reuniões, festinhas e banquetes. Pela confiança e amizade conquistada nesses dois anos de convivência. Que dure para toda a nossa vida!

Ao queridíssimo amigo Roberto... Companheiro de chocolate! Pela paciência, conselhos e ajudas ao longo desse trabalho. Obrigada pelas risadas e pelas quintas de barzinho que ajudaram a acalmar os ânimos desse mestrado!

A minha sensacional amiga Kelly. Por todos os momentos em que pacientemente estendeu a mão e me ajudou com a finalização desse trabalho. Obrigada por todo carinho e AJUDA, ou melhor, PELA GRANDE AJUDA!

Ao grande Felipe, por toda a colaboração na reta final... Aos últimos minutos do segundo tempo, nos conhecemos e sem a sua presença seria impossível terminar essa caminhada. Muito Obrigado!

Aos meus colegas baculoviristas... Pelas risadas, ajudas, festas...Por tornarem o ambiente de trabalho um lugar tão acolhedor...

Ao CNPq e a UnB pelo apoio financeiro e a possibilidade de tornar este sonho possível.

A todos que de alguma forma me ajudaram e que sempre torceram pela minha vitória!

Confia no Senhor e faze o bem, e sobre a terra habitarás em segurança. Coloca no Senhor tua alegria, e Ele dará o que pedir teu coração.

Deixa aos cuidados do Senhor o teu destino: confia Nele, e com certeza Ele agirá. Fará brilhar tua inocência como a luz, o teu direito, como o sol do meio-dia.

Afasta-se do mal e faze o bem, e terás tua morada para sempre. Porque o Senhor Deus ama a justiça, e jamais Ele abandona os seus amigos.

A salvação dos piedosos vem de Deus; Ele os protege nos momentos de aflição. O Senhor lhes dá ajuda e os liberta, defende-os e protege-os contra os ímpios, e os guarda porque Nele confiaram.”

Resumo

O vírus causador da febre amarela (YFV) é um membro da família Flaviviridae e importante arbovírus patogênico ao homem. O diagnóstico da febre amarela é importante tanto para medidas de saúde pública como também para o tratamento adequado dos pacientes, já que os sintomas iniciais são típicos de outras doenças virais infecciosas. A glicoproteína do envelope (E) desse vírus é a maior determinante da imunogenicidade viral e da resposta imunológica do hospedeiro. Neste trabalho, a proteína do envelope do vírus da febre amarela foi expressa fusionada com a proteína poliedrina (POLH) dos corpos de oclusão do baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) em células de inseto pela infecção com um baculovírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) recombinante. Primeiramente, foi construído um vetor baculoviral modificado para expressão de proteínas heterólogas fusionadas à POLH, o pFastAgPol. O fragmento de DNA contendo o gene da poliedrina (*polh*) do AgMNPV foi amplificado e, em seguida, transferido para o plasmídeo comercial pFASTBac1™ (Invitrogen). Utilizando o sistema Bac-to-Bac (Invitrogen), o AcMNPV recombinante contendo o gene *polh* de AgMNPV foi construído (vAcPolAg). Células de inseto foram infectadas pelo vAcPolAg, e a expressão da proteína recombinante analisada por microscopia de luz, SDS-PAGE e Western blot. A proteína foi detectada por Western-blot, mas não houve a formação de corpos de oclusão. Um fragmento de DNA contendo o gene do envelope do YFV foi clonado no vetor de transferência pFastAgPol, em fase com o gene *polh*, para ser expresso como uma proteína de fusão e inserido no genoma do AcMNPV. Células de inseto também foram infectadas com o AcMNPV recombinante (vAcPolAgEnv) e a expressão da proteína recombinante foi analisada por SDS-PAGE e Western blot, que detectou um polipeptídeo de aproximadamente 88 kDa, correspondente à fusão da proteína E do vírus amarelo com a POLH de AgMNPV.

Entretanto, também não ocorreu a formação de corpos de oclusão. As células infectadas com os dois recombinantes também foram analisadas por microscopia de luz, de transmissão e pelo microscópio confocal. A não formação de corpos de oclusão pode ter sido causada, no caso do vAcPolAg, pela substituição do sítio de terminação do gene *polh* por um sítio de clonagem para a fusão do gene E, o que resultou na introdução de 41 amino ácidos no C-terminal da POLH. No caso do vírus contendo a proteína de fusão, POLHENV, a própria fusão pode ter resultado na formação de uma proteína incapaz de formar corpos de oclusão pelas mudanças conformacionais. A construção dos vírus recombinantes, vAcPolAg e vAcPolAgEnv, e a expressão das proteínas fusionadas foram bem sucedidas demonstrando o potencial do sistema bacuoviral para o desenvolvimento de técnicas alternativas de diagnóstico e produção de vacinas utilizando partes virais.

Palavras-chave: vírus da febre amarela; proteína do envelope; baculovírus; poliedrina e fusão.

Abstract

The yellow fever virus (YFV), a member of the family Flaviviridae, is an important arbovirus pathogenic to humans. The yellow fever diagnosis is important not only to public health measures but also to patients proper treatment, once the initial symptoms are similar to other viral infectious diseases. The envelope glycoprotein (E) of this virus is the major immunogenicity and host immune response determinant. In this work, the yellow fever virus envelope protein was expressed fused to the protein polyhedrin (POLH) of the baculovirus *Anticarsia gemmatilis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) occluded bodies in insect cells by the infection of a baculovirus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) recombinant. First, was constructed a modified baculoviral vector (pFastAgPol) for heterologous protein expression fused to POLH. The DNA fragment containing the AgMNPV polyhedrin gene (*polh*) was amplified and then transferred to a commercial plasmid pFASTBac1™ (Invitrogen). Using the Bac-to-Bac system (Invitrogen), the AcMNPV recombinant containing the AgMNPV *polh* gene was constructed (vAcPolAg). Insect cells were infected with vAcPolAg and the protein expressed was analyzed by light microscopy, SDS-PAGE and Western blot. The protein was detected by Western-blot but was not capable of forming occluded bodies. A DNA fragment containing the envelope gene of YFV was cloned into the transfer vector pFastAgPol, in frame with the *polh* gene, in order to be expressed as a protein fusion, and inserted into the AcMNPV genome. Insect cells were also infected with the AcMNPV recombinant (vAcPolAgEnv) and recombinant protein expression was analyzed by SDS-PAGE and Western-blot which detected a polypeptide around 88kDa, corresponding to the fusion of the yellow fever virus protein E with the AgMNPV POLH. However, there were no formation of occlusion bodies either. Infected cells with the two recombinants also were analyzed by light, electron and confocal

microscopy. The lack of occlusion body formation, in the case of vAcPolAg, could have been due to the substitution of the stop codon of the *polh* gene by a restriction site for the fusion with the E gene which resulted in the introduction of 41 amino acids to the C-terminal end of POLH. In the case of virus containing the fusion protein POLHF, the fusion itself could be responsible for the formation of a protein incapable of forming occlusion bodies due to conformational changes. The construction of recombinant viruses, vAcPolAg vAcPolAgEnv, and expression of fused proteins were successful, demonstrating the potential of the baculoviral system for the development of alternative techniques of diagnosis and production of viral vaccines using parts of it.

Keywords: Yellow fever virus, envelope protein, baculovirus, polyhedron and fusion.

Índice de figuras

Figura 1 – Áreas sob risco de febre amarela e países que reportaram epidemias.	21
Figura 2 – Imagens dos mosquitos transmissores da febre amarela.....	23
Figura 3 – Esquema mostrando os ciclos selvagem e urbano de transmissão da febre amarela	23
Figura 4 – Partícula viral.....	32
Figura 5 – Estrutura genômica do vírus da febre amarela.....	34
Figura 6 – Esquema do ciclo de replicação de Flavivírus.....	39
Figura 7 – Estrutura do ectodomínio da proteína E nas conformações pré e pós-fusão.....	42
Figura 8 – Conformações da proteína do envelope nos vírions imaturos e maduros e esquema do processo de fusão.....	44
Figura 9 – Micrografia eletrônica de transmissão e representação dos fenótipos BV (vírus extracelulares) e ODV (vírus derivados da oclusão).....	49
Figura 10 – Processo inicial de infecção viral no intestino médio de uma lagarta infectada por baculovírus.	50
Figura 11 – Ciclo de replicação dos baculovírus.....	51
Figura 12 – Esquema das construções virais. Construção Vírus vAcPolAg.....	58
Figura 13 – Esquema das construções virais. Construção Vírus vAcPolAgEnv	59
Figura 14 – Mapa do plasmídeo pGEM®-T Easy (Promega).....	64
Figura 15 – Mapa do vetor pFastBac™1 e Esquema mostrando a sequência e sítios de restrição presentes no sítio de multiclonagem.....	65
Figura 16 – Esquema mostrando o mapa do plasmídeo PSynYFE, o gene env, o gene da poliedrina e os promotores pXIV e pSyn.	69
Figura 17 - Seqüenciamento da região do gene <i>polh</i> do vírus AgMNPV amplificado	75
Figura 18 – Amplificação do gene <i>polh</i> do baculovírus AgMNPV.....	76

Figura 19 – Clonagem do gene <i>polh</i> no vetor PGEMT [®] - Easy.....	77
Figura 20 – Digestão do plasmídeo pGEMAgPol com as enzimas <i>Bgl</i> III e <i>Bam</i> HI e eluição do inserto referente ao gene <i>polh</i>	78
Figura 21 – Clonagem do gene <i>polh</i> no vetor de transferência pFASTBacBac TM 1 (Invitrogen)	80
Figura 22 – Confirmação da clonagem do gene <i>polh</i> no plasmídeo pFASTBacBac TM 1	81
Figura 23 – Clonagem do gene <i>polh</i> no plasmídeo pFastBac TM 1 e confirmação da transposição do gene de interesse para o DNA do bacmídeo.....	82
Figura 24 – Efeito citopático da infecção de células BTI-TN5B1-4 com diferentes baculovírus a 72h p.i.....	83
Figura 25 – Confirmação da presença do gene <i>polh</i> no DNA do vAcPolAg.....	84
Figura 26 – Análise da expressão da proteína recombinante POLH em células de inseto infectadas com o baculovírus recombinante	86
Figura 27 – Imunomarcção dos extratos celulares de BTI-TN5B1-4 infectados com o vírus vAcPolAg.....	87
Figura 28 – Obtenção do fragmento de DNA contendo o gene <i>env</i> da febre amarela.....	88
Figura 29 – Clonagem do gene <i>env</i> no vetor de transferência pFastAgPol	89
Figura 30 – Confirmação da clonagem do gene <i>env</i> no plasmídeo pFastAgPol.....	90
Figura 31 – Clonagem do gene <i>env</i> no plasmídeo pFastAgPol e confirmação da transposição do gene de interesse para o DNA do bacmídeo.....	91
Figura 32 – Análise estrutural da infecção de células de inseto por diferentes vírus recombinantes a 72h p.i.	92
Figura 33 – Confirmação da presença do gene <i>env</i> no DNA viral.....	93
Figura 34 – Análise da expressão da proteína recombinante PolhEnv em células de inseto infectadas com o baculovírus recombinante	95

Figura 35 – Imunomarcação por microscopia de fluorescência de células de inseto BTI-TN5B1-4 infectadas por diferentes vírus recombinantes às 72h p.i	96/97
Figura 36 – Micrografias eletrônicas de transmissão em células.	99/100

Índice de tabelas

Tabela 1 – Lista de oligonucleotídeos utilizado no trabalho.....	62
--	----

Abreviaturas e símbolos

Amp	ampicilina
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
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
NBT	<i>Nitro blue tetrazolium chloride</i>
η g	nano grama

pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
pfu	unidade formadora de placa
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- β -D-galactopiranosídeo
μ g	micrograma
μ L	microlítro
μ M	micromolar (micromol por litro)
$^{\circ}$ C	grau Celsius

Sumário

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Febre amarela e epidemiologia	20
1.1.1 Manifestações clínicas	24
1.1.2 Diagnóstico e prevenção.....	26
1.1.3 Vírus amarílico	31
1.1.4 Proteína E	40
1.2 Baculovírus	45
1.2.1 Classificação	46
1.2.2 Vírion.....	47
1.2.3 Modo de infecção <i>in vivo</i>	49
1.2.4 Modo de infecção <i>in vitro</i> e regulação gênica	52
1.2.5 Baculovírus como vetores de expressão (BEV)	53
2 OBJETIVOS	57
2.1 Estratégias	57
3 MATERIAIS E MÉTODOS	60
3.1 Vírus e células	60
3.2 Obtenção do gene <i>polh</i> do baculovírus AgMNPV	60
3.3 Clonagem do fragmento de DNA contendo o gene <i>polh</i> no plasmídeo pGEM[®]-T Easy (promega)	63
3.4 Construção do vetor pFastAgPoL	64
3.5 Construção, por transposição, e isolamento do baculovírus recombinante contendo o gene <i>polh</i>	66

3.6	Análise da expressão proteína poliedrina (POLH) ao longo da infecção por baculovírus recombinantes em células de inseto por SDS-PAGE e imunodeteccção.....	67
3.7	Obtenção do gene da proteína do envelope (env) do vírus da febre amarela	69
3.8	Clonagem do gene <i>env</i> no vetor pFastAgPol	70
3.9	Construção, por transposição, e isolamento de um baculovírus recombinante contendo o gene <i>polh</i> fusionado com o gene <i>env</i>	71
3.10	Análise da expressão da proteína fusionada (PolEnv) ao longo da infecção por baculovírus recombinantes em células de inseto por SDS-PAGE e imunodeteccção.....	71
3.11	Análise da expressão da proteína fusionada (PolEnv) ao longo da infecção por baculovírus recombinantes em células de inseto por microscopia de fluorescência confocal (imunodeteccção).....	72
3.12	Análise ultraestrutural de células de inseto infectadas pelos vírus recombinantes: vAcPolAg e vAcPolAgEnv	73
4	RESULTADOS.....	74
4.1	Obtenção do gene da <i>polh</i> do vírus AgMNPV.....	74
4.2	Clonagem do gene <i>polh</i> no plasmídeo pGEM-T [®] Easy (Promega).....	74
4.3	Obtenção do vetor de transferência pFASTAgPol.....	79
4.4	Construção e isolamento do baculovírus recombinante vAcPolAg	81
4.5	Análise da expressão da proteína poliedrina (POLH) ao longo da infecção de baculovírus recombinantes em células de inseto por SDS-PAGE e imunodeteccção.....	85
4.6	Obtenção do gene <i>env</i> do vírus da febre amarela	88
4.7	Clonagem do gene <i>env</i> no vetor pFastAgPol	89
4.8	Construção, por transposição, e isolamento de um baculovírus recombinante contendo o gene <i>polh</i> fusionado com o gene <i>env</i>	90

4.9	Análise da expressão da proteína fusionada (PolEnv) ao longo da infecção de baculovírus recombinantes em células de inseto por SDS-PAGE e imunodeteccção.....	94
4.10	Análise ultraestrutural de células de inseto infectadas por diferentes baculovírus..	98
5	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	101
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110

1. INTRODUÇÃO

1.1. Febre amarela e epidemiologia.

A febre amarela é uma doença viral infecciosa não contagiosa, endêmica e epidêmica, de regiões tropicais da África e da América 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).

Arbovírus é o termo utilizado para designar vírus transmitidos pela picada do vetor artrópode (do inglês: *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* (figura 2). Na África, o vírus também foi isolado a partir do carrapato *Amblyoma variegatum*, indicando um possível papel desses insetos na transmissão da virose (Vasconcelos, 2003)

As primeiras referências sobre a febre amarela são encontradas em manuscritos Maias. Entretanto, análises de sequências genômicas demonstram que a febre amarela e outras arboviroses datam de mais de 3000 anos. Tem provável origem na África e foi trazida para o Novo Mundo durante o tráfico de escravos (Monath, 2001).

O vírus nunca foi relatado na Ásia, porém o mosquito vetor *Aedes aegypti* é encontrado neste continente. As estirpes de *Ae. aegypti* asiáticas podem transmitir a febre amarela, mas demonstram uma menor capacidade de transmissão que as estirpes americanas. Em adição, a imunidade cruzada adquirida depois de infecções por dengue ou outros flavivírus pode ter contribuído para a ausência da doença nesse continente. (Barret and Higgs, 2007)

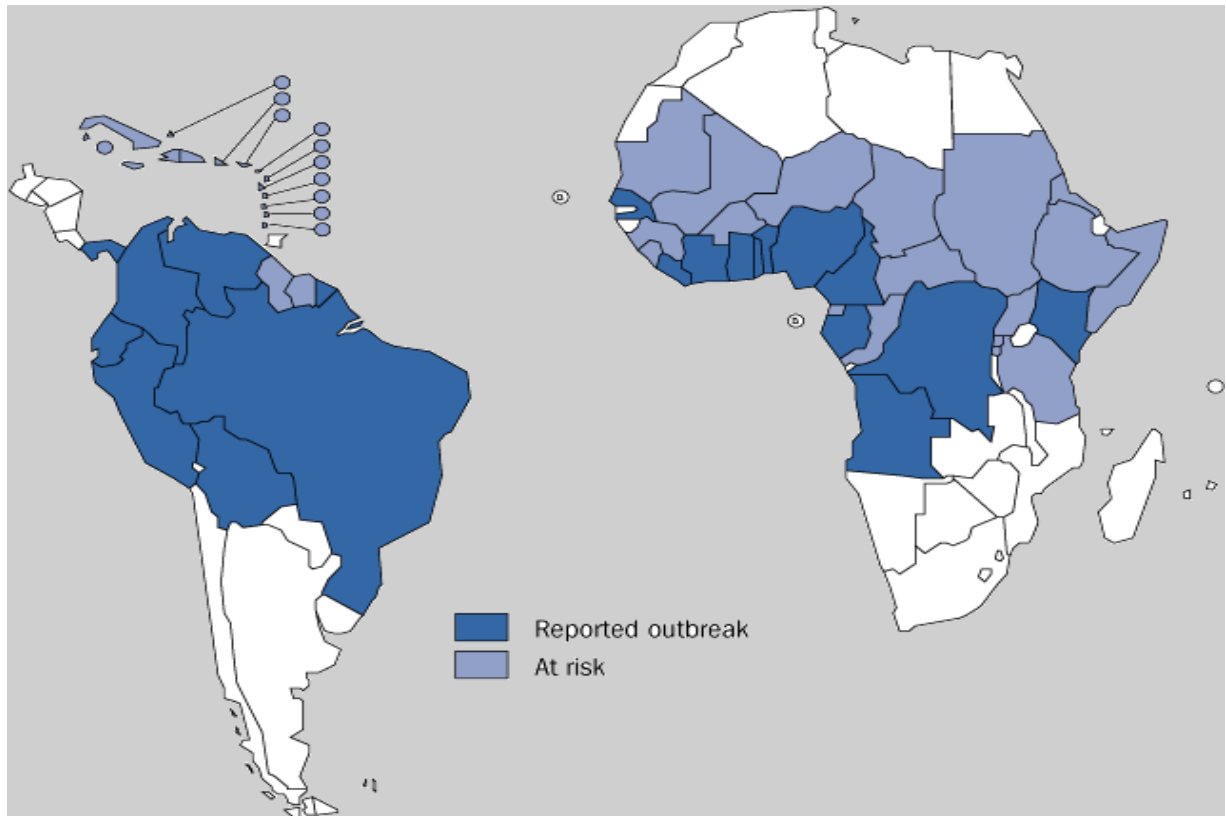


Figura 1. Áreas sob risco de febre amarela e países que reportaram epidemias. Adaptado da WHO. http://www.who.int/csr/resources/publications/yellowfev/CSR_ISR_2000_1/en/

Cerca de 10% dos casos da doença ocorrem na América do Sul tropical (Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Peru e Venezuela) e 90% na África (figura 1). Mais de 200.000 casos são relatados anualmente, sendo que aproximadamente 30.000 são fatais (Volk *et al.*, 2009)

No Brasil, entre 2003 e 2007, foram notificados 80 casos confirmados de febre amarela, sendo que 36 foram fatais (http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/fa_03.htm). Em fevereiro de 2008 o país teve uma eclosão da doença sendo reportados pelo Ministério da Saúde 48 casos, incluindo 13 mortes. Um aumento no número de eventos epizoóticos foi observado entre dezembro de 2007 e janeiro de 2008 atingindo mais de 23 novos municípios nesse período (http://www.who.int/csr/don/2008_02_07/en/index.html).

Existem duas formas de transmissão da doença na natureza: urbana e silvestre (figura 3). São divisões epidemiológicas, no entanto, idênticas em termos imunológicos e patogênicos. O que distingue essas duas formas são os ciclos na natureza, com reservatórios e vetores distintos. Apesar de diversas espécies de vertebrados serem suscetíveis à infecção e usados em estudos laboratoriais, apenas primatas demonstram estarem envolvidos no ciclo de transmissão (Barret and Higgs, 2007).

No ciclo urbano simples (homem-mosquito), o mosquito *Ae. aegypti* é responsável pela transmissão direta da doença ao homem, pois não existe um hospedeiro amplificador. O próprio homem infectado, na fase de viremia (período no qual o vírus pode ser isolado do sangue circulante), atua como amplificador e disseminador do vírus na população. O ciclo silvestre é mais complexo, pouco compreendido e varia de acordo com a região em que se encontra. Na maioria das vezes, o macaco atua como vetor de amplificação e o homem como o hospedeiro final (Vasconcelos, 2003).

Mosquitos do gênero *Aedes* são os principais responsáveis pela transmissão na África, enquanto na América, o gênero *Haemagogus* se destaca. Existe um vetor de ligação entre os ciclos urbanos e silvestres, na África Oriental, o *Ae. simpsoni*. Esta espécie sai da mata indo picar os indivíduos na periferia das cidades, podendo, assim, manter a transmissão urbana contínua. Nas Américas, o principal transmissor da forma silvestre é o *Haemagogus janthinomys* (Vasconcelos, 2003).

A



B



Figura 2. Imagens dos mosquitos transmissores da febre amarela. A) Foto de um mosquito *Ae. aegypti*. http://www.rc.unesp.br/ib/zoologia/aedes_aegypti.jpg B) Foto de um mosquito *Haemagogus janthinomys*. http://www.fiocruz.br/ccs/media/ioc_amarela2.jpg

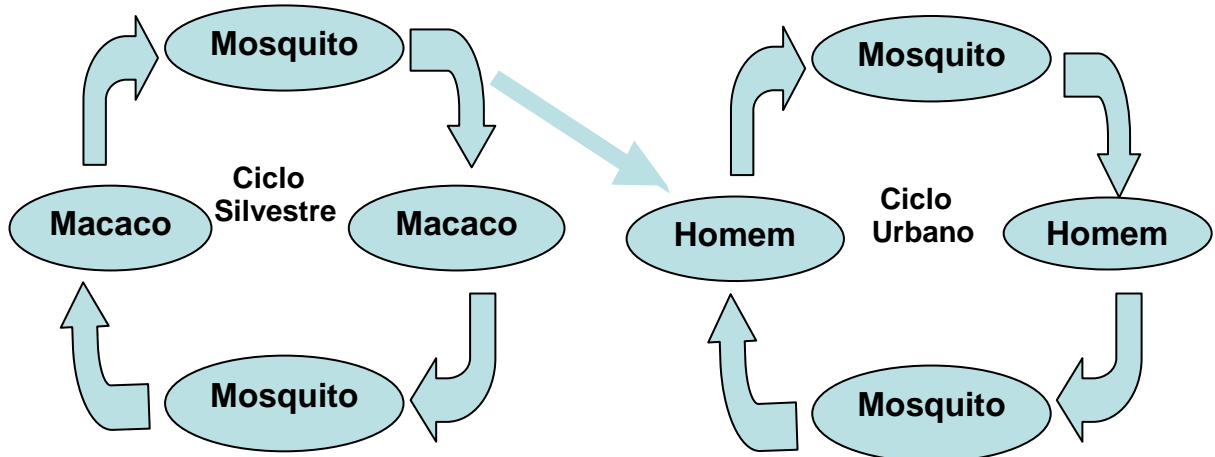


Figura 3. Esquema mostrando os ciclos selvagem e urbano de transmissão da febre amarela.

1.1.1. Manifestações clínicas

A febre amarela é a original febre hemorrágica viral caracterizada por viremia, febre, prostração, lesões renais, hepáticas e no miocárdio, hemorragia, choque e alta letalidade (Monath, 2005).

Após a penetração do vírus no corpo humano, via picada do mosquito transmissor, ele rapidamente atinge os linfonodos regionais e desaparece da circulação sanguínea nas 24 horas seguintes (Vasconcelos, 2003). Nos nódulos linfáticos inicia-se a replicação viral. Depois da liberação dos vírions através da corrente sanguínea, outros órgãos são infectados: fígado, rins, medula óssea, sistema nervoso central, coração, pâncreas, baço e gânglios linfáticos (Santos *et al.*,2002).

O período de incubação dura de 3 a 6 dias e é sucedido por um quadro clínico bifásico, sendo observado um período intermediário, a fase de remissão, entre as duas fases. Na primeira fase os sintomas aparecem de forma súbita, como febre alta, mal-estar, cefaleia, dores musculares, cansaço e calafrios, podendo também apresentar diarreia e vômito (Santos *et al.*,2002). O período de remissão é caracterizado pelo desaparecimento da febre e dos sintomas por pelo menos 24h. Nesse período, o vírus é neutralizado pelos anticorpos e pela resposta imune celular (Monath, 2001). Uma vez que o vírus não é mais encontrado na corrente sanguínea, o paciente não é mais fonte de infecção para outros mosquitos (Monath, 2005).

Após quatro dias, a maioria dos pacientes possui recuperação total, sendo a segunda fase dos sintomas leve e rápida. No entanto, depois do período de remissão, alguns casos podem evoluir para a forma grave da doença. Nestes casos, a segunda fase inicia-se abruptamente com febre alta e cefaleia intensa. As dores musculares generalizam-se com o

aumento das náuseas e vômitos; as funções hepáticas e renais são comprometidas. Pode-se ter o óbito ou uma recuperação total sem sequelas (Vasconcelos, 2003).

O período de viremia consiste na etapa de disseminação do vírus pela corrente sanguínea e pode ser de dois a cinco dias dependendo da apresentação clínica. E, somente neste período, que os diagnósticos virológicos são capazes de detectar a infecção (Santos *et al.*, 2002).

Infecções anteriores por outros flavivírus 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).

A resposta imunológica é bastante rápida e específica. A resposta humoral foi caracterizada e anticorpos IgM são descritos por ELISA principalmente nas duas primeiras semanas. Não existem dados que relata um segundo caso de infecção por febre amarela. Os anticorpos neutralizantes são os principais mediadores da proteção contra a doença em casos de uma nova exposição ao vírus (Monath, 2001).

A resposta inata do sistema imunológico é essencial para a detecção inicial de uma infecção viral e subsequente ativação da imunidade adaptativa. A resposta imune antiviral *in vivo* é mediada tanto por células dendríticas, macrófagos, células T, células B, como também por outros tipos celulares como as células NK (“natural killers”) (Takeuchi, O. & Akira, S., 2009).

Com a infecção viral, o reconhecimento de alguns componentes virais como ssRNA, dsRNA e proteínas virais por receptores de reconhecimento-padrão (PBRs) ativa a resposta imune inata. Os PBRs são divididos em três classes: os receptores toll-like (TLRs) e receptores RIG-I-like (RLRs), que são importantes para a produção de interferons do tipo I

(IFNs) e citocinas, e os receptores NOD-like (NLRs) que regulam a maturação das interleucinas-1 β (Takeuchi, O. & Akira, S., 2009).

Nas células do sistema imune, a detecção de componentes virais pelos RLPs e TLRs inicia cascatas de sinais intracelulares levando a secreção de interferons do tipo I (IFNs), citocinas, quimiocinas e também aumentam a secreção moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 e CD86(Takeuchi, O. & Akira, S., 2009).

Os IFNs ativam vias intracelulares pela ligação com receptores específicos e regulam a expressão de diversos genes. Esses genes estão associados com o processo de eliminação dos componentes virais de células infectadas, com a indução da apoptose e conferem resistência a infecção viral em células não infectadas. Também são produzidos por células dendríticas e macrófagos. As citocinas pró-inflamatórias e as quimiocinas ajudam no processo de eliminação de componentes virais promovendo a inflamação e recrutando células inatas e adaptativas. Os fatores de co-estimulação são essenciais para a ativação de células T e conseqüente obtenção da resposta imunológica (Takeuchi, O. & Akira, S., 2009).

1.1.2. Diagnóstico e prevenção.

O diagnóstico da febre amarela é importante tanto para medidas de saúde pública como também para o tratamento adequado dos pacientes, já que os sintomas iniciais são típicos de outras doenças virais infecciosas. O diagnóstico laboratorial pode ser realizado de três maneiras: isolamento e identificação viral; pesquisa de anticorpos e detecção de ácidos nucleicos virais.

Para o isolamento e identificação viral, deve-se recolher o sangue ou o soro do paciente coletado até o quarto dia do início da manifestação dos sintomas. Após o quinto dia, os anticorpos neutralizantes promovem uma eliminação do agente viral da circulação. O

fígado, órgão no qual se encontra a maior quantidade de vírus, não é recomendado ser utilizado para biópsia, uma vez que a doença causa hemorragias frequentes (Santos *et al.*2002). Faz-se o isolamento viral em diferentes sistemas: cultura de células animais (células Vero, BHK-21, SW13 e AP61) e de mosquito (células C6/36 de *Ae. albopictus*) (Monath, 2001; Vasconcelos, 2003; Vera, 2004), intratoracicamente em mosquitos ou em cérebros de camundongos recém-nascidos. Evidências da replicação viral são observadas em torno do 5° ao 7° dias de cultura após a inoculação viral. São observados efeitos citopáticos na cultura celular, principalmente a formação de sincício (as células infectadas sofrem uma fusão de suas membranas plasmáticas, originando células gigantes e multinucleadas), efeito característico de infecções pelo grupo dos flavivírus. Para identificação do vírus, são utilizados testes sorológicos como teste de neutralização, fixação do complemento, imunofluorescência indireta e ensaio enzimático (Vasconcelos, 2003).

O teste de neutralização baseia-se no fundamento de que um vírus infeccioso ao interagir com o anticorpo específico é neutralizado, perdendo sua capacidade de infectar outras células. Este teste pode ser usado tanto para a identificação de vírus desconhecidos quanto para avaliar o nível de anticorpos. No caso da febre amarela, precisa-se confirmar a presença do vírus específico. Uma suspensão do vírus a ser identificado é misturada com uma suspensão de anticorpos específicos ou, para a detecção de anticorpos específicos, uma suspensão do vírus conhecido é misturada ao soro do paciente que contém os anticorpos de especificidade desconhecida (Santos *et al.*2002). Uma vez que o anticorpo padrão para a febre amarela é utilizado e, ao se ligar ao vírus encontrado na cultura celular, este perde sua atividade infectiva e confirma-se o diagnóstico da febre amarela.

No teste de fixação do complemento, este é fixado pela presença de um complexo antígeno-anticorpo. A reação ocorre em duas fases. Na primeira são misturados o anticorpo antifebre amarela, o antígeno específico (sobrenadante de células infectadas pelo soro), o

complemento e estes são incubados. Se for formada a ligação anticorpo-antígeno, o complemento é fixado. Na segunda fase, o complexo hemácea-anticorpo anti-hemácea é adicionado na mistura. Se o complemento se ligar na primeira fase, este não estará mais disponível para interagir no complexo hemácea-anticorpo, e assim as hemáceas permanecerão intactas. A ausência de hemólise indica a formação do imunocomplexo. (Santos *et al.*2002)

A técnica de imunofluorescência utiliza anticorpos conjugados, que são anticorpos marcados com corantes fluorescentes (isotiocinato de fluoresceína- FITC). O teste de imunofluorescência indireta é realizado, também, em duas etapas, que revelam se os anticorpos anti-imunoglobulinas monoclonais conjugados ligam no complexo antígeno-anticorpo formado previamente na placa de um possível infectado. As amostras positivas aparecerão fluorescentes na análise por microscopia de fluorescência. (Santos *et al.*2002)

Os métodos sorológicos são baseados 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). As reações cruzadas entre o vírus amarílico e outros flavivírus são fatores que dificultam o diagnóstico sorológico, principalmente em áreas endêmicas de múltiplos flavivírus (Monath, 2001).

O MAC-ELISA é o diagnóstico mais utilizado atualmente e envolve a detecção de um imunocomplexo fixo em um suporte. Para a febre amarela, o suporte é sensibilizado com o antígeno viral e depois o soro (presença de anticorpos IgM) do paciente infectado é adicionado. Após a reação do material teste com a fase sólida, é adicionado o anti-IgM conjugado a uma enzima. Depois de um período de incubação, a enzima atua sobre o substrato produzindo uma mudança de cor (Santos *et al.*,2002). O MAC-ELISA anti-IgM é

capaz de fornecer um diagnóstico rápido se a amostra for obtida a partir do quinto dia de doença. Os IgM aparecem no sistema imunológico por uma infecção recente (2-3 meses) e corrente (atual). Comparam-se os resultados sorológicos das amostras agudas ou convalescentes. Se os títulos de anticorpos das amostras convalescentes forem quatro vezes ou mais do que os das amostras agudas, comprova-se a infecção recente pelo vírus. (Vasconcelos, 2003)

A detecção do ácido nucleico é realizada com a utilização da técnica de reação de transcriptase reversa seguida da reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) (Santos *et al.*, 2002). Ocorre a extração do ácido ribonucleico da amostra de sangue e, a partir deste, confecciona-se um DNA complementar com a enzima transcriptase reversa. Na PCR, utiliza-se oligonucleotídeos específicos às sequências virais e, assim, sua amplificação e detecção.

Não existe nenhum medicamento específico e as manifestações clínicas é que direcionam a utilização dos medicamentos apropriados. É comum o uso de analgésicos e antitérmicos utilizados nos caso de infecções por outras viroses com manifestações similares. Porém, medicamentos que contém o ácido acetilsalicílico ou derivados são contra indicados, uma vez que tendem a agravar possíveis hemorragias. Antieméticos também são utilizados para controlar os vômitos juntamente com outras substâncias como, ranitidina e omeprazol, para proteger a mucosa gástrica. (Vasconcelos, 2003)

A vacinação tornou-se o método mais eficaz de prevenção da febre amarela. Desenvolvida por Theiler e Smith, em 1927, só foi disponibilizada para o uso a partir de 1937. Ela é constituída pelo vírus atenuado da linhagem 17D, sendo utilizadas duas cepas: 17DD no Brasil e 17D-24 em outros países (Barret & Higgs ,2007).

A vacina foi desenvolvida por passagens empíricas em tecidos embrionários de galinhas, resultando em múltiplas mutações nos genes viras estruturais e não-estruturais (Monath, 2001). Permite uma replicação viral limitada, entretanto com significativa expansão

e disseminação pelo hospedeiro. Tem-se uma grande resposta de anticorpos neutralizantes necessitando de apenas uma única dose que é renovada a cada dez anos (CMAJ,2004).

Casos de reações contra a vacinação são raros, porém, duas complicações são características: doenças neurotrópicas (encefalite pós-vacina, que é a infecção e lesão das células do sistema nervoso) e doenças viscerotrópicas (tropismo do vírus e lesão dos tecidos do fígado, rins e coração) (Monath, 2005).

Por ser um vírus atenuado, a vacina é contra indicada a pessoas com imunodeficiência (risco de depressão do sistema imune), gestantes (risco de transmissão ao feto) e a indivíduos alérgicos a proteína do ovo, pois é produzida em tecidos de ovos embrionários de galinhas, podendo gerar um choque anafilático (Barnett, 2007).

Gaucher *et al.*, (2008), demonstrou que a imunização pela vacina 17-D contra a febre amarela gera uma resposta imunológica integrada por diversos componentes da imunidade inata como o sistema complemento, os inflamossomos e inteferons. Por meio da ativação de receptores TLR7 que reconhecem o genoma viral amarílico, ocorre à regulação da expressão de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-2 e IFNs tipo I.

A imunidade adaptativa é gerada por uma produção inicial de células T citotóxicas seguida de uma variável e forte produção de células B (Gaucher *et al.*, 2008). Após sete dias de vacinação, já é possível observar uma produção anticorpos IgM e, com duas semanas, eles chegam a sua concentração máxima. Durante as seis primeiras semanas, a titulação de IgM ainda é bem maior que a de IgG e eles persistem, por pelo menos, dezoito meses. Os anticorpos IgG são desenvolvidos mais lentamente e podem persistir por mais de 40 anos (Pulendran, 2009).

A possibilidade de utilização do vírus 17-D como vetor para outros genes vem sendo amplamente debatido. A substituição dos genes estruturais pré-M/M/E (Monath & Lai, 2003), expressão de diferentes epítomos na da Proteína E (Bonaldo *et al.*,2002; Bonaldo *et al.*,2005)

ou a inserção destes entre proteínas não estruturais flanqueadas por sítios específicos de clivagem por proteases (McAllister *et al.*, 2000) são exemplos de técnicas para construção de vírus quiméricos baseados no 17D. Bonaldo *et al.* (2007), demonstrou que a inserção da proteína fluorescente verde (EGFP) entre os genes do E e NS1 dos vírus 17D e 17D-Dengue 4 permitiu o correto processamento da poliproteína viral e não comprometeu a viabilidade dos vírus recombinantes. Eles também são capazes de estimular anticorpos neutralizantes contra a febre amarela e anticorpos contra EGFP. Estes diferentes sistemas são úteis para o desenvolvimento de novas vacinas vivas contra diferentes doenças humanas.

1.1.3. Vírus amarílico

O vírus amarílico pertence ao gênero *Flavivirus* da família Flaviviridae. Os flavivírus (do latim *flavus*, ou “amarelo”, referindo ao vírus da febre amarela) são pequenos vírus animais envelopados contendo uma única fita de RNA positivo como material genômico. Incluem mais de 68 membros, sendo a maioria arboviroses, transmitidos aos vertebrados por mosquitos ou por outros parasitas que se alimentam de sangue. Pertencem também a esse gênero os vírus causadores da Encefalite Japonesa, Encefalite de St. Louis, Dengue e a Febre do Nilo (Chambers *et al.*, 1990; Lindenbach *et al.*, 2007).

O vírion da febre amarela tem uma forma esférica medindo cerca de 40-50 nm de diâmetro (figura 4b). Possui um envelope lipídico, originário da célula hospedeira, que envolve um capsídeo proteico de simetria icosaédrica (figura 4c) (Lindenbach *et al.*, 2007). No envelope lipídico, são inseridas pequenas proteínas de membrana e espículas de natureza glicoprotéica (Santos *et al.*, 2002).

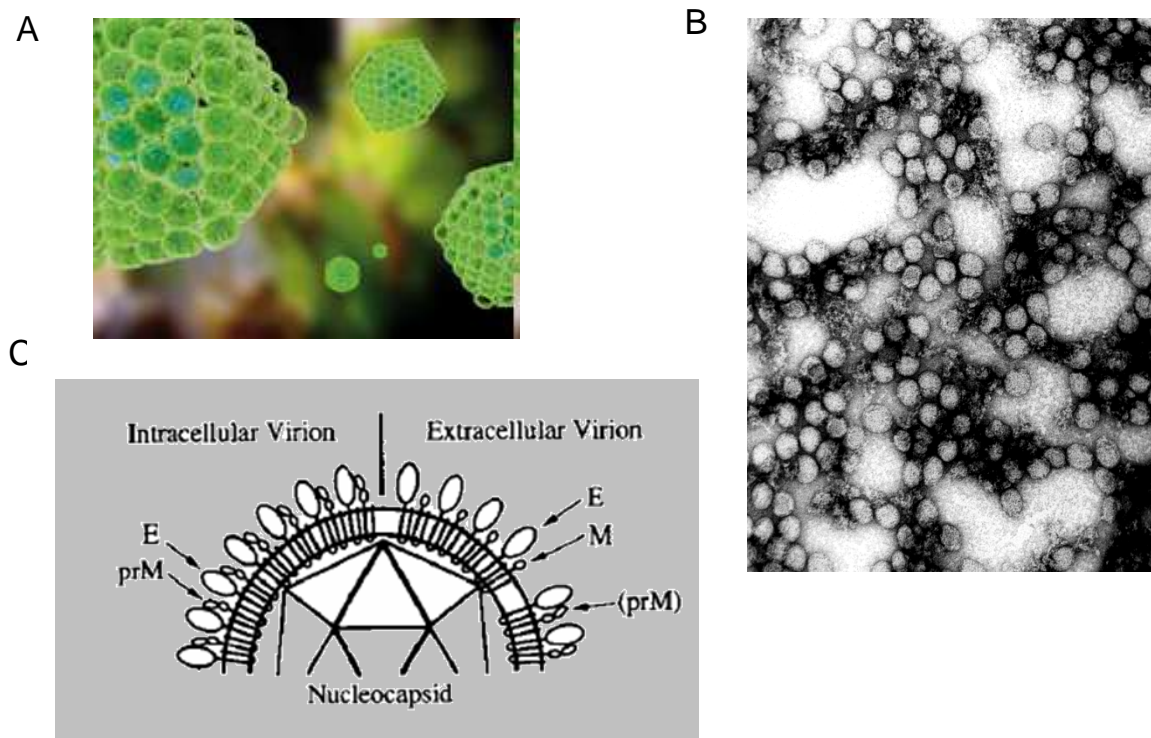


Figura 4. Partícula viral. A) Imagem computacional mostrando a superfície do nucleocapsídeo do vírion da febre amarela. http://www.novartisvaccines.com/press-room/media/Yellow_fever_tn.jpg

B) Micrografia eletrônica mostrando múltiplos vírions do vírus da febre amarela (aumento de 234.000 X). Adaptado de <http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/yellow%20fever%20virus.jpg>

C) Estrutura intracelular e extracelular do vírion de vírus pertencentes ao grupo *Flavivírus*. Adaptado de Chambers et al., 1990.

Ao contrário do vírus da Dengue que possui quatro sorotipos distintos (tipos 1, 2, 3, 4), apenas um sorotipo do vírus amarílico é reconhecido. Poucas alterações genéticas entre as cepas da África e da América permitem a caracterização de sete genótipos amarílicos (cinco africanos e dois sul-americanos). Apesar de não se poder afirmar a ocorrência de uma variação da virulência entre eles, a eclosão da doença está associada com determinados genótipos (Vasconcelos, 2003; von Lindern *et al.*, 2006; Barret & Higgs, 2007). Pode-se relacionar o genótipo tipo 1 do leste africano com frequentes insurreições, sugerindo que este vírus pode ser mais virulento ou infeccioso em humanos. Além disso, este genótipo também é

geneticamente heterogêneo (Mutebi *et al.*, 2001), podendo ser mais adaptado a diferentes condições de transmissão, como as que ocorrem em eventos de eclosão (Barret & Higgs, 2007).

O genoma do vírus amarelão é constituído por um único RNA fita simples, não segmentado e com polaridade positiva (sequência semelhante ao RNAm). Possui 10.806 nucleotídeos codificando 3.411 aminoácidos, precursores de uma única poliproteína. Na extremidade 5' possui uma estrutura "cap" tipo 1 (m⁷GpppAmp) e não apresenta uma cauda poli-A no final da extremidade 3' (Chambers *et al.*, 1990; Brendenbeek *et al.*, 2003; Mutebi *et al.*, 2004; Lindenbach *et al.*, 2007).

Possui uma única fase aberta de leitura (ORF) que é flanqueada por regiões não codificantes em ambos os terminais (NCR): 5'NCR com aproximadamente 100 nucleotídeos e a 3'NCR possui de 400 a 700 nucleotídeos. São regiões de grandes variações de tamanho e heterogenicidade nucleotídica entre as diferentes estirpes virais. As NCR não codificam para proteínas virais, mas são importantes para a regulação e expressão do vírus (Vasconcelos, 2003; Lindenbach *et al.*, 2007). Variações na 3'NCR podem alterar a virulência, reduzir a infectividade nos mosquitos e o crescimento viral em placas celulares, indicando que nesta região existem determinantes moleculares para essas características (Bryant *et al.*, 2005).

A única e longa ORF produz uma grande poliproteína que é clivada em 10 proteínas: 5'-C-pr(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3' (Chambers *et al.*, 1990; Brendenbeek *et al.*, 2003; Mutebi *et al.*, 2004; Lindenbach *et al.*, 2007). As proteínas estruturais são: C (capsídeo), M (membrana) e E (envelope). As proteínas não estruturais incluem as de alta massa molecular e altamente conservadas NS1, NS3 e NS5, e as quatro pequenas proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B (figura 5). Dados da sequência N-terminal da proteína do capsídeo demonstram que a tradução pode começar no primeiro AUG da ORF.

O final da tradução não é direcionado por um códon preferencial de terminação, todos os três estão presentes (UAA, UAG e UGA) (Chambers *et al.*, 1990).

Estrutura do genoma da febre amarela

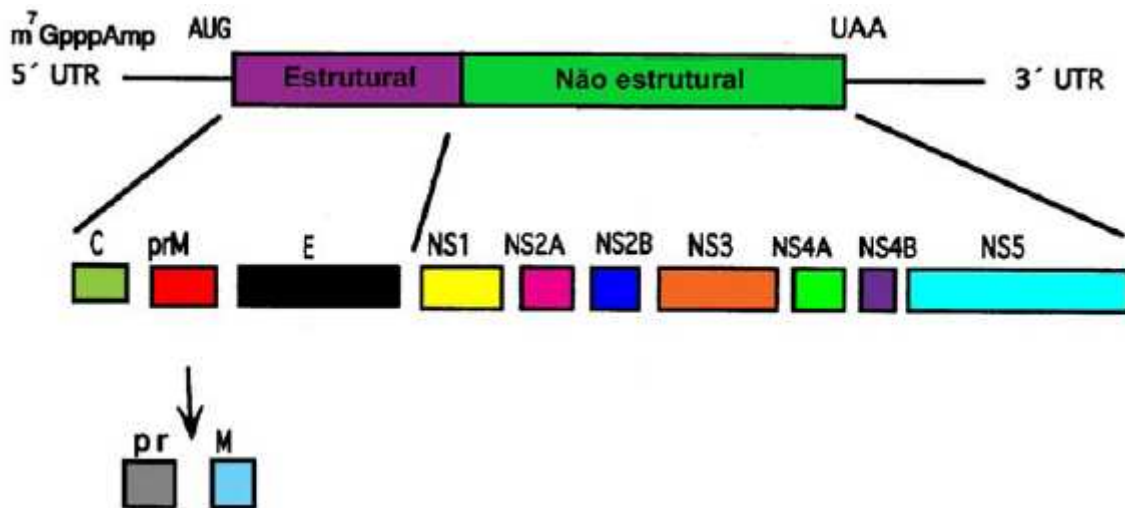


Figura 05. Estrutura genômica do vírus da febre amarela com os genes estruturais, não estruturais, regiões não traduzidas 5' NTR e 3' NTR e a formação das proteínas virais após o processamento proteolítico. Fonte: Machado, 2007.

A poliproteína é clivada progressivamente, dando origem às proteínas virais individuais em um processo direcionado por proteases do hospedeiro e do vírus original (Chambers *et al.*, 1990; Santos *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2005). Peptidases sinal do hospedeiro são responsáveis pela clivagem entre C/prM; prM/E; E/NS1 e NS4A/NS4B e serino proteases virais clivam entre NS2A/NS2B; NS2B/NS3; NS3/NS4A E NS4B/NS5. Ainda é desconhecida a enzima responsável pelo processamento entre a NS1/NS2A (Lindenbach *et al.*, 2007). O correto processamento influencia diretamente na replicação viral (Stocks & Lobigs, 1998).

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 nos vírions maduros que serão liberados no meio extracelular e as proteínas não estruturais ficam retidas nas células infectadas (Monath, 2001).

A proteína C codifica a formação do nucleocapsídeo viral e a proteína E dá origem ao envelope. A proteína do Capsídeo é pequena (12-14 kDa) e 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).

A proteína pré-M com aproximadamente 26 kDa é precursora da proteína M. A sua região N-terminal contém de um a três sítios de glicosilação e seis resíduos de cisteína conservados, todos com ligação dissulfeto. Esta proteína também auxilia no correto enovelamento da proteína do envelope ao impedir um rearranjo proteico para a forma fusogênica catalisado por um pH ácido durante a passagem do vírion pela via secretora celular. Na partícula imatura do vírion, as proteínas pré-M e E estão associadas formando um heterodímero. Entretanto, quando a partícula torna-se madura, ocorre a clivagem da proteína pré-M, no Complexo de Golgi, desestabilizando o heterodímero com a liberação do fragmento pré e a formação dos homodímeros do envelope (Lindenbach *et al.*, 2007). Dessa forma, o vírus adquire a capacidade de indução de fusão celular, aglutinação de eritrócitos e infecção de células suscetíveis. (Keelapang *et al.*, 2004; Op de Beeck *et al.*, 2004)

A glicoproteína E, maior componente do envelope viral, é responsável pelos eventos iniciais de infecção e também é o principal alvo da resposta imune do hospedeiro (Monath, 2001). A proteína não estrutural NS1 é N-glicosilada e apresenta uma massa molecular 46 kDa. Tanto para o vírus da febre amarela, quanto para o vírus causador da encefalite japonesa,

uma proteína contendo a NS1 e uma porção da NS2A pode ser encontrada associada às células (Lindenbach *et al.*, 2007).

A infecção por flavivírus induz a formação de anticorpos contra a NS1 ocorrendo fixação pelo sistema complemento (Chambers *et al.*, 1990; Monath, 2001). 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). A imunização ativa por NS1 ou a imunização passiva com anticorpos monoclonais anti-NS1 protegem os animais contra desafios propostos por flavivírus homólogos (Chambers *et al.*, 1990).

A proteína NS2A 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' NCR (Lindenbach *et al.*, 2007).

A segunda maior proteína viral, NS3, possui massa molecular entre 68-70 kDa sendo altamente conservada entre os flavivírus. Propõe-se que a NS3 esteja envolvida nos processos de replicação do RNA viral, e nas clivagens da poliproteína. Comparações das sequências também sugerem pelo menos duas funções: atividade para proteases e trifosfatase/helicase de nucleotídeos (Lindenbach *et al.*, 2007).

As proteínas NS2B, NS4A e NS4B são pequenas proteínas como a NS2A e pouco conservadas entre os flavivírus. A proteína NS2B é responsável por formar os componentes do capsídeo durante a replicação viral e as proteínas 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. A possível participação da NS5 como RNA polimerase viral e a clivagem do N-terminal por

clivagem no compartimento citoplasmático sugerem que a NS5 está localizada no citoplasma ao invés de estar associada às membranas (Chambers *et al.*, 1990; Lindenbach *et al.*, 2007).

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 amarelado à superfície celular. Sabe-se que, a proteína do envelope, no grupo dos flavivírus, 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 nucleocapsídeo 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. Este servirá de molde para a produção de novas fitas de RNA com polaridade positiva. O RNAm 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, metiltransferase e helicase (Jones *et al.*, 2003).

A montagem dos novos vírions ocorre próximo ao retículo endoplasmático, onde adquire o envelope. A morfogênese ocorre dentro de vesículas intracelulares onde são

maturadas as glicoproteínas. O principal mecanismo de liberação da partícula viral é a exocitose das vesículas, estas se fundem com a membrana plasmática sendo liberadas para o meio extracelular. O brotamento, em lise celular, pode ser observado ocasionalmente. (Santos *et al*, 2002)

Em resumo, pode-se descrever a replicação do vírus amarelado da seguinte maneira: o vírus entra na célula por endocitose mediada pela associação de proteínas à receptores celulares específicos (figura 6). Através de uma queda no pH, o envelope viral funde-se à membrana do endossomo liberando o capsídeo no citoplasma. Após a descapsidação e liberação do genoma viral, ocorre a tradução do genoma (RNAm com sentido positivo) na poliproteína. Esta é processada e suas proteínas são direcionadas para a formação correta do vírion. As proteínas pré-M e do envelope seguem para a membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER) onde são transportadas. Já a proteína do capsídeo direciona-se para a formação das subunidades do nucleocapsídeo. Enquanto isso, as proteínas não estruturais formam um complexo para a replicação do RNA viral. Com a montagem do nucleocapsídeo, este adquire a membrana do RER que contém as proteínas pré-M e E. A vesícula, com a partícula viral imatura seguem para o complexo de golgi (CG) para modificações pós-traducionais. Depois, a vesícula, por brotamento, sai do CG, ocorre à maturação da partícula viral e conseqüente exocitose do vírion.

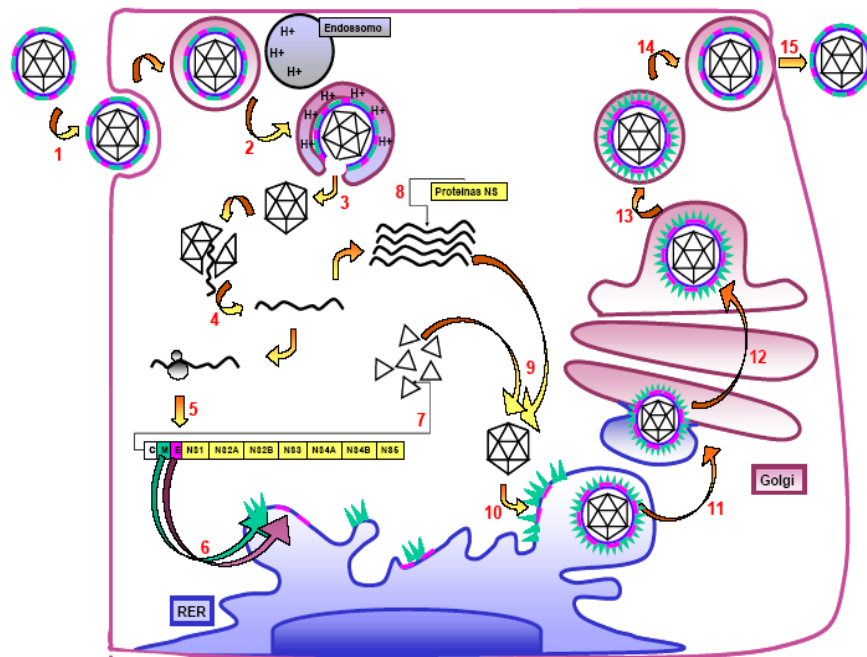


Figura 6. Esquema do ciclo de replicação de Flavivírus. 1) Entrada do vírion. 2) Fusão do endossomo com a vesícula contendo o vírus. 3) Liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular. 4) Descapsidação e consequente liberação do genoma viral. 5) Tradução do genoma de RNA⁺ em uma poliproteína. 6) Proteína pré-M (prM) e envelope (E) seguem para o retículo endoplasmático rugoso (RER) e são expressas em sua membrana. 7) Proteína do Capsídeo formando as subunidades que irão compor o capsídeo. 8) Proteínas não estruturais atuando na replicação viral. 9) Montagem do nucleocapsídeo. 10) Aquisição da membrana do RER contendo a proteína prM e E. 11) A partícula viral imatura segue para o Complexo de Golgi. 12) Modificações pós-traducionais ocorrem no Complexo de Golgi. 13) Vesícula com a partícula imatura brota do Complexo de Golgi. 14) Vesícula com a partícula imatura brota do Complexo de Golgi em direção à membrana celular. 15) Liberação do vírus da febre amarela para o exterior celular por fusão de membrana. Ilustração: Maria Creuza Barros. Fonte: Machado, 2007.

1.1.4. Proteína E

A proteína do envelope é a maior proteína estrutural com massa molecular entre 53-54 kDa. Ela é alvo de diversos processos de glicosilação e estes podem influenciar a especificidade do hospedeiro entre as diversas linhagens do vírus amarelo juntamente com os diferentes estágios de maturação desta proteína (Chambers *et al.*, 1990). Suas principais funções biológicas incluem a ligação e entrada dos vírions nas células hospedeiras; a fusão com as membranas das vesículas internalizadas e a maior ligação com os anticorpos neutralizantes (Volk *et al.*, 2009).

O N e C-terminais são produzidos por clivagens direcionadas por um peptídeo sinal. O longo ectodomínio N-terminal constituído de 395 resíduos está ancorado na bicamada lipídica por meio do domínio hidrofóbico C-terminal (Chambers *et al.*, 1990; Volk *et al.*, 2009). O ectodomínio organiza-se estruturalmente como um dímero e cada monômero possui três domínios em barril- β (Figura 7): o domínio III - responsável por intermediar as interações entre o vírus e as estruturas do hospedeiro relacionadas com a ligação viral; o domínio II - tem características hidrofóbicas interagindo com as membranas das células alvo durante a fusão e, por último, o domínio I - participa das alterações conformacionais que direcionam o processo de fusão (Pierson & Diamond, 2008).

Os domínios I e II encontram-se paralelos à superfície do vírion maduro e possuem os sítios de N-glicosilação além dos peptídeos e regiões de fusão. O domínio III é levemente projetado sobre a superfície da partícula pré-fusão e interações entre suas subunidades formam poros onde os receptores celulares se ligam. Este domínio também contém epítomos importantes para a neutralização tipo-específica do vírus (Volk *et al.*, 2009).

A estrutura do domínio III do vírus amarelo é diferente da estrutura dos outros flavivírus que possuem os mosquitos como vetores de transmissão. A região exposta possui

tamanho menor devido a um único aminoácido em uma das suas folhas- β , a metionina na posição 304. Porém, ela é exatamente do mesmo tamanho que as estruturas encontradas nos flavivírus transmitidos por carrapatos. Na mesma localização do resíduo de metionina, encontra-se o principal resíduo determinante do epítipo de neutralização do vírus amarelo, a prolina na posição 325. Estes dados demonstram que as variações químicas e estruturais no domínio III entre os diferentes flavivírus provavelmente contribuem para a grande diversidade de antígenos encontrada neste grupo (Volk *et al.*, 2009) .

A diminuição da patogenicidade e a perda ou ganho de epítopos particulares podem alterar as interações dos sítios de ligação da Proteína E com os receptores da membrana plasmática. Por isso, esta proteína interfere diretamente nos processos de atenuação viral e na produção de vacinas contra a febre amarela. Comparações entre os epítopos de estirpes selvagens e epítopos de vírus utilizados na vacina amarela demonstram que ocorre uma perda e o aparecimento de diferentes epítopos nos vírus atenuados resultando em alterações na imunogenicidade da proteína do envelope. (Sil *et al.*, 1992).

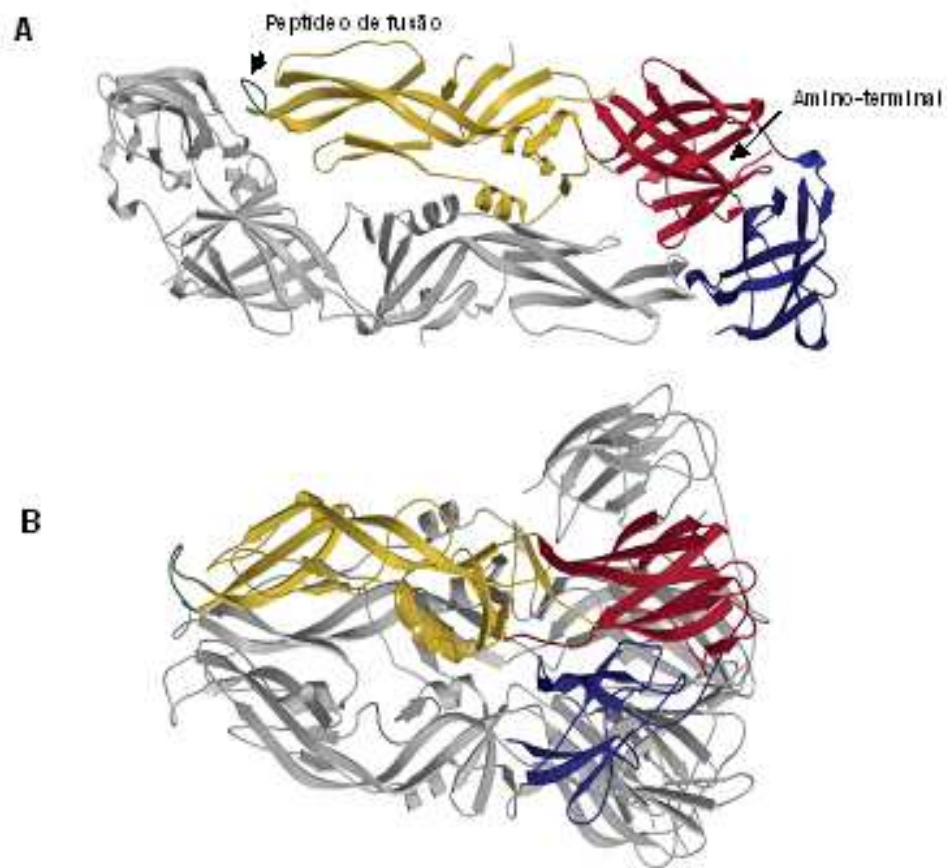


Figura 7. Estrutura do ectodomínio da Proteína E nas conformações pré e pós-fusão. A) Conformação dimérica pré-fusão. Em um monômero: os domínios I, II e III estão coloridos em vermelho, amarelo e azul, respectivamente, e o peptídeo de fusão é mostrado em verde. B) Conformação trimérica pós-fusão. Um monômero possui os domínios e peptídeo de fusão coloridos como em A, enquanto os outros dois domínios estão coloridos em cinza. Fonte: Mukhopadhyay *et al.*, 2005.

Stiasny *et al.*,(2009), baseados nas estruturas atômicas das conformações da proteína E pré e pós-fusão, propuseram um modelo contendo cada etapa necessária para a fusão e entrada do vírion na célula, desde a semi-estável conformação deste proteína interagindo com a superfície celular até a formação do poro de fusão pela conversão da proteína E em uma estrutura trimérica estável.

O processo de fusão precisa ser ativado por um sinal específico que conduzirá as diversas mudanças conformacionais expondo uma estrutura hidrofóbica, o peptídeo de fusão, que interage e estabiliza o contato entre as membranas celulares e virais. Nos casos dos vírus dependentes de pH baixo para fusão, como os flavivírus, as histidinas vem sendo propostas como sensores de pH ativando o início do processo. A fusão ocorre em pH 6 que é próximo ao pKa da histidina (pKa ~ 6-7) deixando-a protonada. Na conformação pré-fusão, o peptídeo localiza-se no domínio II e está escondido pelas interações hidrofóbicas entre os domínios I e III (Figura 8B). A protonação da histidina desestabiliza essas interações dos domínios I e II liberando o peptídeo de fusão para associar-se com a membrana celular. Depois, tem-se uma trimerização e relocação do domínio III ao lado da região de contato das membranas, sua estabilização e formação do poro de fusão. O estudo de cada detalhe deste processo a nível molecular contribui para a pesquisa de compostos antivirais que desestabilizam as estruturas de transição durante a fusão (Stiasny *et al.*, 2009).

Depois da fusão, o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma, o RNA e a proteína do capsídeo se dissociam e a replicação do genoma juntamente com a montagem das partículas começa. Inicialmente, partículas imaturas contendo as proteínas E, pré-M, a membrana lipídica e o nucleocapsídeo são formadas no lúmen do retículo endoplasmático, porém não são capazes de induzir a fusão com a célula do hospedeiro, ou seja, são não infecciosos (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

A maturação viral envolve dois processos. Primeiramente, uma mudança conformacional irreversível induzida pelo pH entre as proteínas pré-M e do envelope ocorre no CG, seguida da clivagem da proteína pré-M por uma furina. Durante a maturação, as proteínas pré-M e E, que estão associadas como heterodímeros, se dissociam e formam vários homodímeros da proteína do envelope ao longo de toda a superfície viral (Figura 8A). A proteína do envelope depende da liberação do fragmento pré-M para adquirir a conformação

fusogênica ativa e, dessa maneira, tornar a partícula viral infectiva (Mukhopadhyay *et al.*, 2005, Lindenbach *et al.*, 2007).

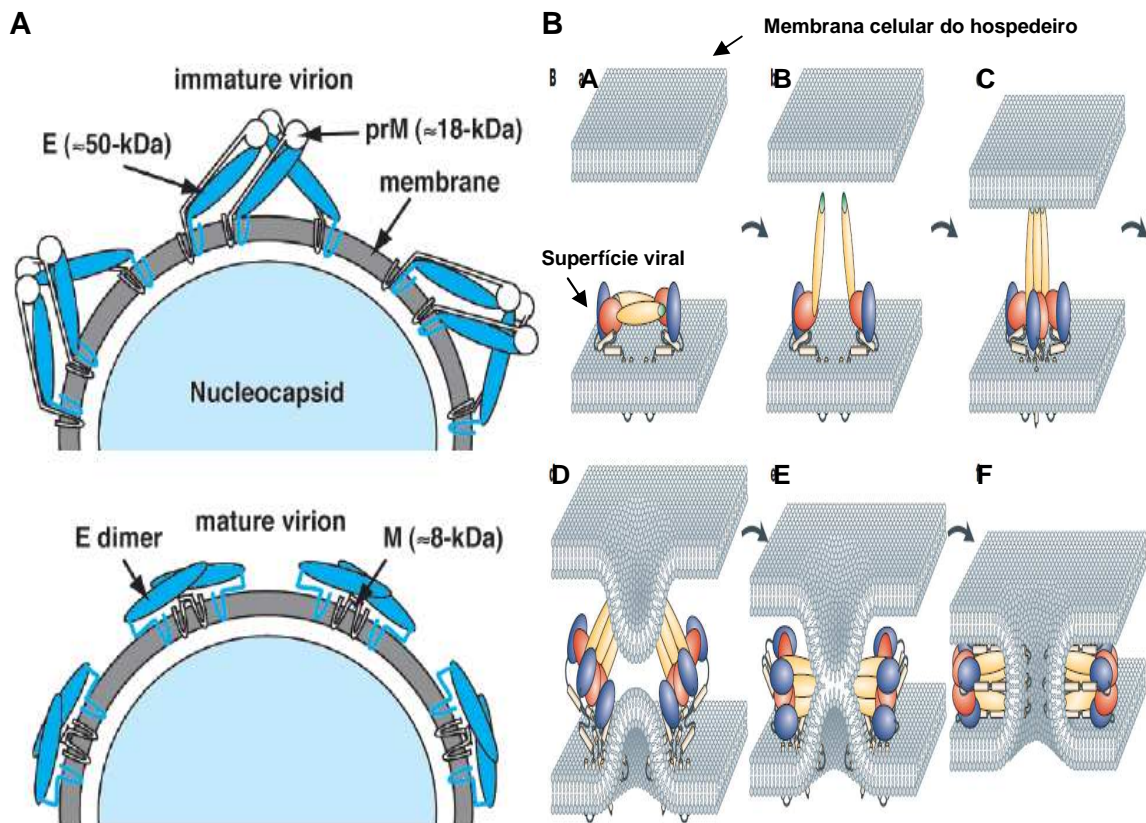


Figura 8. A) Conformações da proteína do envelope nos vírions imaturos e maduros. Fonte: Lindenbach *et al.*, 2007. B) Esquema do processo de fusão: a) a proteína do envelope na sua conformação dimérica na superfície viral e o peptídeo de fusão (em verde) internalizado no dímérico; b) proteína se liga ao receptor e é internalizada no endossomo. Em condições de pH baixo, o domínio II gira externamente ao redor da membrana do hospedeiro; c) esta mudança conformacional permite que a proteína do envelope se rearranje lateralmente. O peptídeo de fusão se insere na parte externa da membrana, impossibilitando a trimerização da Proteína E; d) o domínio III se dobra e, este processo direciona a membrana viral para o peptídeo de fusão e para a membrana celular do hospedeiro; e) o domínio III vai em direção ao domínio II e a hemifusão das membranas lipídicas ocorre; f) finalmente, o trímero é formado enquanto as regiões transmembranas e o peptídeo de fusão se aproximam. Fonte: Mukhopadhyay *et al.*, 2005

1.2. Baculovírus

Os baculovírus compreendem o grupo de vírus de insetos mais estudado. São capazes de infectar diversos hospedeiros artrópodes, principalmente as ordens Lepidóptera, Díptera e Hymenoptera. Possui 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), principais vetores de expressão utilizados em células de insetos (O'Reilly *et al.*, 1992) e 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)

Com fácil disseminação no ambiente, alta especificidade e inofensivos a organismos vertebrados e plantas, sua utilização como bioinseticida é vantajosa tanto no campo ecológico quanto no econômico. O maior programa de utilização de baculovírus como inseticidas foi implementado no Brasil e já foi utilizado em mais de dois milhões de hectares contra a praga da soja utilizando o baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV). (Moscardi, comunicação pessoal).

Como vetores de expressão de genes heterólogos, 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 utilização dos BEVs (Baculovírus como Vetores de Expressão) em conjunto com células de inseto proporciona um

ambiente eucariótico capaz de estabelecer as modificações pós-traducionais as quais muitas proteínas necessitam para serem ativas.

1.2.1. Classificação

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, os baculovírus pertencem à família *Baculoviridae* e, com base na morfologia (tamanho e forma) dos corpos de oclusão e outras características, foram divididos em dois gêneros: os *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV) (Ribeiro *et al.*, 1998; Theilmann *et al.*, 2005). Corpos de oclusão (OB, do inglês: “Occlusion Body”) é a denominação para a oclusão cristalina de natureza proteica que envolve os vírus dessa família (Ribeiro *et al.*, 1998).

O gênero *Granulovirus*, ou vírus da granulose, possui um corpo de oclusão denominado grânulo na forma ovicilíndrica com cerca de 0,3 a 0,5µm (Crook, 1991). Seu principal componente proteico e formador dos OBs é a granulina com aproximadamente 30.000 Daltons de massa molecular (Ribeiro *et al.*, 1998). Cada grânulo pode ter um vírion, raramente dois ou três. Esse grupo é pouco estudado, principalmente, pela falta de linhagens celulares adequadas para a sua replicação e por possuírem uma restrita gama de hospedeiros (Winstanley & Crook, 1993; Ribeiro *et al.*, 1998).

Os *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) possuem corpos de oclusão constituídos por subunidades da proteína poliedrina e são denominados poliedros variando entre 0,15 a 15µm (Bilimoria, 1991). Essa proteína também possui uma massa molecular similar a da granulina e constituem cerca de 95% do conteúdo proteico do OB. Ao contrário dos *Granulovirus*, cada poliedro pode conter apenas um nucleocapsídeo por vírion (*single nucleopolyhedrovirus*-SNPV) ou vários (*multiple nucleopolyhedrovirus* – NMPV) (Bilimoria, 1991, Ribeiro *et al.*, 1998; Castro e Souza, 2006). Os NPVs são encontrados em mais de 600 espécies hospedeiras

(Ribeiro *et al.*, 1998). Zanotto *et al.*, (1993) propôs uma subdivisão dos NPVs em dois grupos, NPV I e NPVII, baseado em estudos filogenéticos do gene da poliedrina (*polh*). Análises filogenéticas de todos os genes conservados que foram utilizados nos estudos até o momento confirmam essa subdivisão (Herniou *et al.*, 2003; Nakai *et al.*, 2003).

Zehle *et al.*, (2006), baseado em análises genômicas, sugere uma nova revisão da taxonomia e da classificação dos baculovírus. Comparações de 29 genomas baculovirais indicam que a filogenia desses vírus segue uma classificação por hospedeiros ao contrário de características morfológicas como proposto anteriormente. A árvore filogenética foi montada pelo alinhamento das posições dos aminoácidos de genes pertencentes aos 29 genomas baculovirais sequenciados. De acordo com estes dados, a família Baculoviridae é composta por quatro gêneros: Alphabaculovirus, Betabaculovirus, Gammabaculovirus e Deltabaculovirus.

Os Alphabaculovirus incluem todos os nucleopoliedrovirus específicos para lepidópteras. Os Betabaculovirus compreendem todos os hospedeiros lepidópteros do gênero *Granulovirus*. Os Gammabaculovirus abrangem os nucleopoliedrovirus hospedeiros da ordem Hymenoptera e os Deltabaculovirus os nucleopoliedrovirus específicos de dípteros. (Jehle *et al.*, 2006)

1.2.2. Vírion

A família Baculoviridae é caracterizada por um vírion com um envelope em forma de bastão. O genoma é um DNA fita dupla, circular e “supercoiled”, com 80 a 180 kilobases (kb) (Arif, 1986). Duas proteínas, a P6.9 com aproximadamente 7 kDa e a VP39 com 39 kDa, podem ser identificadas associadas ao nucleocapsídeo (Thiem & Miller, 1989). A P6.9 facilita

o empacotamento do DNA neutralizando as cargas negativas dessa molécula devido às altas concentrações do aminoácido arginina na sua composição (Wilson *et al.*, 1987).

Como característica única, os baculovírus apresentam durante um ciclo de infecção, dois fenótipos (figura 9): o vírus extracelular (“Budded Virus” – BV), responsável pela infecção célula-a-célula, e o vírus ocluso, também chamado de vírus derivado da oclusão (“Occlusion Derived Virus” – ODV) sendo responsável pela transmissão inseto-a-inseto (Smith *et al.*, 1983).

Apesar de serem diferentes morfológicamente, na composição de seus envelopes, não possuem as mesmas proteínas estruturais e terem sítios celulares de produção e maturação distintos, estes dois fenótipos são idênticos geneticamente (Smith & Summers, 1978).

O envelope dos vírus extracelulares (BV) é adaptado para o movimento e infecção dos tecidos do inseto. Em uma das suas extremidades, existem projeções denominadas peplômeros, constituídos pela glicoproteína GP64, no grupo I dos NPVs (Volkman *et al.*, 1984), ou pela proteína LD130 nos GVs e no grupo II dos NPVs (Pearson *et al.*, 2000). Durante a infecção, essas proteínas localizam áreas específicas na membrana celular direcionando a entrada do vírus na célula através da endocitose mediada por receptores específicos (Blissard & Rohrmann, 1989).

Os vírus oclusos apresentam, no seu envelope e exposta ao meio exterior, a proteína P74. Uma das possíveis funções desta proteína é a ligação dos ODVs nas células epiteliais do intestino médio do inseto (Faulkner *et al.*, 1997). Eles estão imersos em uma matriz proteica formada predominantemente pela poliedrina (NPVs) ou granulina (GVs). Esta estrutura cristalina é solúvel apenas em condições extremamente alcalinas, dando estabilidade física e biológica aos vírions (Hu *et al.*, 1999).

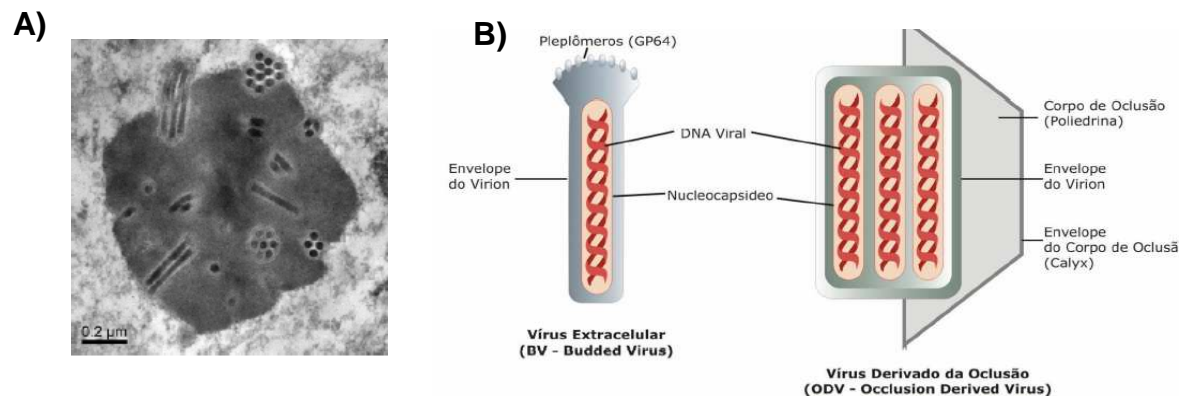


Figura 9. A) Micrografia eletrônica de transmissão mostrando múltiplas partículas virais envelopadas (ODVs) no interior de um corpo de oclusão (OB ou poliedro) do vírus AcMNPV. Fonte: Bergmann M. Ribeiro, dados não publicados. B) Representação dos fenótipos BV (vírus extracelulares) e ODV (vírus derivados da oclusão). Fonte: Castro & Souza, 2006 – ilustração adaptada de Kalmakoff & Ward, 2003.

1.2.3. Modo de infecção *in vivo*

Os baculovírus apresentam um ciclo de infecção bifásico no qual duas estruturas fenotípicas virais são produzidas sendo responsáveis por diferentes funções na infecção do inseto hospedeiro (Kelly *et al.*, 2007). Os vírus (ODVs) derivados dos corpos de oclusão dão início a uma infecção primária, nas células epiteliais do intestino médio, e os vírus extracelulares 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 proteica 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 (figura 10) (Volkman *et al.*, 2000). O fenômeno da transcitose também potencializa o estabelecimento da infecção sistêmica, ele ocorre quando alguns vírions provenientes dos corpos de oclusão penetram nas células epiteliais e seguem diretamente para a região basolateral adquirindo a proteína GP64 sem passar pelo processo inicial de replicação. Tanto o sistema traqueal quanto o sistema circulatório são as principais rotas utilizadas pelos vírus para se espalharem de um tecido ao outro (Engelhard *et al.*, 1994).

A montagem e maturação dos nucleocapsídeos ocorrem no núcleo e, estes, ao saírem pela membrana nuclear perdem seu primeiro envelope ganhando um novo ao brotarem das células epiteliais (Federici, 1997; Williams & Faulkner, 1997). Os BVs adquirem, na membrana basal, a glicoproteína GP64 e estão aptos a infectar as células alvo estabelecendo o segundo ciclo de infecção (Engelhard *et al.*, 1994).

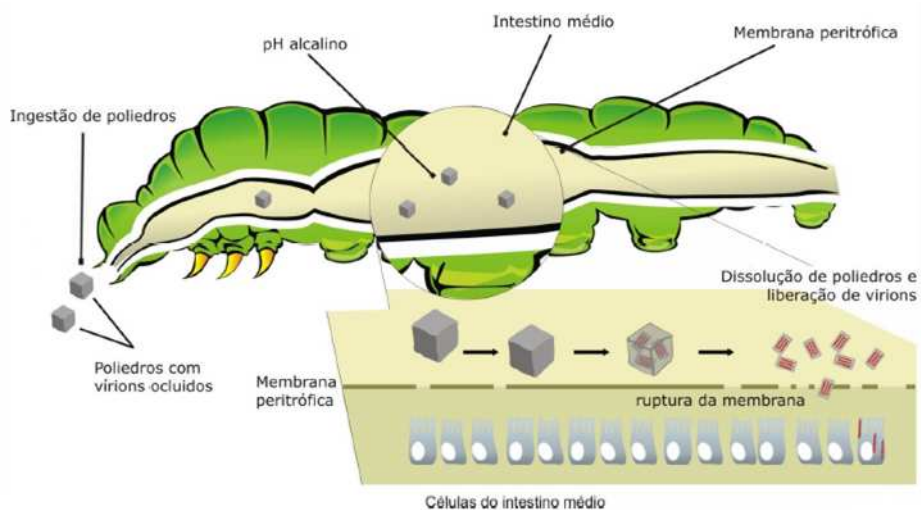


Figura 10. Processo inicial de infecção viral no intestino médio de uma lagarta infectada por baculovírus. A larva do inseto ingere os poliedros e, após a ingestão, estas seguem pelo trato digestivo. No intestino médio, devido ao pH alto alcalino, as partículas virais são liberadas, passando pela membrana peritrófica e infectando as células colunares (caracterizando a infecção primária). Fonte: Castro & Souza, 2006 – ilustração adaptada de Kalmakoff & Ward, 2003.

Após oito horas de infecção, já é possível observar sintomas típicos de infecção por baculovírus: perda do apetite, geotropismo negativo, parada no desenvolvimento larval e clareamento da epiderme devido ao acúmulo do vírus nos núcleos das células nesse tecido e no tecido adiposo (Ribeiro *et al.*, 1998). O vírus altera toda a fisiologia do inseto desde sua alimentação, oviposição e movimentação. Também com 8h pós-infecção (p.i), o núcleo torna-se hipertrofiado, com um aumento de tamanho do nucléolo e formação do estroma virogênico no seu centro (Williams & Faulkner, 1997).

Aproximadamente com 24h p.i, a produção de BV é reduzida e os nucleocapsídeos são transportados para sítios de microvesículas intranucleares e incorporados nos corpos de oclusão (Williams *et al.*, 1989). Com a morte do hospedeiro, o seu tegumento se desintegra, liberando os OBs no meio ambiente. Os corpos de oclusão são veículos de sobrevivência viral fora do inseto e também agentes de dispersão, fontes de contaminação para novos insetos-alvo (Hu *et al.*, 1999).

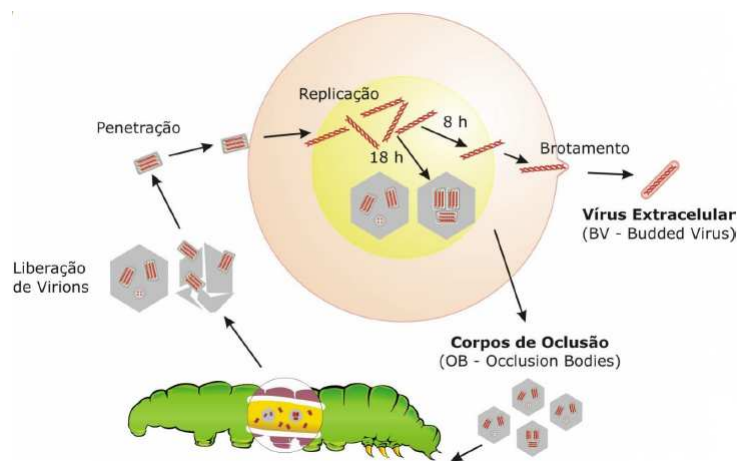


Figura 11. Ciclo de replicação dos baculovírus. Após a solubilização dos poliedros no intestino médio, os vírions infectam as células colunares iniciando o processo de replicação viral. Depois da entrada do vírus na célula, o material genético segue em direção ao núcleo da célula hospedeira para a replicação viral e formação de novas partículas, os vírus extracelulares (BV), para o estabelecimento de uma infecção secundária. Com 18h p.i, podemos observar a formação do estroma virogênico com acúmulo de vírions envoltos pela proteína poliedrina formando os vírus oclusos (ODV).

Fonte: Castro & Souza, 2006 – ilustração adaptada de Kalmakoff & Ward, 2003.

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

Todos os eventos da infecção primária e secundária são temporalmente regulados. O desenvolvimento de culturas *in vitro* permitiu um estudo detalhado de cada período da infecção e uma caracterização da expressão gênica. A produção dos BVs ocorre em torno de 12 a 24 h p.i. e os OBs são produzidos desde a fase final de infecção até a morte celular, que costuma ocorrer 72 h p.i.

A expressão gênica pode ser dividida em duas fases principais: a fase inicial (“early”) e a fase tardia (“late”). 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).

A fase precoce começa imediatamente depois do início da infecção até aproximadamente 6-8 h p.i. São transcritos genes dependentes da RNA polimerase II do hospedeiro correspondente a fatores de transcrição e proteínas necessárias à replicação viral (Ribeiro *et al.*, 1998). Genes que inibem a entrada da célula hospedeira no processo de apoptose, como o gene *p35*, são expressos nessa fase (Friesen & Miller, 1987).

A fase tardia ocorre entre 6 e 18 h p.i, com o início da replicação viral, a produção das proteínas essenciais e a montagem dos BVs. Uma RNA polimerase viral é responsável pela transcrição dos genes desta fase (Lu & Miller, 1997; Ribeiro *et al.*, 1998).

Na fase muito tardia, a partir de 18h 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. Com, aproximadamente, 72 h p.i ocorre à lise celular (Lu & Miller, 1997; Ribeiro *et al.*, 1998).

1.2.5. Baculovírus como vetores de expressão (BEV)

A utilização dos baculovírus para expressar proteínas heterólogas baseia-se na introdução de genes no genoma do vírus no lugar de um gene não essencial para a replicação, sob o comando de um promotor forte (O' Reilly *et al.*, 1992; Jarvis *et al.*, 1996 e Ribeiro *et al.*, 1998).

Algumas vantagens para a utilização de baculovírus como vetores de expressão (BEV) são as seguintes (O'Reilly *et al.*, 1992; Patterson *et al.*, 1995; Jarvis *et al.*, 1996 e Ribeiro *et al.*, 1998):

- Expressão de proteínas heterólogas em altos níveis (podendo chegar até 1g de proteína heteróloga por 10^9 células de inseto).
- Fácil purificação das proteínas produzidas.
- Ambiente eucariótico para expressão de proteínas complexas. Principalmente, quando as proteínas necessitam de modificações pós-traducionais exclusivas de sistemas eucariotos para serem ativas como N-glicosilação; O-glicosilação; clivagem proteolíticas etc.
- Capacidade de acomodar grandes inserções de DNA.
- Existência de promotores fortemente ativos durante a fase tardia da infecção.

O sistema de expressão baculoviral também possui algumas limitações, entre elas encontramos o fato de que células de inseto são incapazes de produzir complexos N-glicosilados com resíduos de galactose, no penúltimo, e ácido siálico no último resíduo de sua cadeia. Isso ocorre porque células de insetos e células de mamíferos possuem caminhos para a modificação pós-traducional de N-glicosilação diferentes. Ensaio enzimáticos demonstram que células de inseto possuem pouca ou nenhuma atividade de galactosiltransferase ou sialiltransferase envolvidas no processo de N-glicosilação, dificultando a adição desses resíduos no final da cadeia proteica. Modificações de N-glicosilação, principalmente resíduos

terminais de ácido siálico, contribuem para diferentes funções biológicas da glicoproteína. Para algumas aplicações clínicas, como por exemplo, administração *in vivo* de proteínas terapêuticas recombinantes, a falta dos resíduos de ácido siálico é inaceitável (Jarvis *et al.*, 2001; Kost *et al.*, 2005).

Outra modificação pós-traducional que não é tão eficiente em células de inseto quanto em células de mamíferos é a sumolização, adição de moléculas da proteína Sumo (semelhante a ubiquitina) na proteína recém traduzida. Para suprir essa limitação, Langereis (2007) introduziu, em linhagens celulares de insetos, componentes da sumolização de mamíferos por co-infecção com recombinantes baculovirais. Os recombinantes expressavam individualmente cada componente deste processo. A expressão dessas proteínas foi necessária e suficiente para ativar a sumolização de proteínas testes co-infectadas.

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 (POLHF) (Miller *et al.*, 1983). Smith *et al.* (1983) e Pennock *et al.* (1984) foram os primeiros a relatarem o uso dos baculovírus como vetores de expressão usando o *AcMNPV* (*Autographa californica nucleopolyhedrovirus*) para produzir β -interferon e β -galactosidase em células de *Spodoptera frugiperda*. Com a substituição do gene da poliedrina, as células infectadas pelos vírus recombinantes não produzem OBs, o que facilita a sua identificação com microscopia óptica contrastando com a presença dos corpos de oclusão dos vírus normais.

Atualmente, vetores baculovirais capazes de incorporar uma proteína heteróloga ao corpo de oclusão vêm sendo desenvolvidos (Je *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2003). Esses vetores possuem um gene heterólogo fusionado ao gene da poliedrina, além de possuírem o gene da poliedrina selvagem.

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).

A técnica de transposição é um modelo mais novo. 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. 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 purificação de vírus recombinantes além de obter uma maior quantidade de vírus produzido (Kost *et al.*, 2005).

Os BEVs podem ser utilizados para diversos objetivos como, por exemplo, avaliar as características funcionais e estruturais de proteínas heterólogas, aumentar a patogenicidade do baculovírus para uma maior eficácia do controle biológico ou a apresentação de antígenos para a produção de anticorpos.

A expressão de proteínas de flavivírus em vetores baculovirais tem sido bastante explorada. Desprès *et al.* (1991) avaliaram o papel das proteínas E e NS1, do vírus da febre amarela, como indutor da proteção imunológica contra esta doença. Para isso, estes antígenos virais foram expressos sozinhos ou juntos via baculovírus recombinantes. A Proteína E sozinha ou associada a NS1 promove a imunização, o que não ocorre quando a proteína NS1 é expressa individualmente. Kelly *et al.* (2000) expressaram a glicoproteína do envelope do vírus dengue 2 em células de insetos com o auxílio de vetores baculovirais. Demonstrando que, o purificado dessa proteína recombinante é capaz de proteger imunologicamente

camundongos, logo, a possibilidade da utilização como uma subunidade de vacinas contra dengue. Marx *et al.* (2001) expressaram a proteína E truncada do vírus causador da encefalite transmitida por carrapato para produzir de forma rápida e prática antígenos virais recombinantes com possível utilização em diagnósticos. Choi *et al.* (2004) para estudar a morfogênese do vírus causador da hepatite C, construíram baculovírus recombinantes que codificavam várias porções de proteínas estruturais do vírus da hepatite C. Todas as células infectadas pelos recombinantes expressaram suas respectivas proteínas estruturais, porém nenhuma proteína estrutural foi capaz de produzir partículas virais (VLPs). Apenas a proteína do capsídeo, quando expressa sozinha, foi expressa e liberada no meio de cultura na forma de uma “core-like particles”.

Para entender as bases estruturais para o tropismo e patogenicidade do vírus causador da febre do Oeste do Nilo (“West Nile Virus”, WNV), Nybakken *et al.* (2006) utilizaram o sistema de expressão baculoviral para expressar a proteína do envelope do WNV. Li *et al.* (2009) construíram um pseudotipo de baculovírus recombinante expressando a proteína do envelope do vírus responsável pela encefalite japonesa (JEV). A expressão dessa proteína foi caracterizada em células de mamíferos e sua capacidade de imunização foi analisada em camundongos. A imunização direta com o recombinante obteve a mesma proteção que a vacina inativa e melhor proteção quando comparada com a produzida pelas vacinas de DNA que codificam o mesmo antígeno. Sendo assim, pseudotipos baculovirais mediando à entrega de genes podem ser uma nova alternativa para o desenvolvimento de vacinas contra infecções de JEV.

2. OBJETIVOS

Este trabalho visa à expressão da proteína do envelope do vírus da febre amarela fusionada com a proteína poliedrina dos corpos de oclusão de baculovírus em células de inseto. A proteína recombinante poderá ser utilizada para fins de diagnóstico e/ou produção de vacinas utilizando partes virais.

2.1. Estratégias

1. Clonagem do gene da poliedrina pertencente ao baculovírus AgMNPV no vetor pGEM[®]- T Easy;
2. Transferência deste gene para o vetor de transferência pFast[™]Bac1;
3. Construção do plasmídeo pFastAgPol e bacmídeo BacAgPol;
4. Obtenção e caracterização do baculovírus recombinante vFastAgPol
5. Clonagem do gene do envelope no plasmídeo pFastAgPol;
6. Construção do bacmídeo BacAgPolEnvYF;
7. Obtenção e caracterização do baculovírus recombinante vAgPolEnvYF;
8. Análise da expressão do gene da poliedrina fusionado com o gene do envelope em células de inseto infectadas com os vírus recombinantes;
9. Avaliação da expressão das proteínas recombinantes por SDS-PAGE e Imunodeteccção.

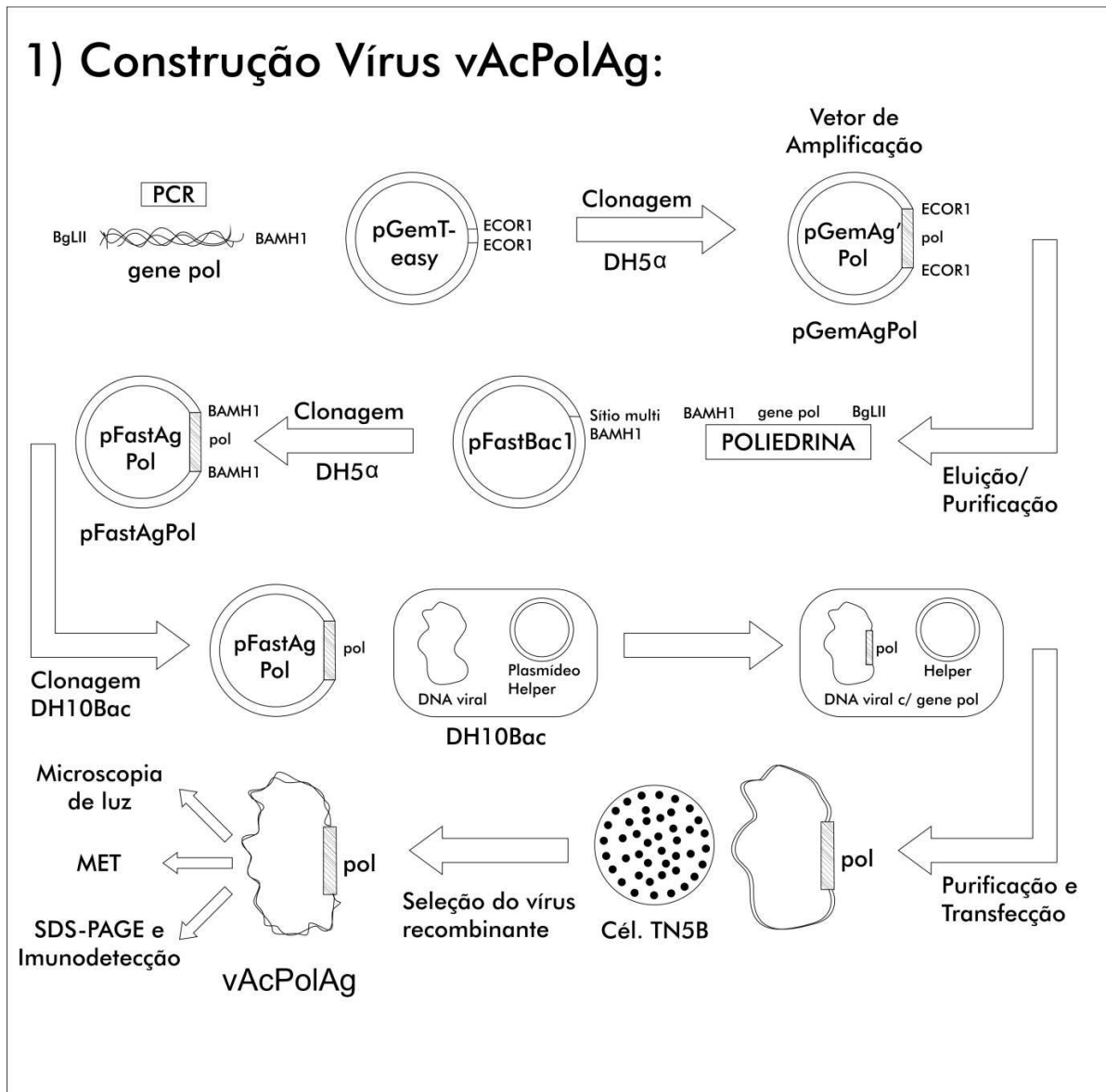


Figura 12. Esquema das construções virais. 1) Construção do vírus vAcPolAg: o fragmento de DNA referente ao gene da poliedrina será amplificado por PCR e clonado no vetor de amplificação pGemT-easy (Promega) dando origem ao plasmídeo pGemAgPol. O plasmídeo construído será digerido com as enzimas *BamHI* (Promega) e *BgIII* (Promega), o inserto obtido é purificado e clonado no plasmídeo de transferência pFastBac1 (Invitrogen). Com o auxílio da técnica de transposição, o novo plasmídeo, pFastAgPol, é transformado em uma célula DH10Bac e o bacmídeo recombinante selecionado e purificado. A transfecção em células de inseto é realizada e feita a seleção do vírus vAcPolAg. O vírus recombinante será analisado por microscopia de luz, microscopia de transmissão, SDS-PAGE e imunodetecção.

2) Construção Vírus vAcPolAgEnv:

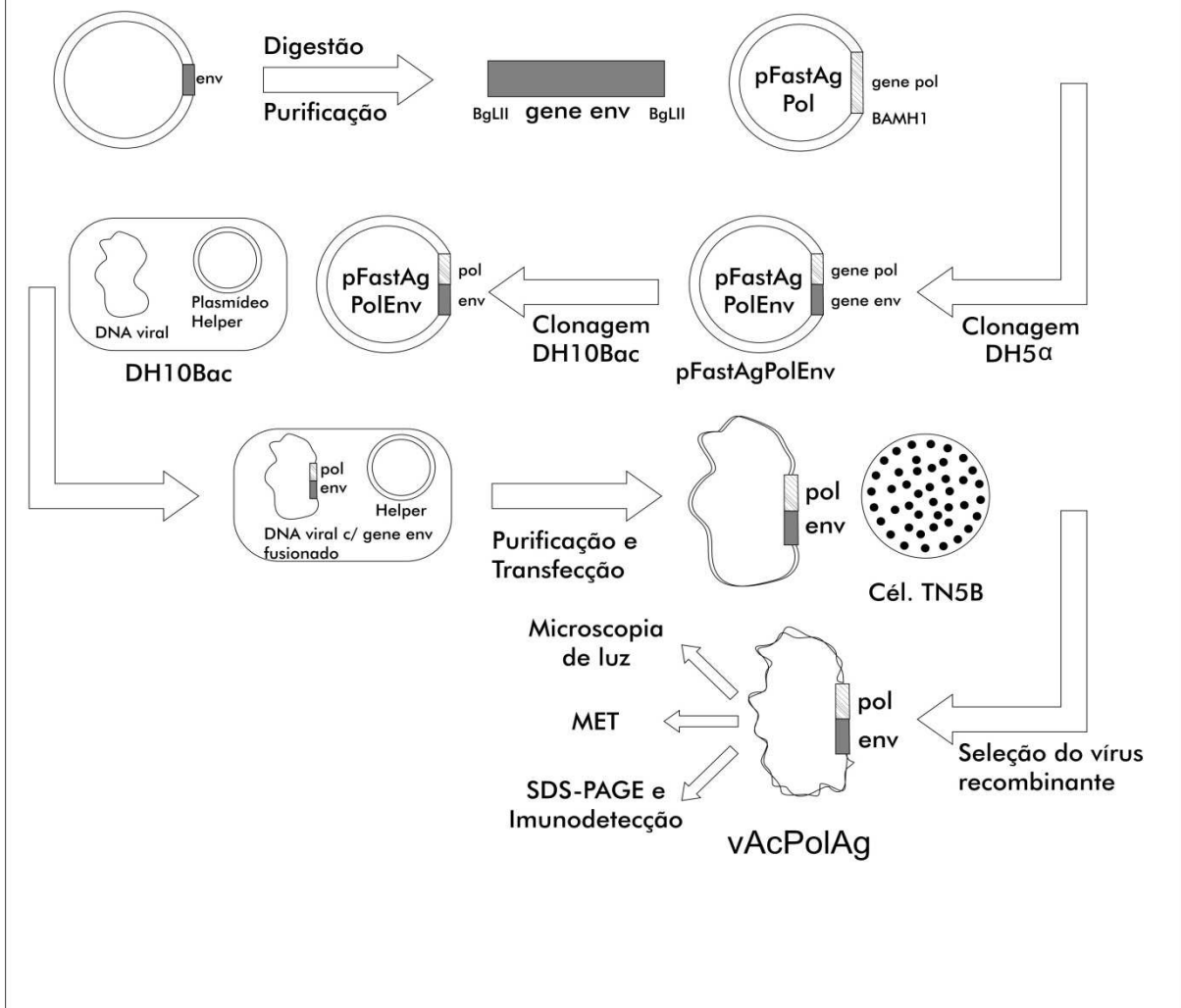


Figura 13. Esquema das construções virais. 2) Construção do vírus vAcPolAgEnv. Para a obtenção do fragmento de DNA referente ao gene do envelope, o plasmídeo pSynYFE será digerido com a enzima *Bgl*III (Promega). O inserto obtido é purificado e clonado no vetor *pFastAgPol* para a construção do plasmídeo *pFastAgPolEnv*. Com o auxílio da técnica de transposição, o novo plasmídeo é transformado em uma célula *DH10Bac* e o bacmídeo recombinante selecionado e purificado. A transfecção em células de inseto *TN5B* é realizada e feita a seleção do vírus vAcPolAgEnv. O vírus recombinante será analisado por microscopia de luz, microscopia de transmissão, SDS-PAGE e imunodeteção.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Vírus e células

O baculovírus selvagem AgMNPV-2D (Johnson & Maruniak, 1989), foi utilizado para a amplificação do gene *polh* e, conseqüente, construção do vetor pFastAgPol.

Células de *E. coli* DH5- α^{TM} (Invitrogen) foram usadas como hospedeiras para os diferentes plasmídeos deste trabalho.

Os vírus recombinantes vAcPolAg e vAcPolAgEnvYF foram obtidos por transposição em *E.coli* DH10Bac, seguindo instruções do fabricante do kit Bac-to-Bac (Invitrogen).

Células derivadas de *Trichoplusia ni* (BTI-TN5B1-4) (Granados *et al*, 1994) foram utilizadas para a propagação dos vírus. As células foram mantidas em meio TC-100 (Gibco-BRL), suplementado com 10% de soro fetal bovino a 27°C.

Os vírus vSynVIgal (baculovírus recombinante que possui o gene da poliedrina substituído pelo gene da galactosidase)(Wang *et al*, 1991), vAcPH3 (baculovírus recombinante que possui a poliedrina do vírus AcMNPV modificada para a fusão com uma cauda de hexa-histidina)(Costa, 2008) e AcMNPV-L1 (Lee & Miller, 1978) foram utilizados como controles para os experimentos de expressão das proteínas e imunodeteção.

3.2. Obtenção do gene *polh* do baculovírus AgMNPV

O DNA do vírus AgMNPV-2D foi utilizado como molde para uma reação de PCR, tendo como objetivo amplificar o gene *polh*. Foram utilizados 10 μ L do tampão de reação 10X da enzima *Taq* DNA polimerase (PHT), 3 μ L de MgCl₂ (solução estoque 50mM - PHT), 1 μ L

da mistura dos quatro dNTPs (solução estoque 10mM), 1 μ L do oligonucleotídeo pPolAgBglIIINew (solução estoque 10 μ M), 1 μ L do oligonucleotídeo PolAcYFNS1 (solução estoque 10 μ M) (Tabela 1), 1 μ l do DNA viral selvagem (60ng/ μ l), 5U (unidades) da enzima *Taq* DNA polimerase (PHT) e água “milli-Q” para um volume final de 50 μ L. O seguinte programa foi utilizado: 94°C/5 min, 35 ciclos de 94°C/1 min, 53°C/1,5 min, 72°C/2min 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). A banda de tamanho esperado (750 pb), correspondente ao gene da poliedrina e os nucleotídeos adicionados pelos oligonucleotídeos, foi extraída do gel, eluída e purificada com o Kit GFX DNA and Gel Band Purification (GE) segundo instruções do fabricante.

Tabela 1: Lista de oligonucleotídeos utilizados no trabalho.

Oligonucleotídeos	Sequência 5' → 3' / Localização
pPolAgBglIIIne	GGCCTATAGCTATAATCTGGCATAGATCTCGG Posicionado a 4033 pb do início do gene <i>polh</i> no plasmídeo pFastAgPol.
PolAcYFNS1R	GGATCCATACGCCGGACCAGTGAACAGAGG Posicionado a 4753 pb ao final do gene <i>polh</i> no plasmídeo pFastAgPol.
pPOLHF	AATGATAACCTCTCGC Primer “Forward; posição –45 no promotor da poliedrina
pPolAcAg310-348F	GAAGACAGCTTCCCCATTGTAAACGACCAAGA AGTGAT Posicionado a 4351 pb do início do plasmídeo pFastAgPol.
yfe878F	GTGACAGATCTGACCATTGCC Localizado a 96 nucleotídeos do começo do gene do envelope.
yfe2460R	CAGATCTCCTTAATCCGCCCAACTCC Posicionado a +15 nucleotídeos do final do gene do envelope.
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC Localizado a 145 pb da região de transposição no bacmídeo (mini-att TN7)
pFASTSeqRev	ACCAAATGTGGTATGGCTG Posicionado a 6509 pb do início do plasmídeo pFastAgPolEnv

3.3. Clonagem do fragmento de DNA contendo o gene *polh* no plasmídeo pGEM[®]-T Easy (Promega)

O fragmento purificado foi utilizado em uma reação de ligação com o plasmídeo pGEM[®]-T Easy (Kit pGem[®]- T Easy Vector Systems, Promega) (figura14) de acordo com instruções do fabricante. O sistema de ligação foi utilizado na transformação bacteriana em células competentes *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen) pelo método de choque térmico descrito em Sambrook *et al.* (1989). Os clones positivos foram selecionados por resistência em meio com o antibiótico ampicilina.

Para a extração do DNA do plasmídeo recombinante, foi realizada uma lise alcalina em pequena escala como descrito em Sambrook *et al.*,(1989). E, com o DNA purificado, foi feita uma restrição enzimática utilizando a enzima *EcoRI* (Promega) presente no sítio de multiclonagem, de acordo com indicações do fabricante, para a liberação do fragmento de interesse. O resultado da reação de digestão foi avaliado em eletroforese em gel de agarose 0.8%. Os clones recombinantes foram então, sequenciados no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás.

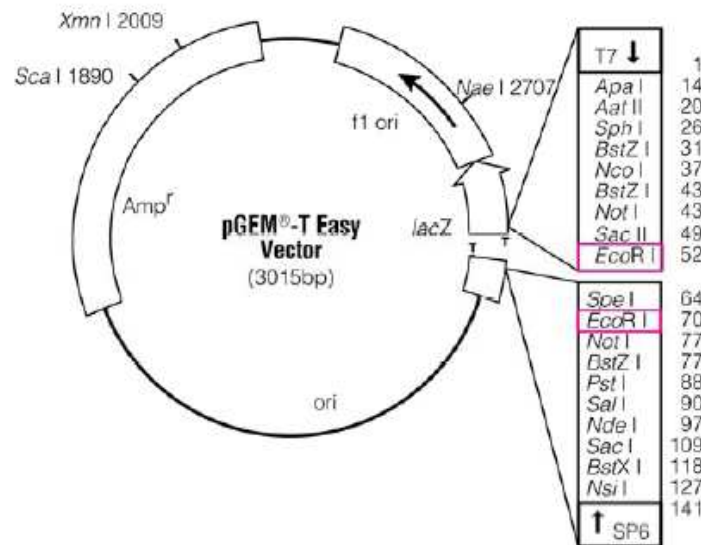


Figura 14. Mapa do plasmídeo pGEM[®]-T Easy (Promega). Os sítios de restrição para a enzima *EcoRI*, mostrados dentro do retângulo rosa, foram utilizados para a confirmação da inserção do gene de interesse.

Fonte: www.promega.com

3.4. Construção do vetor pFastAgPol

O vetor pGEMAgPol foi previamente digerido para liberar o inserto e obtenção das extremidades coesivas necessárias para a posterior clonagem no vetor pFastBacTM1 (Invitrogen) (figura 15) com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Bgl*III. Para a reação foram utilizados 20µl de DNA purificado, 5 µl do tampão 10X One for all (Promega), 5 unidades (U) de *Bam*HI (Promega) e *Bgl*III (Promega) e água “milli-Q” para um volume final de 50 µl. A amostra foi incubada a 37°C por 3 h. Os fragmentos da digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose 0.8%. O fragmento de 750 pb referente ao gene inserido foi eluído do gel utilizando o kit GFX DNA and Gel Band Purification (GE).

Para a construção do vetor pFastAgPol, o inserto purificado foi ligado ao plasmídeo pFASTBacTM1 (Invitrogen) sob o comando do promotor do gene *polh* (P_{ph}). Este plasmídeo foi previamente digerido com a enzima de restrição *Bam*HI (Promega) (presente no sítio de

multiclonagem) e desfosforilado por reação utilizando a enzima CIAP- “Calf Intestinal Alkaline Phosphatase” (Promega) de acordo com as especificações do fabricante. Para a reação de ligação foi utilizada a enzima T4 DNA ligase (Promega) também segundo protocolo do fabricante.

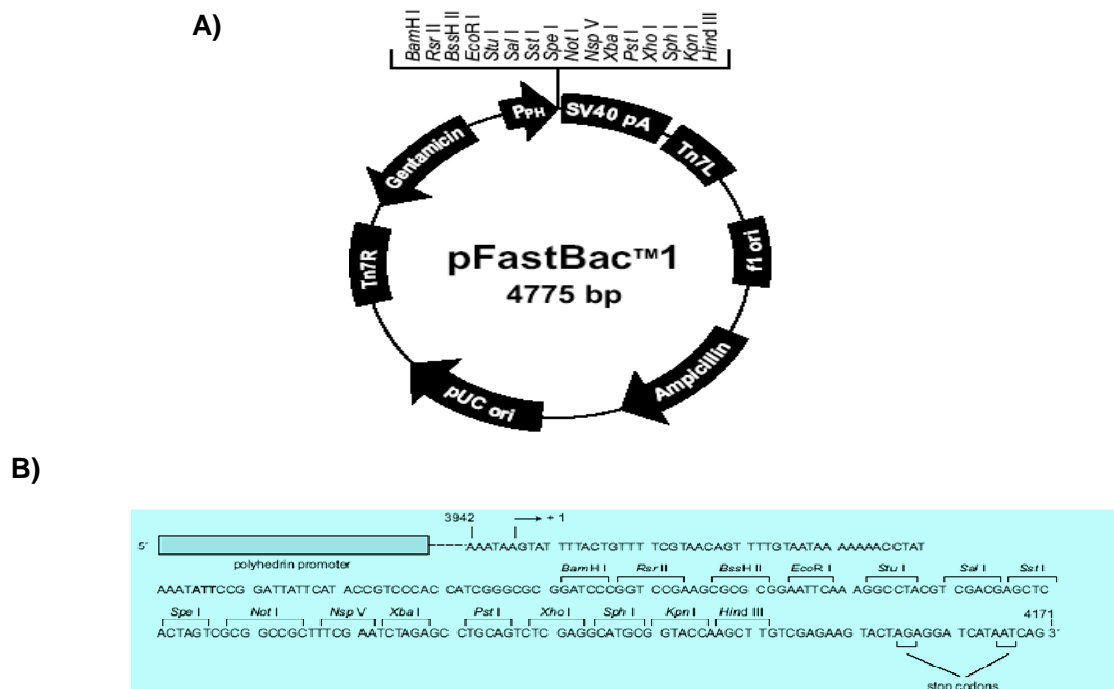


Figura 15. A) Mapa do vetor pFastBac™1. B) Esquema mostrando a sequência e sítios de restrição presentes no sítio de multiclonagem. Fonte: Manual Bac-to-Bac “Baculovírus Expression System”, Invitrogen.

Foi realizada uma transformação por choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989) e os clones resultantes foram selecionados pela resistência a ampicilina (pFastBac™1 também possui o gene que confere resistência a este antibiótico). Posterior purificação por lise alcalina em pequena escala como descrita no item 3.3 foi efetuada e, para confirmar a presença do gene *polh* no plasmídeo, realizou-se uma reação de PCR com os mesmos oligonucleotídeos e condições descritas no item 3.2. O resultado foi analisado em gel de agarose 0.8%.

Para que a proteína seja expressa corretamente, é necessário que ocorra a correta inserção do gene no plasmídeo. Para a confirmação da orientação do inserto clonado foi realizada uma PCR, com as mesmas condições descritas no item 3.2, porém com o oligonucleotídeo iniciador pPolHF (anela-se no início do promotor da poliedrina presente no vetor) e o oligonucleotídeo reverso PolAcYFNS1 (ver tabela 1). O resultado foi analisado em gel de agarose 0.8%.

3.5. Construção, por transposição, e isolamento do baculovírus recombinante contendo o gene *polh*

O DNA do plasmídeo pFASTAgPol 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 48h contendo os seguintes antibióticos: tetraciclina(10µg/mL), gentamicina (7µg/mL) e canamicina (50µg/mL); e também os marcadores de seleção IPTG(40µg/mL) e X-Gal (100µg/mL) .

A clonagem do inserto contendo o gene *polh* foi confirmada por análise de PCR com os oligonucleotídeos M13F e M13R (Tabela 1) nas mesmas condições descritas no item 3.2.

Depois de confirmada a inserção do gene, um µg do DNA plasmidial da célula DH10-Bac contendo o bacmídeo recombinante, foi utilizado para transfectar células de inseto BTI-TN5B1-4 (10⁶ células). Foi adicionado 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/lipofectina possibilitando a cobertura da monocamada de células. Após 3h de incubação da placa, à temperatura ambiente, foi

adicionado 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 5×10^6 células de inseto BTI-TN5B1-4.

O vírus recombinante foi purificado, seu DNA extraído como descrito em O'Reilly *et al* (1992), e a presença do gene de interesse analisada por PCR com os oligonucleotídeos pPolAgBglIINew e PolAcYFNS1R (Tabela 1) na mesmas condições descritas no item 3.2 e por microscopia de luz (Axiovert 100, Zeiss).

3.6. Análise da expressão da proteína poliedrina (POLH) ao longo da infecção por baculovírus recombinantes em células de inseto por SDS-PAGE e imunodeteção.

O vírus recombinante, vFastAgPol, e os controles - os vírus vSynVIgal, vFASTPH3 e AcMNPV- foram utilizados 10 pfu (unidade formadora de placa)/célula, para infectar 5×10^6 células de inseto (BTI-TN5B1-4) em uma placa de 100 mm de diâmetro (TPP). As células foram incubadas a 27°C, coletadas com 72 h p.i e centrifugadas a 5.000 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado três vezes com PBS (136mM NaCl, 1,4mM KH_2PO_4 , 2,6 mM KCl, 8mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH7,4). Os extratos de células foram ressuspendidos em 100 μL de PBS e estocados a 80°C negativos. Foram utilizados 10 μL de cada amostra para análise em SDS-PAGE 12% (Laemmli,1970) usando o aparato Mini Trans Blot Cells de acordo com o protocolo de instruções do fabricante (Bio-Rad). Foram feitos dois géis, um foi corado e fixado em solução de 40% de metanol e 10% de ácido acético 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 imunodeteccão de proteínas (Western-blot) descrito abaixo.

Com o auxilio 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 e utilizado o 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 antipoliedrina produzido em coelho (dados não publicados) 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 coelho, conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma) por mais uma 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 banda de interesse devido à presença da enzima conjugada ao anticorpo secundário que se ligou ao anticorpo primário específico para a proteína poliedrina. Por fim, a reação foi interrompida com lavagens de água destilada evitando a marcação inespecífica.

3.7. Obtenção do gene da proteína do envelope (*env*) do vírus da febre amarela

O gene do *env* do vírus da febre amarela foi obtido através da digestão enzimática, com *Bgl*II, do plasmídeo pSynYFE (Machado, 2007) (Figura 16). Este plasmídeo possui o gene *env* sob o comando de dois promotores em tandem, *pXIV* (que é uma sequência modificada do promotor da poliedrina) e o promotor sintético *pSyn* (Wang *et al.*, 1991).

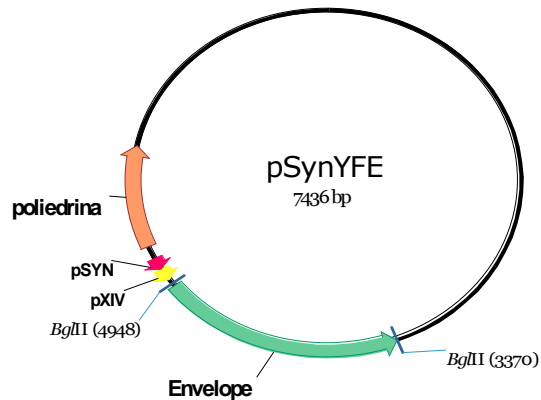


Figura 16. Esquema mostrando o mapa do plasmídeo pSynYFE, o gene *env*, o gene da poliedrina e os promotores *pXIV* e *pSyn*. Fonte: Adaptado de Machado, 2007.

O plasmídeo pSynYFE possui o gene *env* flanqueado por dois sítios de *Bgl*II. Então, para a obtenção desse gene com as extremidades coesivas necessárias para a ligação no vetor pFastAgPol, foi realizada uma digestão total com *Bgl*II (Promega). Nesta reação, foram utilizados 40µl de DNA purificado (100ng/µl), 10 µl do tampão D 10X (Promega), 5 unidades (U) *Bgl*II (Promega) e água “milli-Q” para um volume final de 100 µl. A amostra foi incubada a 37°C por 3 h. O resultado da digestão foi avaliado em gel de agarose 0.8% e a banda de 1.600 pb, referente ao gene *env*, foi extraída, eluída e purificada utilizando o kit GFX DNA and Gel Band Purification (GE) de acordo com instruções do fabricante.

3.8. Clonagem do gene *env* no vetor pFastAgPol.

Para a construção do plasmídeo pFastAgPolEnvYF, que contém o gene *polh* fusionado ao gene *env*, o vetor pFastAgPol foi previamente digerido com a enzima de restrição *Bam*HI (Promega). Em seguida, foi desfosforilado com a enzima CIAP (Promega) de acordo com especificações do fabricante. Preparou-se um sistema de ligação contendo o vetor tratado e o inserto do gene *env* purificado do plasmídeo pSynYFE. Para esta reação, foi utilizada a enzima T4 DNA ligase (Promega) também segundo especificações do fabricante.

Foi realizada uma transformação por choque térmico e os clones resultantes foram selecionados pela resistência a ampicilina. Posterior purificação por lise alcalina em pequena escala como descrita no item 4.3 foi efetuada e, para confirmar a presença do gene *env*, realizou-se uma reação de PCR. Nesta reação, foram utilizados: 1 μ L do DNA plasmidial purificado; 2,5 μ L do tampão de reação 10X da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1 μ L da mistura dos quatro dNTPs (de uma solução estoque 10 mM), 1 μ L dos oligonucleotídeos YFE2460R e YFE878F (de um estoque de 10 μ M) (Tabela 1), 5U (unidades) da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e água “mili-Q” para um volume final de 25 μ L. O seguinte programa foi executado: 94°C/5 min, 35 ciclos de 94°C/1 min, 50°C/2 min, 72°C/3 min e 72°C/10 min para o término da extensão.

Utilizando o mesmo programa descrito acima, foi realizada outra reação de PCR para confirmar a correta orientação do inserto com o iniciador YFE878F (anela-se no início do gene *env*) e o pFASTSeqRev (anela á 168 pb após o gene inserido no vetor pFastAgPol) (ver tabela 1). O resultado foi analisado em gel de agarose 0.8%.

3.9. Construção, por transposição, e isolamento de um baculovírus recombinante contendo o gene *polh* fusionado com o gene *env*.

Os mesmos procedimentos de transformação em células DH10Bac™ e transfecção em células de inseto BTI-TN5B1-4, descritos no item 3.5, foram utilizados para a construção do bacmídeo BacAgPolEnv e para a obtenção, amplificação e purificação do vírus recombinante vAcPolAgEnv, respectivamente.

Na confirmação do bacmídeo, a reação de PCR foi realizada com os oligonucleotídeos YFE878F e M13R (Tabela 1) e, na análise por PCR do vírus vAcPolAgEnv, foram utilizados os oligonucleotídeos YFE878F e YFE2460R. As duas reações foram feitas seguindo o programa descrito no item 3.8.

3.10. Análise da expressão da proteína fusionada (PolEnv) ao longo da infecção por baculovírus recombinantes em células de inseto por SDS-PAGE e imunodeteccção .

Os vírus recombinantes, vAcPolAgEnv, vSynYFE- e uma mistura contendo os dois vírus, foram utilizados para infectar separadamente, 5×10^6 células de inseto BTI-TN5B1-4 em uma placa de 100 mm de diâmetro (TPP). As células foram incubadas a 27°C, coletadas com 72 h p.i e centrifugadas a 5.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado três vezes com PBS (136mM NaCl, 1,4mM KH₂PO₄, 2,6 mM KCl, 8mM Na₂HPO₄.2H₂O, pH7,4). Os extratos de células foram ressuspensos em 100 µL de PBS e estocados a 80°C negativos. Foram utilizados 10 µL de cada amostra para análise em SDS-PAGE 12% (Laemmli,1970) usando o aparato Mini Trans Blot Cells de acordo com o

protocolo de instruções do fabricante (Bio-Rad). O gel foi corado e fixado em solução de 40% de metanol e 10% de ácido acético por 4h, com leve agitação.

3.11. Análise da expressão da proteína fusionada (PolEnv) ao longo da infecção por baculovírus recombinantes em células de inseto por microscopia de fluorescência confocal (imunodeteção).

Células BTI-TN5B1-4 infectadas com os vírus recombinantes vAcPolAgEnv e seu controle vSynYFE foram fixadas e processadas com 72h p.i para a imunodeteção por microscopia confocal.

Primeiramente, as células foram fixadas com acetona (100%) gelada durante 10 min. Este procedimento foi repetido duas vezes e, em seguida, realizou-se o bloqueio dos sítios inespecíficos incubando as amostras por 1 h com uma solução de PBS 1X e 10% de BSA. Após o tempo determinado, a solução bloqueadora foi retirada e adicionado o anticorpo monoclonal antifebre amarela (Chemical Internacional) na concentração de 1:500 em PBS 1X e 10% de BSA. O sistema foi incubado durante 2 h.

A seguir, as células foram lavadas 3 vezes em PBS 1% sob agitação por 5 min e incubadas por 15 min em uma solução do corante DAPI (Invitrogen) (1µg/mL) para a marcação dos núcleos celulares. Uma nova lavagem, como a descrita acima, foi realizada e as amostras incubadas, por mais 1 h, com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado ao fluoróforo Alexa 488 (Invitrogen). Ao final deste processo, as amostras foram lavadas 5 vezes com PBS 1% por 5 min.

As células foram observadas e fotografadas em microscópio confocal Leica tcs sp5.

3.12. Análise ultraestrutural de células de inseto infectadas pelos vírus recombinantes: vAcPolAg e vAcPolAgEnv.

Células BTI-TN5B1-4 infectadas com os vírus recombinantes vAcPolAg, vAcPolAgEnv, vAcPH3, AcMNPV e vSynYFE; foram fixadas e processadas com 72h p.i para a análise ultraestrutural das células infectadas.

As células foram cuidadosamente ressuspensas e transferidas das placas de cultura para micros tubos tipo Eppendorf. As amostras foram centrifugadas por 5 min a 5.000 g o sobrenadante descartado e o pellet celular lavado com tampão PBS 0,1M pH 6,4. Em seguida, fixadas por 2h a 4°C com o fixador Karnovsky (2% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído tamponado em 0,1M de tampão cacodilato de sódio pH 6,4).

Depois da fixação, as amostras foram centrifugadas, nas mesmas condições descritas acima, e o sedimento resultante lavado três vezes por 5 min, cada vez, em 0,1M de tampão cacodilato de sódio pH 6,4. A pós-fixação foi realizada durante 30 min em 1% de tetróxido de ósmio, 0,8% de ferricianeto de potássio e 5mM de cloreto de cálcio em 0,1M de tampão cacodilato de sódio pH 6,4. As amostras foram lavadas por 5min, cada vez, com água destilada, e contrastadas *in bloc* durante a noite com 0,5% de acetato de uranila. Por fim, foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30 – 100%) por 10 min em cada concentração, incluídas em resina Spurr e emblocadas por 72h a 60°C.

Após ultramicrotomia, as secções foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 a 80 KV.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção do gene da *polh* do vírus AgMNPV

Uma reação de PCR, com oligonucleotídeos específicos, foi realizada com o DNA purificado do vírus selvagem como descrito no item 3.2. O resultado da amplificação mostrou a presença de um fragmento esperado de aproximadamente 750 pb, em um gel de agarose 0.8% confirmando a amplificação do gene *polh* do baculovírus AgMNPV (figura 18 e tabela 1). O clone recombinante contendo o gene *polh* foi então, sequenciado para confirmação de sua sequência (figura 17).

4.2. Clonagem do gene *polh* no plasmídeo pGEM-T[®] Easy (Promega)

O fragmento obtido por PCR, referente ao gene *polh*, foi clonado no plasmídeo pGEMT[®]- Easy (Promega). Após transformação e amplificação dos clones positivos de pGEMAgPol, o DNA plasmidial foi digerido com *EcoRI*. O resultado obtido, avaliado em gel de agarose 0.8%, corado em brometo de etídeo, demonstrou a correta liberação do inserto de 750 pb referente ao gene *polh* (figura 19).

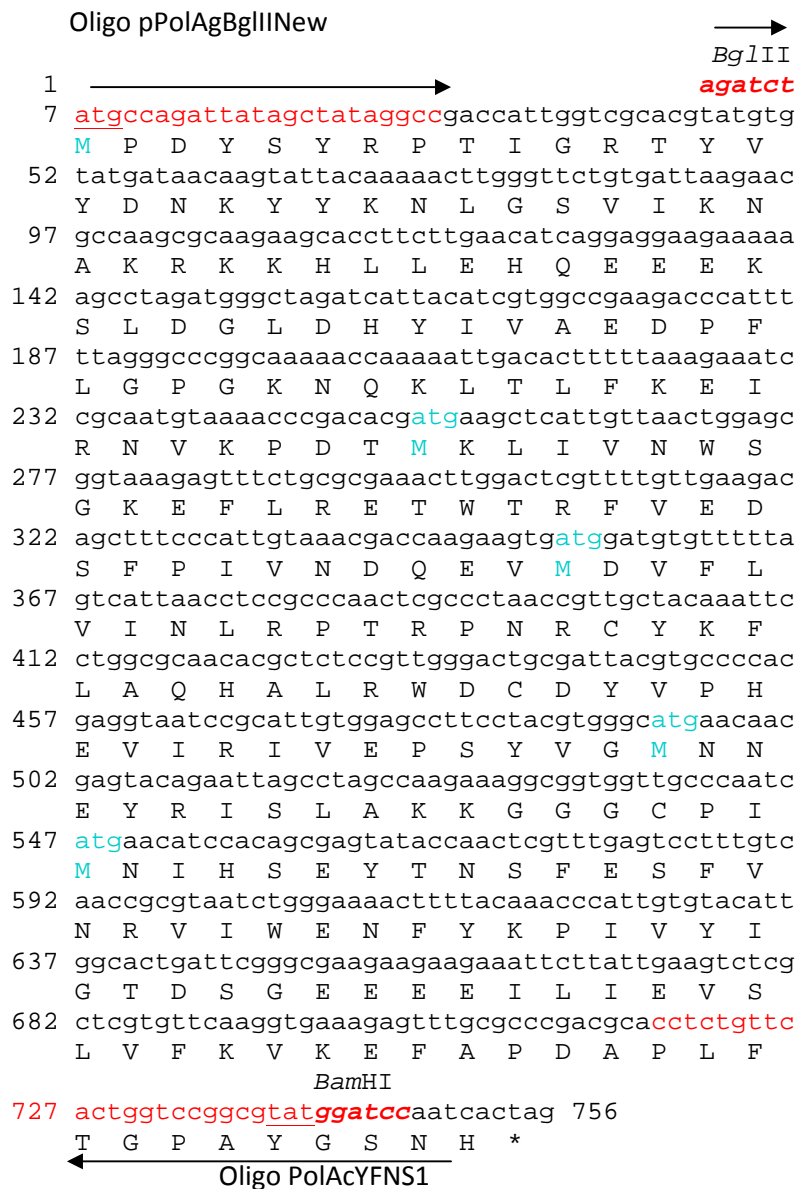


Figura 17. Seqüenciamento da região do gene *polh* do vírus AgMNPV amplificado. As bases realçadas em vermelho representam, respectivamente, a posição dos oligonucleotídeos pPolAgBIIINew e PolAcYFNS1. Os nucleotídeos em negrito representam as modificações nos oligonucleotídeos para introdução dos sítios de restrição *Bgl*II (AGATCT), no primeiro, e *Bam*HI (GGATCC), no oligonucleotídeo reverso. Os nucleotídeos sublinhados representam o sítio de iniciação e de terminação (modificado TAA para TAT para fusão). A direção 5' e 3' dos oligonucleotídeos são indicadas pelas setas.

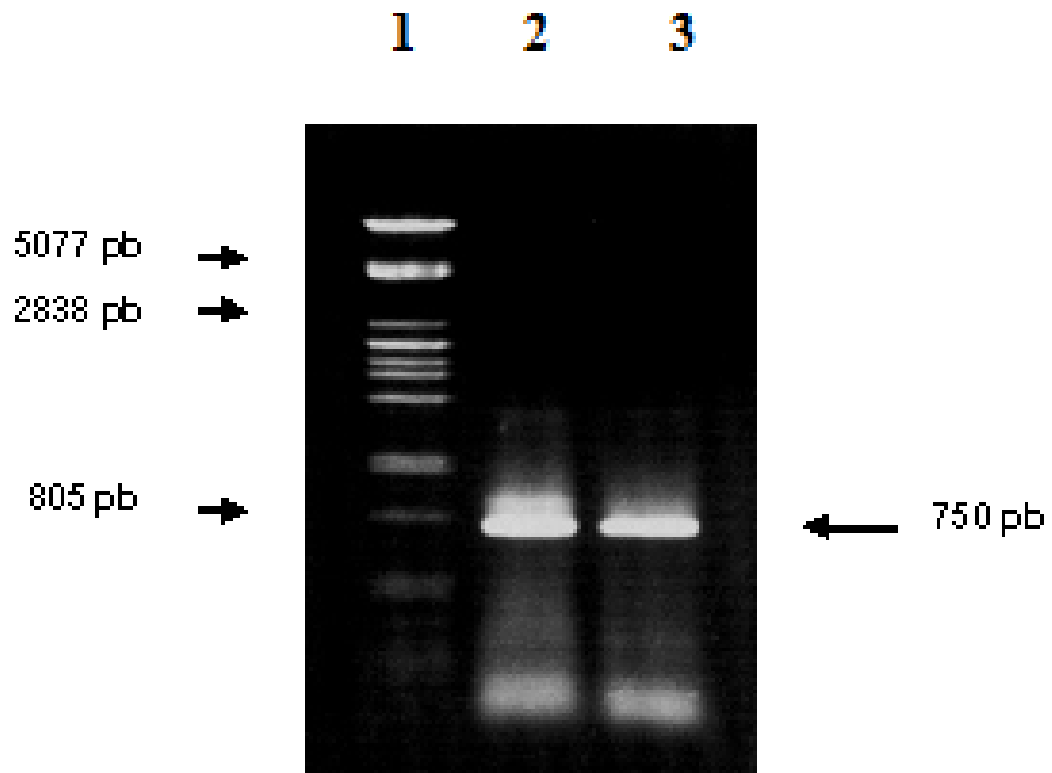


Figura 18. Amplificação do gene *polh* do baculovírus AgMNPV. Eletroforese em gel de agarose 0.8% mostrando o produto da amplificação da PCR (poços 2 e 3). A seta a direita indica os fragmentos referentes ao tamanho do gene *polh*. Poço 1: Marcador (DNA do fago Lambda da Promega digerido com *Pst*I), setas a esquerda mostram o tamanho de algumas bandas do marcador.

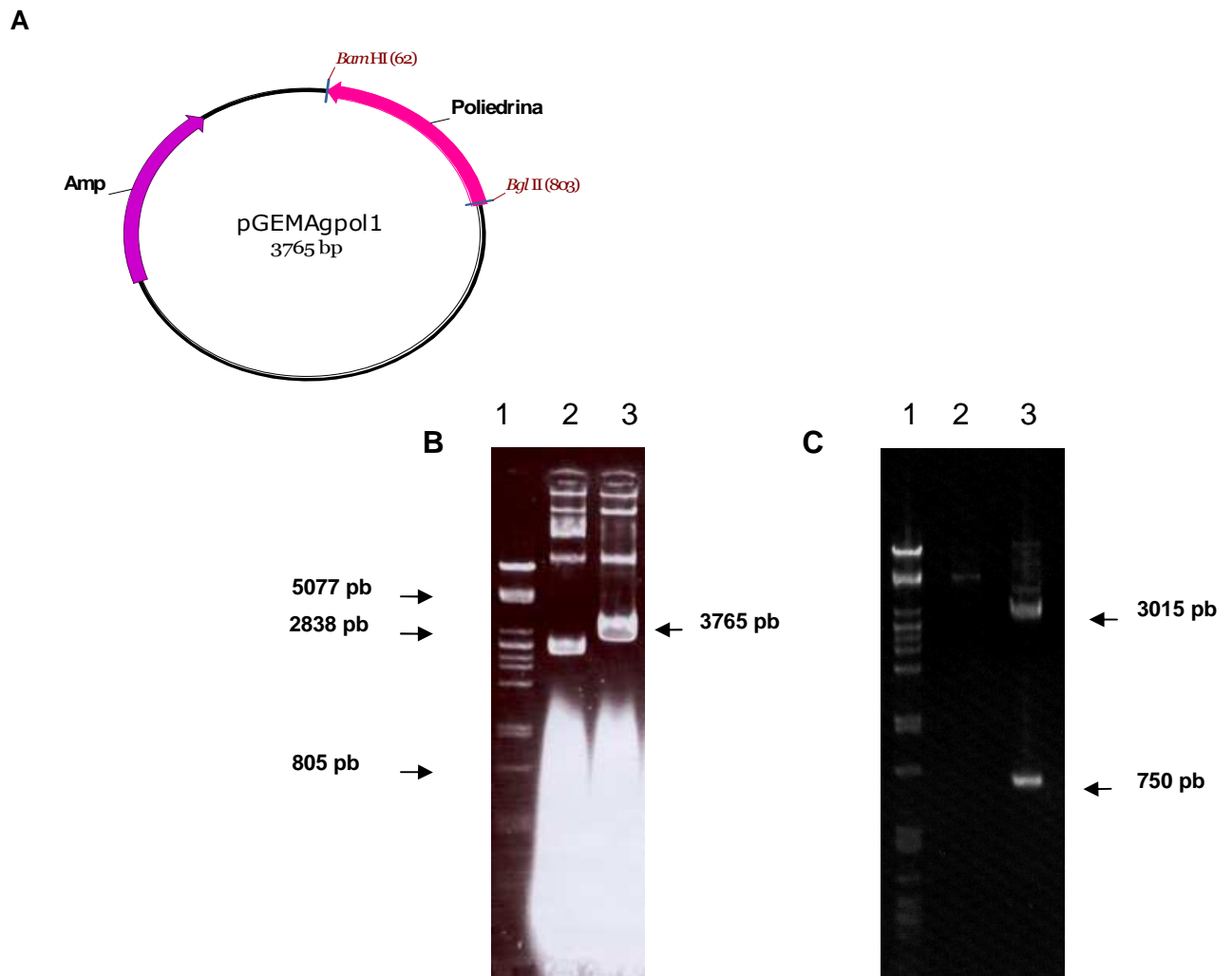


Figura 19. Clonagem do gene *polh* no vetor pGEMT[®]-Easy. A) Esquema mostrando mapa do plasmídeo pGEMAgPol. B) Eletroforese em gel de agarose 0.8%. Poço 1: Marcador (DNA do fago Lambda digerido com *Pst*I), setas à esquerda mostram o tamanho de algumas bandas do marcador. Poço 2: plasmídeo pGEMT[®]-Easy sem o inserto. Poço 3: plasmídeo pGEMAgPol não digerido (setas). C) Eletroforese em gel de agarose 0.8%. Poço 1: Marcador (DNA do fago Lambda digerido com *Pst*I). Poço 2: plasmídeo pGEMAgPol não digerido. Poço 3: plasmídeo pGEMAgPol digerido com *Eco*RI apresentando duas bandas, uma de 3.015 pb referente ao plasmídeo pGEMT[®]- Easy e outra de 750 pb referente ao gene *polh* (setas).

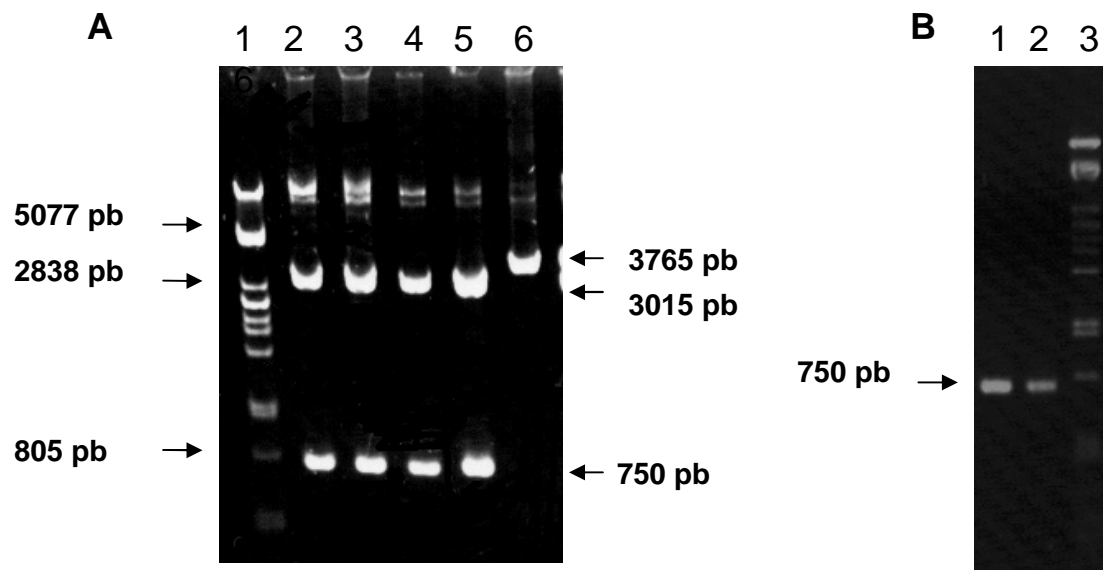


Figura 20. Digestão do plasmídeo pGEMAgPol com as enzimas *Bgl*III e *Bam*HI e eluição do inserto referente ao gene *polh*. A) Eletroforese em gel de agarose 0.8% mostrando no poço 1: Marcador (DNA do fago Lambda digerido com *Pst*I), setas à esquerda mostram o tamanho de algumas bandas do marcador. Poços 2 a 5: plasmídeo pGEMAgPol digerido com *Bgl*III e *Bam*HI, apresentando uma banda de 3.015 pb referente ao plasmídeo pGEMT[®]-Easy e outra banda de 750 pb referente ao gene *polh*. Poço 6: plasmídeo pGEMAgPol não digerido. B) Eletroforese em gel de agarose 0.8% demonstrando a eluição do fragmento referente ao gene *polh*. Poços 1-2: Resultado da eluição do fragmento de 750 pb correspondente ao gene *polh* derivado dos poços 2 a 5 do gel mostrado em A. Poço 3: Marcador (DNA do fago Lambda da Promega digerido com *Pst*I).

4.3. Obtenção do vetor de transferência pFASTAgPol

Para a construção do vetor pFASTAgPol, o plasmídeo pGEMAgPol foi previamente digerido com *Bgl*III e *Bam*HI (figura 20). O inserto liberado, referente ao gene *polh*, foi eluído (figura 20) para ser utilizado na ligação com o plasmídeo pFastBacTM1 (Invitrogen) digerido com *Bam*HI e desfosforilado (figura 21). A confirmação da clonagem foi feita pela amplificação por PCR, utilizando os oligonucleotídeos pPolAgBglIINew e PolAcYFNS1 (tabela 1) (figura 22). E, para a confirmação da correta orientação do inserto, foi realizada uma reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos pPolHF e PolAcYFNS1 (tabela 1) (figura 22). Os resultados obtidos por PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídeo.

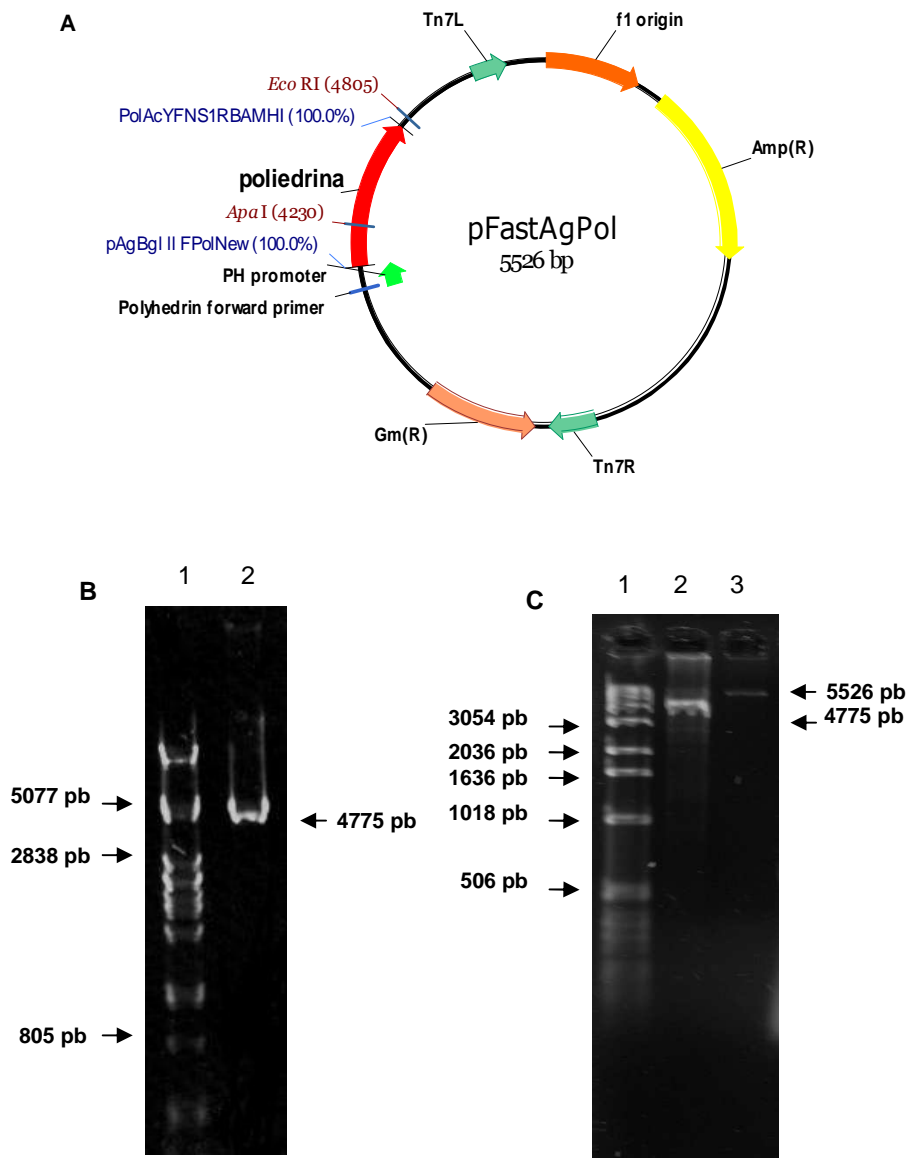


Figura 21. Clonagem do gene *polh* no vetor de transferência pFASTBacTM1 (Invitrogen). A) Esquema mostrando o mapa do plasmídeo pFASTAgPol. B) Eletroforese em gel de agarose 0.8%, mostrando no poço 1: Marcador (DNA do fago Lambda digerido com *Pst*I), setas à esquerda mostram o tamanho de algumas bandas do marcador. Poço 2: plasmídeo pFASTBacTM1 digerido por *Bam*HI e desfosforilado apresentando uma banda de 4.775 pb. C) Eletroforese em gel de agarose 0.8%, mostrando no poço 1: Marcador (1kb DNA Ladder, Invitrogen), setas à esquerda mostram o tamanho de algumas bandas do marcador. Poço 2: plasmídeo pFASTBacTM1 sem o inserto apresentando 4.775 pb. Poço 3: plasmídeo pFASTAgPol apresentando 5.526 pb.

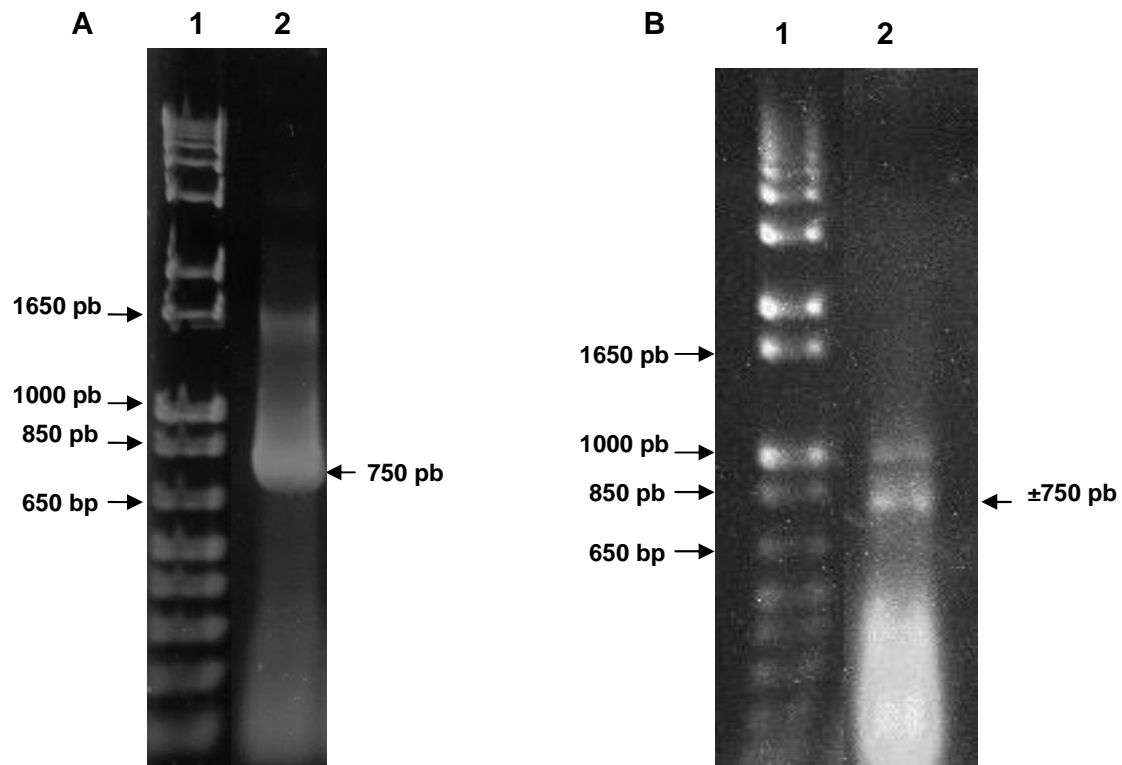


Figura 22. Confirmação da clonagem do gene *polh* no plasmídeo pFASTBacTM₁. A) Eletroforese em gel de agarose 0.8%. Poço 1: Marcador (1kb Plus DNA Ladder – Invitrogen), setas à esquerda mostram o tamanho de algumas bandas do marcador. Poço2: PCR do plasmídeo pFastAgPol utilizando os oligonucleotídeos pPolAgBglIINew e PolAcYFNS1, pode-se observar uma banda de 750 pb referente ao gene *polh*. B) Eletroforese em gel de agarose 0.8%, mostrado no Poço 1: Marcador (1kb DNA Ladder- Invitrogen), setas à esquerda indicam o tamanho de algumas bandas presentes no marcador. Poço 2: PCR do plasmídeo pFastAgPol utilizando os oligonucleotídeos pPolHF e PolAcYFNS1.

4.4. Construção e isolamento do baculovírus recombinante vAcPolAg.

O vetor pFastAgPol deu origem ao vírus recombinante vAcPolAg por transposição, em células de *E.coli* DH10BacTM. Neste evento, o inserto foi transferido do plasmídeo para o genoma de um baculovírus presente na forma plasmidial dentro dessa bactéria (figura 23). A confirmação da inserção do gene *polh*, no bacmídeo, foi realizada por PCR com os

oligonucleotídeos M13F e M13R. A banda referente ao fragmento de aproximadamente 2.975 pb foi visualizada em gel de agarose 0.8% corado em brometo de etídeo (dado não mostrado).

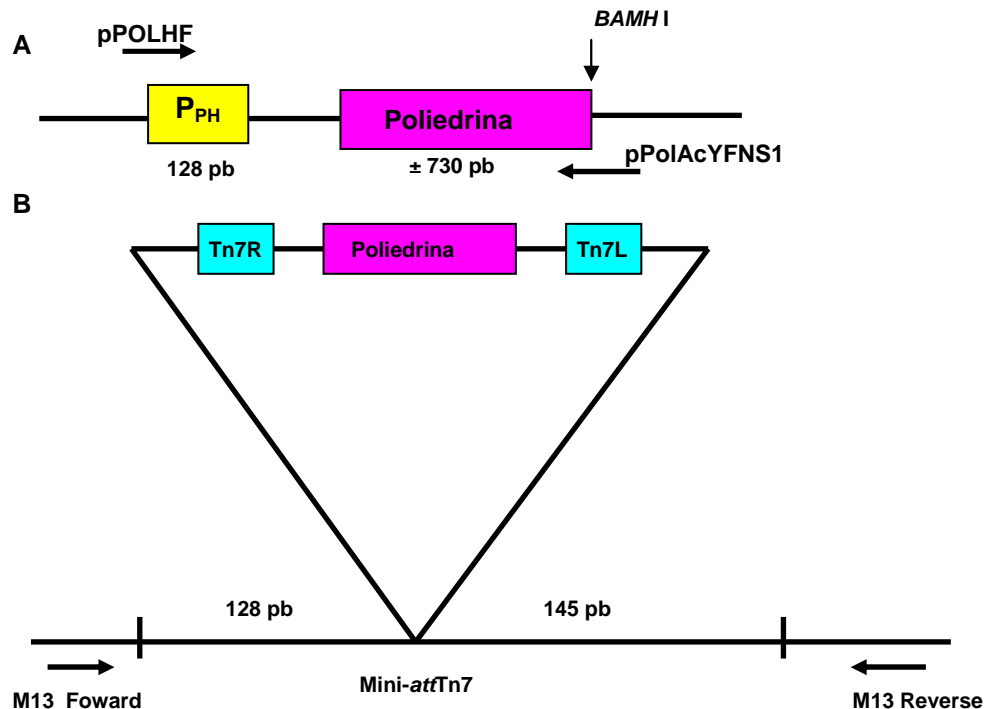


Figura 23. Clonagem do gene *polh* no plasmídeo pFastBac™1 e confirmação da transposição do gene de interesse para o DNA do bacmídeo. A) Esquema mostrando a posição de anelamento dos oligonucleotídeos pPOLHF e PolAcYFNS1 no plasmídeo pFastAgPoL. B) Esquema mostrando a organização no bacmídeo do inserto de interesse, dos oligonucleotídeos M13 e da região de transposição.

O DNA do bacmídeo BacAgPol foi utilizado na transfecção em células *Trichoplusia ni* (BTI-TN5B1-4) para a obtenção do vírus recombinante vAcPolAg. Após três dias de infecção, as células foram analisadas em microscopia de luz invertida para a confirmação da obtenção do vírus recombinante e análise dos possíveis efeitos citopáticos (figura 24).

Por microscopia óptica, observam-se os efeitos citopáticos característicos da infecção por baculovírus como, por exemplo, alteração morfológica (perda da forma típica fusiforme) e núcleo hipertrofiado. Porém, ao contrário do esperado, não foi visualizada a presença de

inclusões proteicas denominadas poliedros como evidência da correta expressão do gene *polh* introduzido.

Para confirmar a presença do inserto no DNA viral, uma reação de PCR com os iniciadores pPolAgBglIINew e PolAcYFNS1R foi efetuada (figura 25). O fragmento obtido correspondeu a aproximadamente 750 pb como o esperado para o gene *polh*.

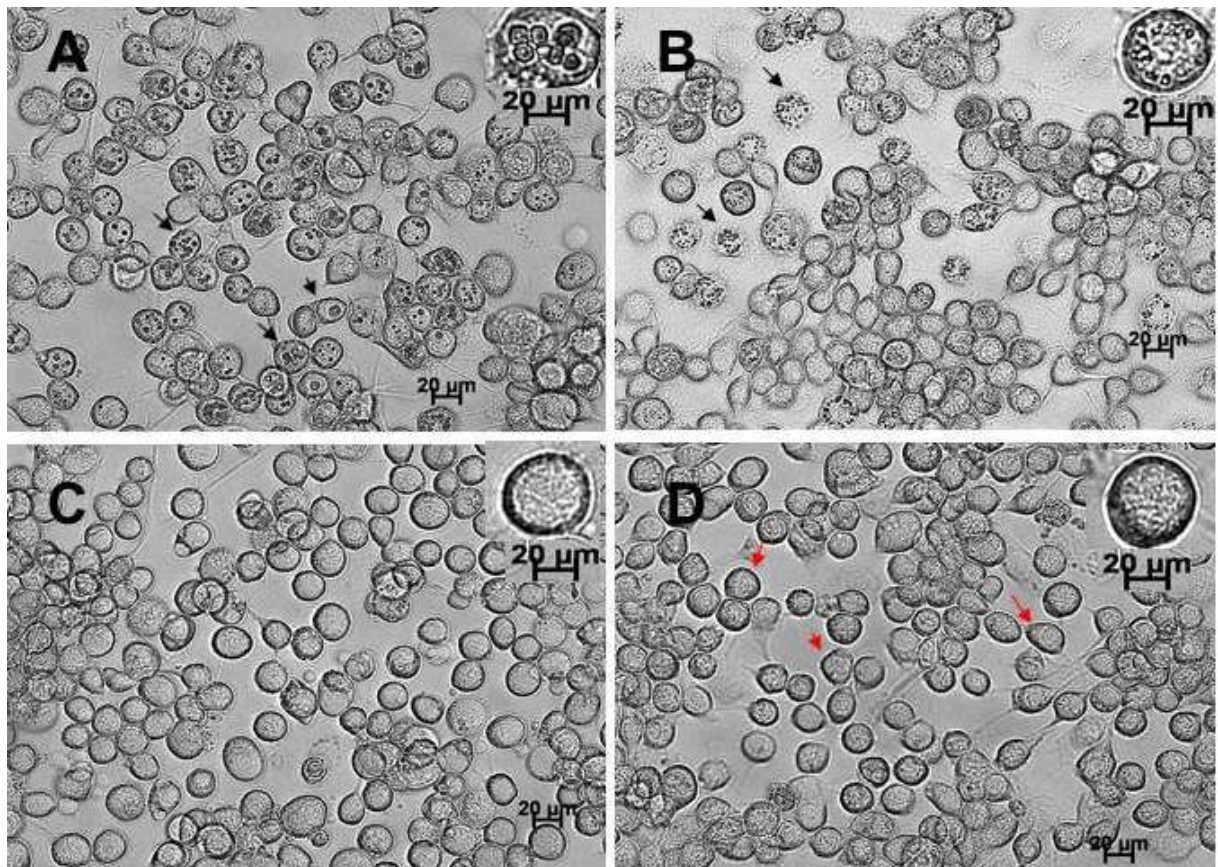


Figura 24. Efeito citopático da infecção de células BTI-TN5B1-4 com diferentes baculovírus a 72h p.i. A) Vírus AcMNPV. B) Vírus vAcPH3. C) Vírus vSynVIgal. D) Vírus recombinante vAcPolAg. As setas pretas indicam os poliedros, efeito citopático típico da infecção baculoviral, e as setas vermelhas apontam a ausência desta característica nas células infectadas pelo recombinante vAcPolAg.

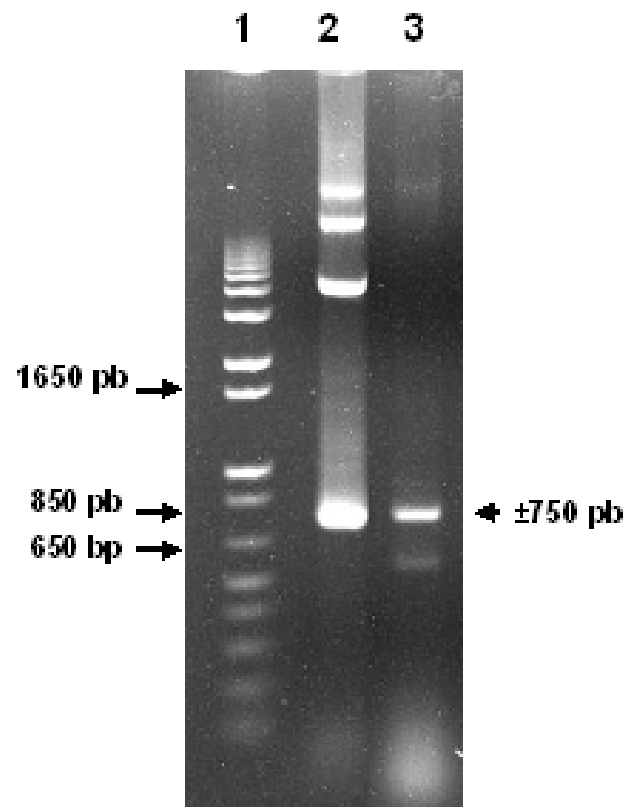


Figura 25. Confirmação da presença do gene *polh* no DNA do vAcPolAg. Eletroforese em gel de agarose 0.8%: poço 1: Marcador (1kb Plus DNA Ladder – Invitrogen), setas à esquerda mostram o tamanho de algumas bandas do marcador; poço 3: PCR do DNA viral vFastAgPol utilizando os oligonucleotídeos pPolAgBglIIINew e PolAcYFNS1, pode-se observar uma banda de 750 pb referente ao gene *polh*.

4.5. Análise da expressão da proteína poliedrina (POLH) ao longo da infecção de baculovírus recombinantes em células de inseto por SDS-PAGE e imunodeteção.

A expressão da proteína recombinante, em células de inseto, foi analisada a 72 h p.i. em células BTI-TN5B1-4, com o vírus vAcPolAg. Para controle, células de inseto também foram infectadas pelo AcMNPV selvagem, vAcPH3 (possui o gene *polh* do AcMNPV selvagem fusionado com a uma cauda de seis histidinas na porção C-terminal e pelo vSynVIgal (não possui o gene da poliedrina).

Extratos das células infectadas foram analisados em SDS-PAGE para a detecção da proteína recombinante POLH. A análise eletroforética demonstrou a presença de um polipeptídeo (ausente na infecção por vSynVIgal e em células não infectadas) com massa molecular em torno de 33kDa nos extrato celulares correspondentes às células infectadas pelos recombinantes vFastAgPol e vAcPH3. Uma banda apresentando cerca de 29kDa, correspondente à POLH selvagem, foi identificada na amostra do vírus selvagem (figura 26).

A imunodeteção foi efetuada com utilizando antisoro de coelho específico para a POLH de AcMNPV. Tanto a poliedrina selvagem quanto as proteínas recombinantes dos vírus vAcPolAg e vAcPH3 foram marcadas na reação. Assim, comprova-se a expressão da proteína POLH recombinante pelo vírus vAcPolAg (figura 27).

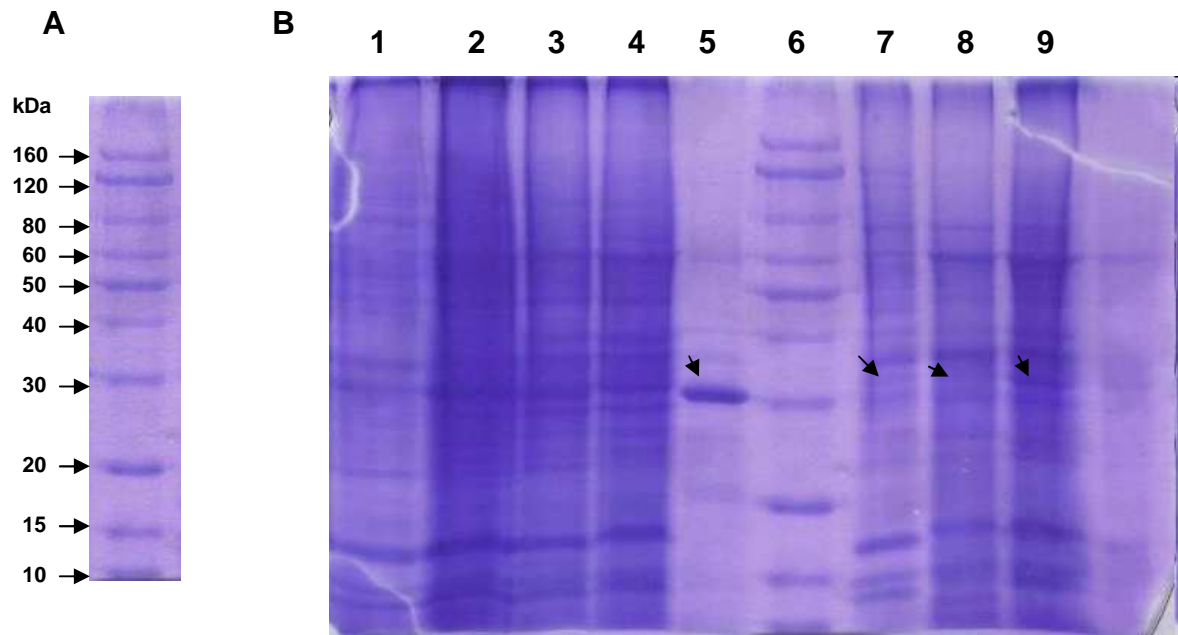


Figura 26. Análise da expressão da proteína recombinante POLH em células de inseto infectadas com o baculovírus recombinante. A) Marcador de massa molecular (BenchMark™ His-tagged Protein Standard-Invitrogen), setas à esquerda mostram o tamanho de algumas bandas do marcador. B) SDS-PAGE a 12%: poço 1- Extrato de células BTI-TN5B1-4 *mock* (não infectadas); poço 2- extrato de células infectadas com vAcPH3; poço 3- extrato de células infectadas com AcMNPV selvagem; poço 4- extrato de células infectadas com vSynVIgal; poço 5- poliedros do vírus selvagem AcMNPV purificados; poço 6- marcador (BenchMark™ His-tagged Protein Standard- Invitrogen); poço 7, 8 e 9- extrato de células infectadas com vAcPolAg. As setas pretas indicam a proteína poliedrina selvagem com 29 kDa (poço 5) e recombinante com 33 kDa (poços 7, 8 e 9).

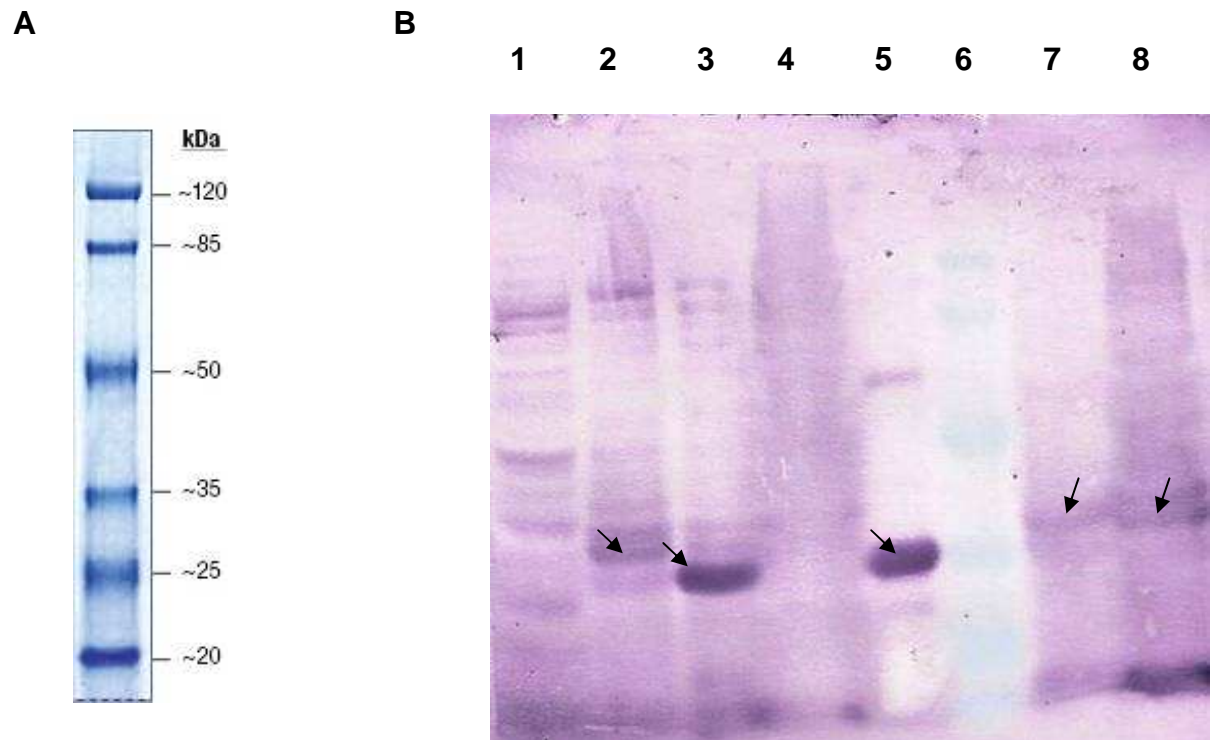


Figura 27. Imunomarcção dos extratos celulares de BTI-TN5B1-4 infectados com o vírus vAcPolAg. A) Marcador de massa molecular (Prestained Protein Molecular Weight - Fermentas). B) Membrana de nitrocelulose marcada com antisoro anti-POLH. Ordem das amostras: poço 1- Extrato de células BTI-TN5B1-4 *mock* ; poço 2- extrato de células infectadas com vAcPH3; poço 3- extrato de células infectadas com AcMNPV selvagem; poço 4- extrato de células infectadas com vSynVIgal; poço 5- poliedros do vírus selvagem AcMNPV purificados; poço 6- marcador (Prestained Protein Molecular Weight - Fermentas); poço 7, 8 - extrato de células infectadas com vAcPolAg. As setas pretas indicam a marcação pelo anticorpo da proteína poliedrina selvagem com 29 kDa (poços 3 e 5) e recombinante com 33 kDa (poços 2, 7, 8).

4.6. Obtenção do gene *env* do vírus da febre amarela

Para obter o gene do envelope da febre amarela, o plasmídeo pSynYFE foi digerido com a enzima *Bg*III liberando um inserto de aproximadamente 1.600 pb referente ao gene *env* (figura 28). O fragmento de DNA foi extraído de um gel de agarose 0,8% (figura 28) e posteriormente clonado no plasmídeo pFastAgPol.

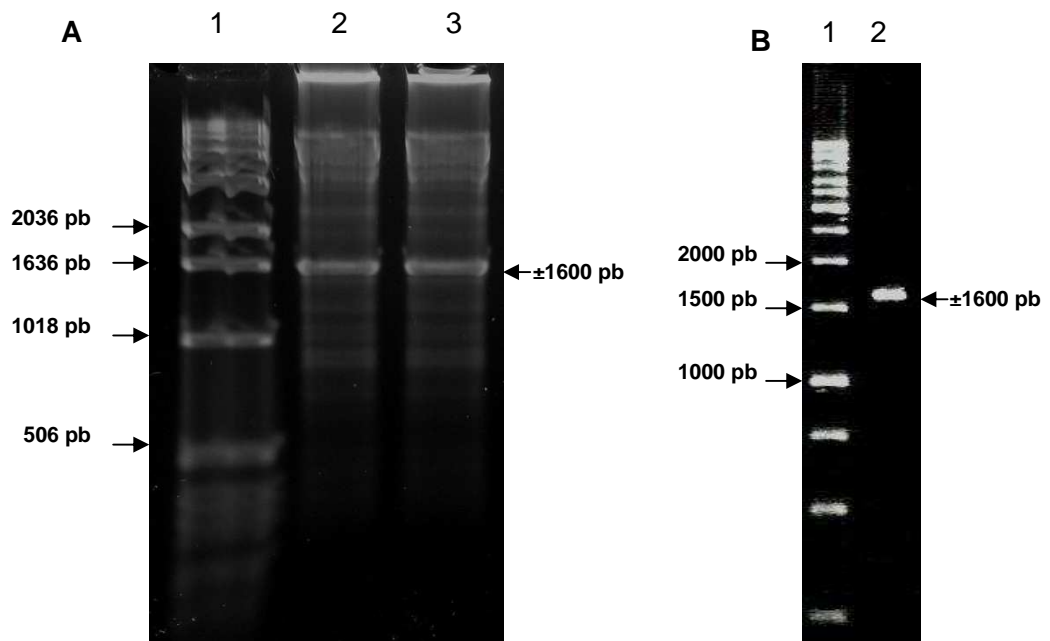


Figura 28. Obtenção do fragmento de DNA contendo o gene *env* da febre amarela. A) Eletroforese em gel de agarose 0.8%, mostrando no poço 1: Marcador (1 kb DNA Ladder- Invitrogen), setas à esquerda sinalizam o tamanho de algumas bandas referentes ao marcador. Poços 2 e 3: plasmídeo pSynYFE digerido com *Bg*III, liberando a banda de 1.600 pb referente ao gene *env*. B) Eletroforese em gel de agarose 0.8%, mostrando no poço 1: Marcador (1 kb DNA ladder – Promega), setas á esquerda indicam o tamanho de algumas bandas do marcador. Poço 2: resultado da eluição do fragmento de 1.600 pb referente ao gene *env*.

4.7. Clonagem do gene *env* no vetor pFastAgPol.

O gene *env* foi inserido no vetor de transferência pFastAgPol, previamente digerido com *Bam*HI e desfosforilado (figura 29). A confirmação da clonagem foi feita por PCR utilizando os oligonucleotídeos YFE2460R e YFE878F (Tabela 1) (figura 30). E, para a confirmação da correta orientação do inserto, foi realizada outra reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos YFE878F e pFASTSeqRev. Os resultados obtidos por PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídeo (figura 30).

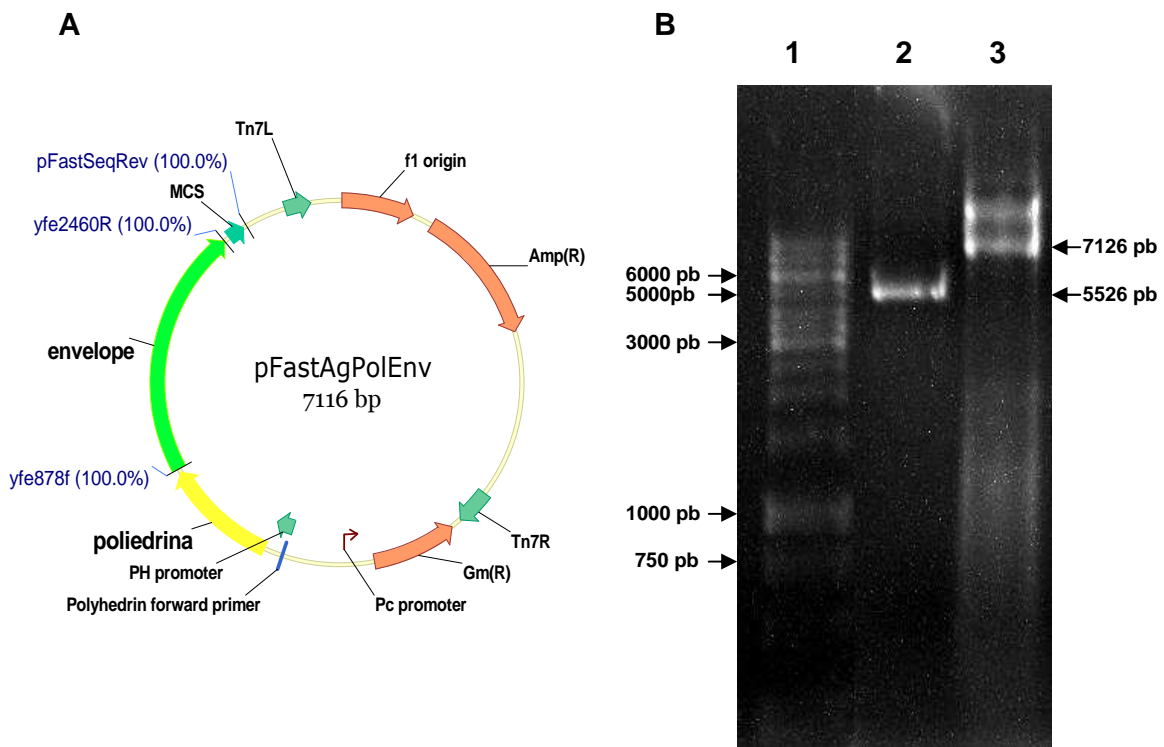


Figura 29. Clonagem do gene *env* no vetor de transferência pFastAgPol. A) Esquema mostrando o mapa do plasmídeo pFASTAgPolEnv. B) Eletroforese em gel de agarose 0.8%, mostrando no poço 1: Marcador 1 Kb GeneRuler™ (Fermentas), setas à esquerda mostram o tamanho de algumas bandas do marcador. Poço 2: plasmídeo pFASTAgPol digerido por *Bam*HI e desfosforilado apresentando uma banda de 5.526 pb. Poço 3: plasmídeo pFASTAgPolEnv apresentando 7.126 pb.

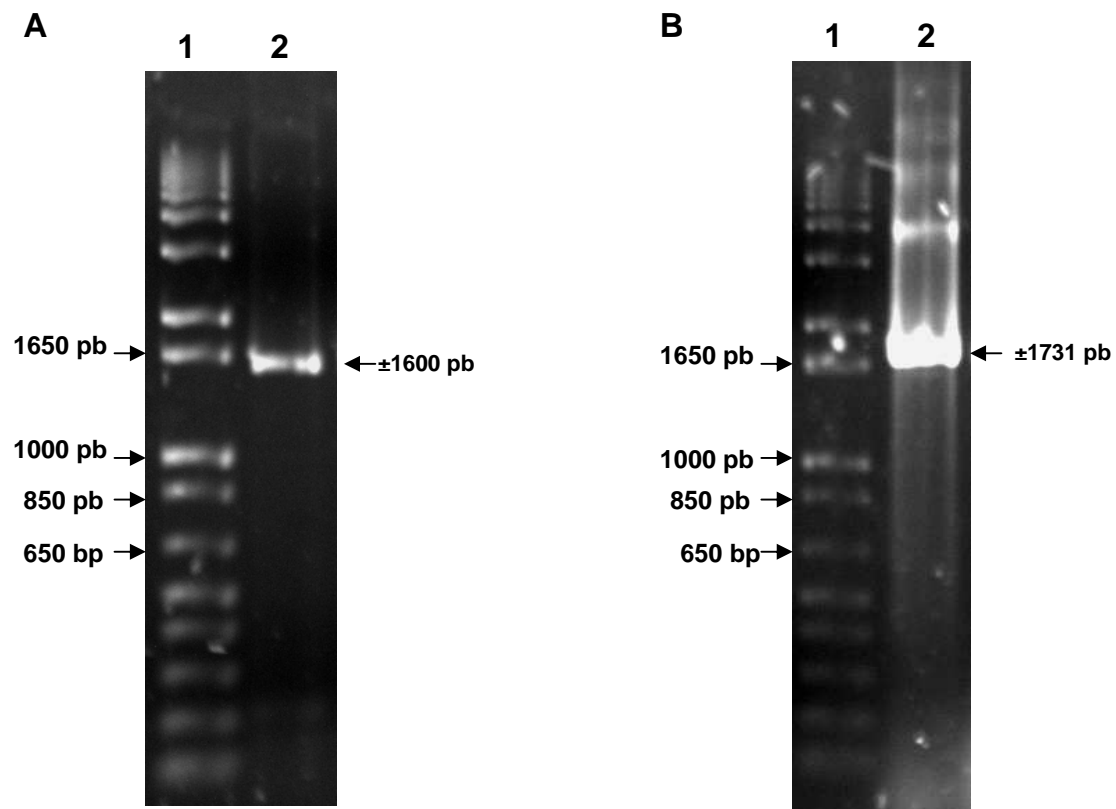


Figura 30. Confirmação da clonagem do gene *env* no plasmídeo pFastAgPol. A) Eletroforese em gel de agarose 0.8%. Poço 1: Marcador (1kb Plus DNA Ladder – Invitrogen), setas à esquerda mostram o tamanho de algumas bandas do marcador. Poço2: PCR do plasmídeo pFastAgPolEnv utilizando os oligonucleotídeos YFE2460R e YFE878F, pode-se observar uma banda de 1.600 pb referente ao gene *env*. B) Eletroforese em gel de agarose 0.8%, mostrado no Poço 1: Marcador (1kb Plus DNA Ladder- Invitrogen), setas á esquerda indicam o tamanho de algumas bandas presentes no marcador. Poço 2: PCR do plasmídeo pFastAgPol utilizando os oligonucleotídeos YFE878F e pFASTSeqRev.

4.8. Construção, por transposição, e isolamento de um baculovírus recombinante contendo o gene *polh* fusionado com o gene *env*.

O plasmídeo pFastAgPolEnv deu origem ao vírus recombinante vAcPolAgEnv por transposição em células de *E.coli* DH10Bac™. O inserto foi transferido do plasmídeo para o genoma de um baculovírus presente na forma plasmidial dentro desta bactéria. A confirmação da inserção do gene *env*, no bacmídeo, foi realizada por PCR com os oligonucleotídeos

YFE878F e M13R (figura 30). A banda referente ao fragmento de aproximadamente 2.362 pb foi visualizada em gel de agarose 0.8% corado em brometo de etídeo (dado não mostrado).

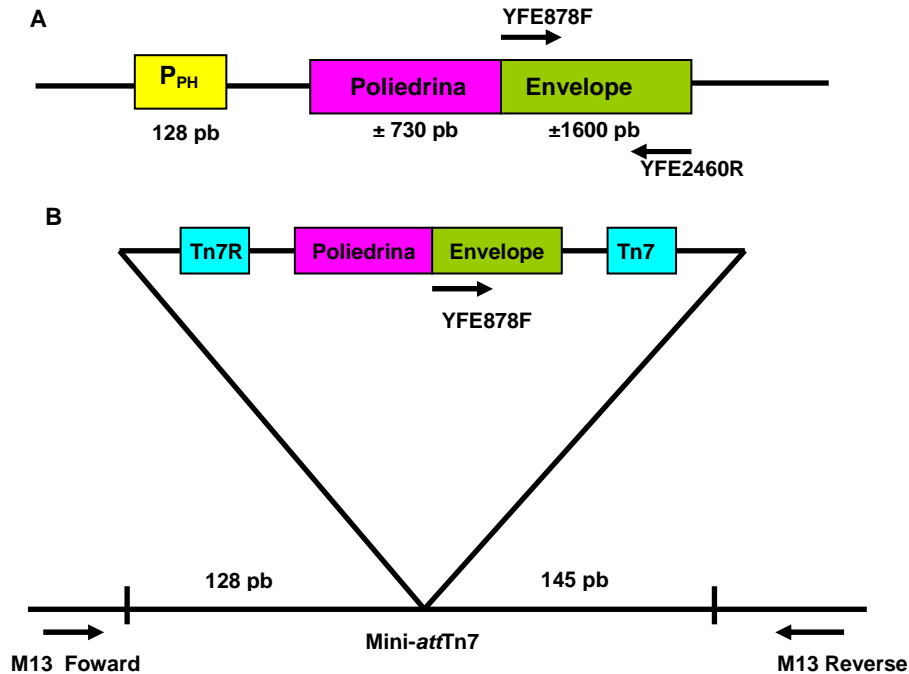


Figura 31. Clonagem do gene *env* no plasmídeo pFastAgPol e confirmação da transposição do gene de interesse para o DNA do bacmídeo. A) Esquema mostrando a posição de anelamento dos oligonucleotídeos YFE878F e YFE2460R no plasmídeo pFastAgPol. B) Esquema mostrando a organização no bacmídeo do inserto de interesse, do oligonucleotídeo M13, do oligonucleotídeo YFE878R e da região de transposição.

O DNA do bacmídeo BacAgPolEnv foi utilizado na transfecção em células *Trichoplusia ni* (BTI-TN5B1-4) para a obtenção do vírus recombinante vAcPolAgEnv. Após três dias de infecção, as células foram analisadas em microscopia de luz invertida para a confirmação da obtenção do vírus recombinante e análise dos possíveis efeitos citopáticos (figura 31).

Pela microscopia óptica, pode-se observar efeitos citopáticos similares correspondentes da infecção do vírus vAcPolAg (ver item 4.4), além da formação de sincícios característicos da infecção pelo vírus amarelo selvagem.

Como uma tentativa de ajudar a formação de poliedros pelo vírus recombinante, foi feita uma co-infecção do vírus vSynYFE com o vírus vAcPolAgEnv. Pode-se observar a formação de sincícios e alguns poliedros devido ao vírus vSynYFE. Porém, não houve um aumento significativo no número de corpos de oclusão que indicasse a recuperação deste fenótipo pelo vírus vAcPolAgEnv

Para confirmar a presença do inserto no DNA viral, uma reação de PCR com os iniciadores YFE878F e YFE2460R foi efetuada (figura 33). O fragmento obtido correspondeu a aproximadamente 1.600 pb como o esperado para o gene *env*.

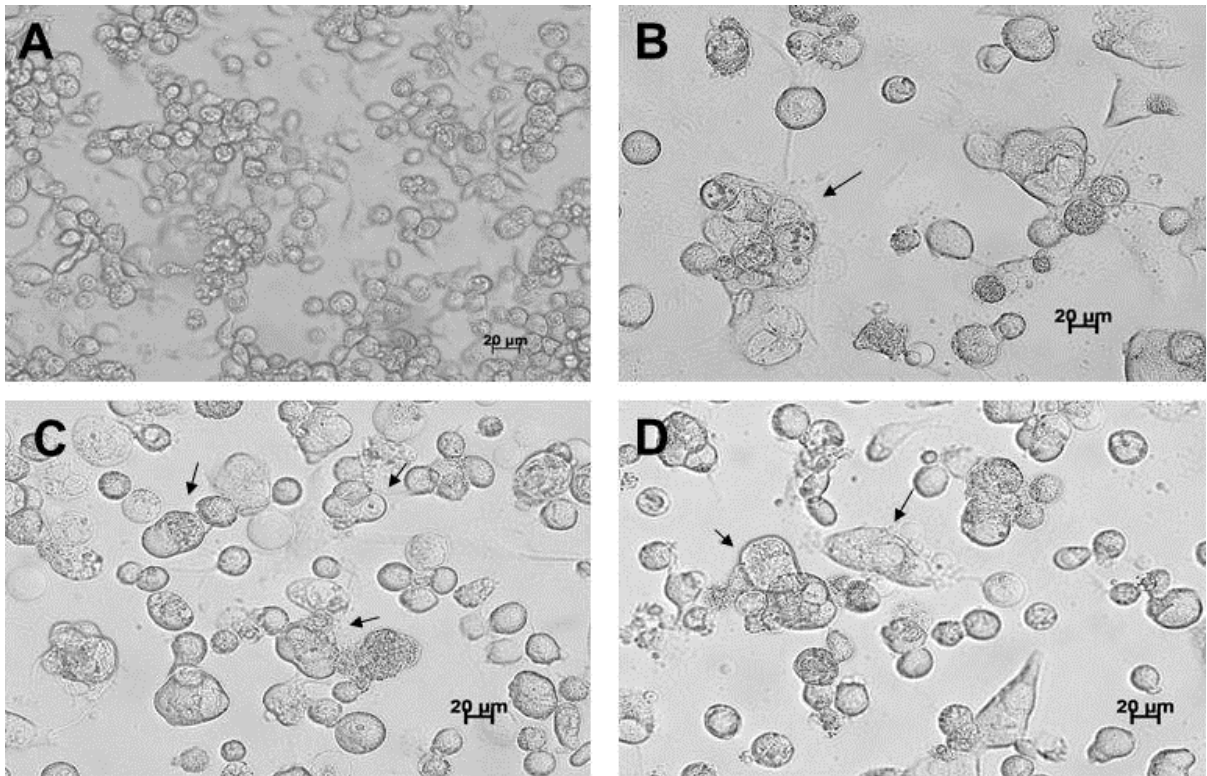


Figura 32. Análise estrutural da infecção de células de inseto por diferentes vírus recombinantes a 72h p.i. A) Células BTI-TN5B1-4 não infectadas (mock). B) Células infectadas pelo vírus vSynYFE. C) Células infectadas pelo vírus vAcPolAgEnv. D) Células co-infectadas pelos vírus vSynYFE e vAcPoAgEnv. As setas pretas indicam a formação dos sincícios, efeito citopático típico da infecção pelo vírus amarelo e causado pela expressão da proteína do envelope.

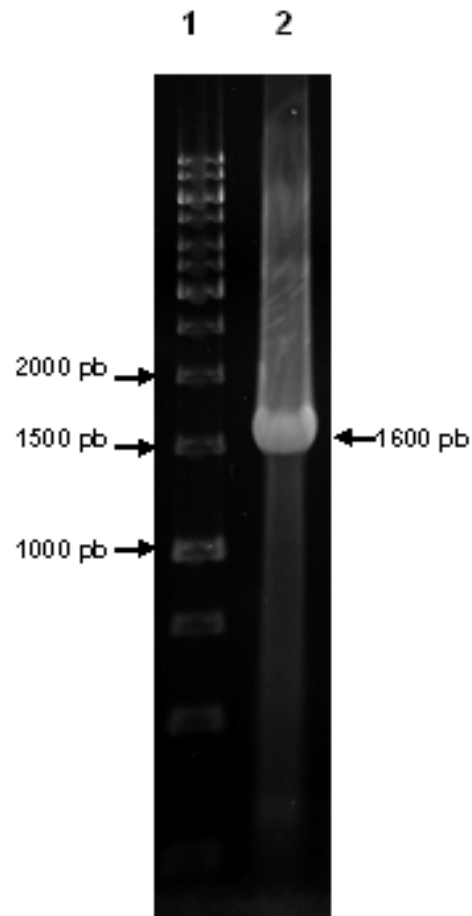


Figura 33. Confirmação da presença do gene *env* no DNA viral. Eletroforese em gel de agarose 0.8%: poço 1: Marcador (1kb DNA Ladder – Invitrogen), setas à esquerda mostram o tamanho de algumas bandas do marcador; poço 2: PCR do DNA viral vAcPolAgEnv utilizando os oligonucleotídeos YFE878F e YFE2460R: pode-se observar uma banda de aproximadamente 1.600 pb referente ao gene *env*.

4.9. Análise da expressão da proteína fusionada (PolEnv) ao longo da infecção de baculovírus recombinantes em células de inseto por SDS-PAGE e imunodeteção.

A expressão da proteína fusionada foi analisada 72 h p.i em células de inseto BTI-TN5B1-4 infectadas com o vírus vAcPolAgEnv. Como controle, as células também foram infectadas pelo vírus recombinante vSynYFE (possui o gene *env* não fusionado com a poliedrina) e co-infectadas pela mistura do vSynYFE com o vAcPolAgEnv.

Extratos das células infectadas foram analisados em SDS-PAGE para a detecção da proteína fusionada PolEnv. A análise eletroforética demonstrou a presença de um polipeptídeo (ausente na infecção pelo controle e em células não infectadas) com massa molecular em torno de 88kDa nos extrato celulares correspondentes as células infectadas pelo recombinante vAcPolEnv. Uma banda apresentando cerca de 50kDa, correspondente à proteína Env, foi identificada na amostra do vírus vSynYFE (figura 34).

A imunodeteção foi realizada pela marcação de células infectadas pelo vírus recombinante com anticorpos monoclonais contra o envelope do vírus da febre amarela. Em um primeiro experimento, foi realizada a técnica de imunodeteção Western Blot, entretanto não ocorreu nenhuma marcação, inclusive pelo controle positivo, vSynYFE (dados não mostrados). Provavelmente, o anticorpo utilizado reconhece a proteína do envelope na sua forma tridimensional *in vivo* sem ser desnaturada.

Em um segundo momento, foi realizada, com o mesmo anticorpo monoclonal, a técnica de imunodeteção por microscopia de fluorescência. Esta metodologia, além de ser mais sensível, permite a análise da proteína *in vivo*, ou seja, sem a necessidade de ser desnaturada. Todas as amostras de células de inseto infectadas analisadas (vSynYFE, co-infecção vSynYFE/vAcPolAgEnv e vAcPolAgEnv) apresentaram marcação positiva contra a

proteína do envelope. Desta maneira, comprova-se que a expressão da proteína fusionada e a sua localização citoplasmática nas células infectadas (figura 35).

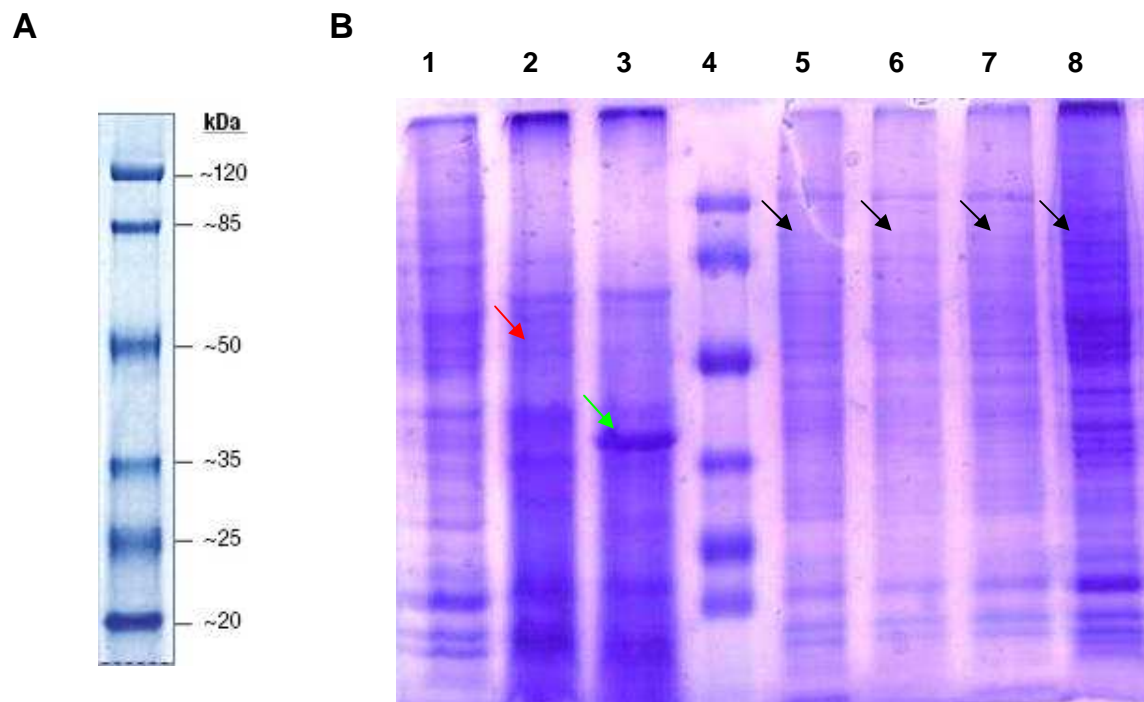


Figura 34. Análise da expressão da proteína recombinante PolhEnv em células de inseto infectadas com o baculovírus recombinante. A) Marcador de massa molecular (Prestained Protein - Fermentas), setas à esquerda mostram o tamanho de algumas bandas do marcador. B) SDS-PAGE a 12%: poço 1- Extrato de células BTI-TN5B1-4 *mock* (não infectadas); poço 2- extrato de células infectadas com vSynYFE ; poço 3- extrato de células infectadas com vAcPH3; poço 4- marcador (Prestained Protein - Fermentas); poço 5, 6 e 7- extrato de células infectadas com vAcPolAgEnv e poço 8- extrato de células infectadas com vSynYFE/vAcPolAgEnv. A seta vermelha indica a proteína do envelope com 50 kDa, a seta verde indicam a proteína poliedrina recombinante e as setas pretas indicam a proteína fusionada PolhEnv com aproximadamente 88 kDa.

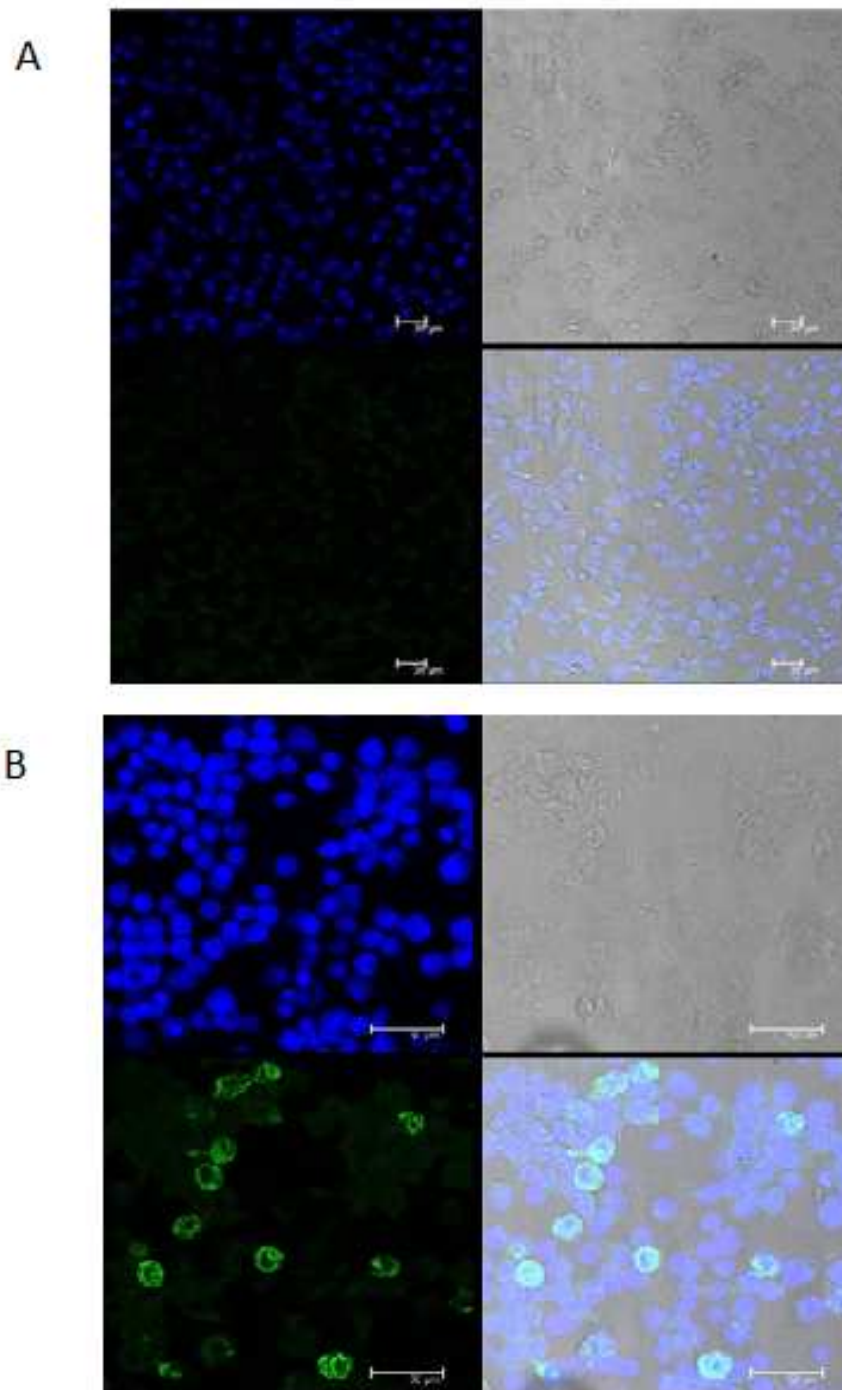


Figura 35. Imunomarcção por microscopia de fluorescência de células de inseto BTI-TN5B1-4 infectadas por diferentes vírus recombinantes às 72h p.i. Na parte direita inferior de cada conjunto de quatro fotos, temos a superposição das imagens obtidas por campo claro, marcação dos núcleos pelo corante DAPI e a marcação da proteica fusionada pelo anticorpo antifebre amarela conjugado com o fluorocromo Alexa 488. A) Células não infectadas; B) Células Infectadas com o vírus vSynYFE;

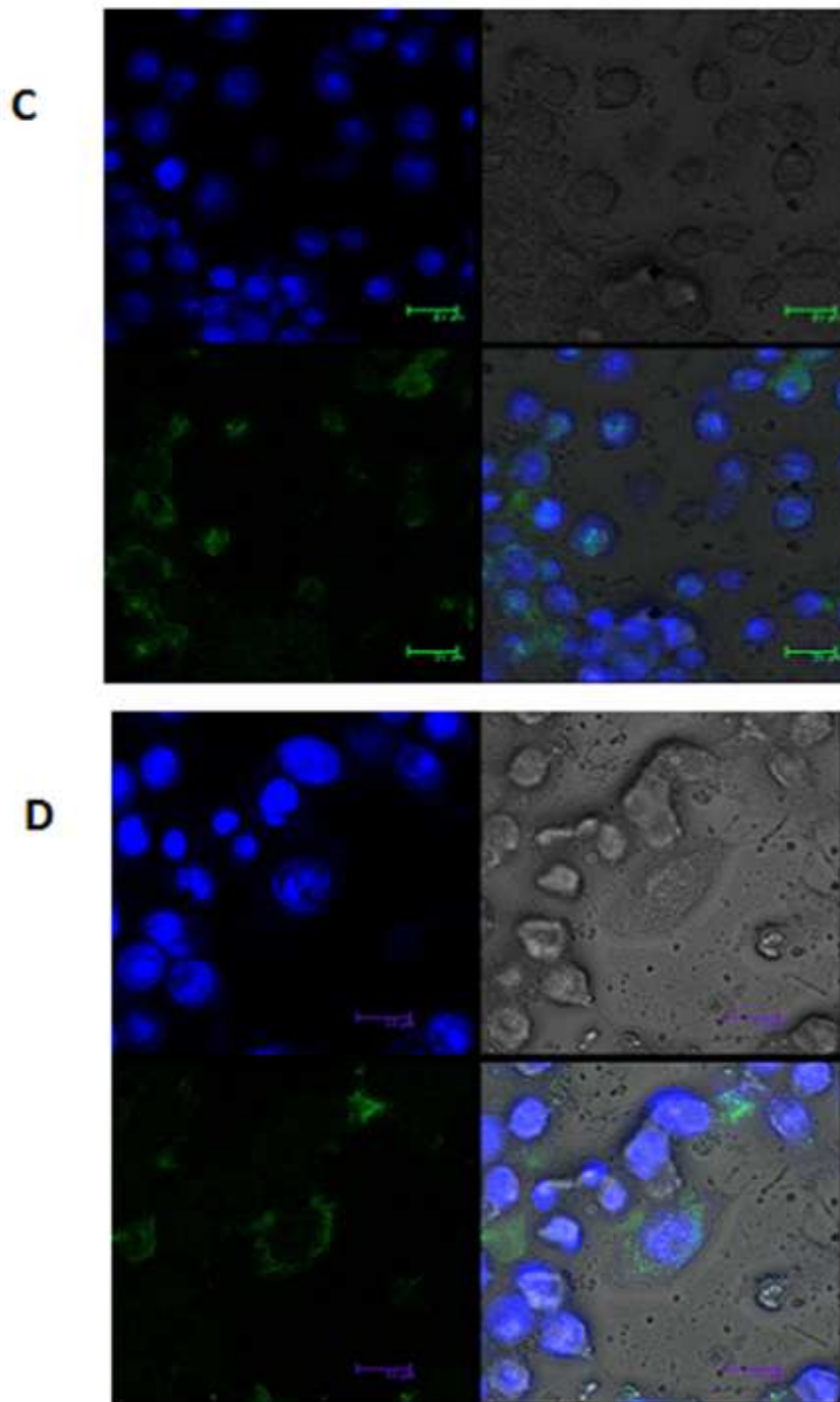


Figura 35. Imunomarcção por microscopia de fluorescência de células de inseto BTI-TN5B1-4 infectadas por diferentes vírus recombinantes às 72h p.i. Na parte direita inferior de cada conjunto de quatro fotos, temos a superposição das imagens obtidas por campo claro, marcação dos núcleos pelo corante DAPI e a marcação da proteica fusionada pelo anticorpo antifebre amarela conjugado com o fluorocromo Alexa 488. C e D) vAcPolAgEnv. Fotos A e B foram gentilmente cedidas por Maria Creuza Barros.

4.10. Análise ultraestrutural de células de inseto infectadas por diferentes baculovírus.

Células BTI-TN5B1-4 infectadas com os vírus vAcPolAg, vAcPolAgEnv, vAcPH3, AcMNPV e vSynYFE; foram fixadas e processadas com 72h p.i para a análise ultraestrutural das células infectadas.

As células infectadas pelos vírus AcMNPV e vAcPH3 apresentam características típicas da infecção baculoviral: núcleo hipertrofiado com estroma virogênico e envelopamento dos nucleocapsídeos para a formação de poliedros (figura 36 B e C). Também ocorre a presença de agregados de P10, proteína fibrilar compactada, tanto no núcleo quanto no citoplasma (figura 36 B e C).

As células infectadas pelo recombinante vAcPolAg apresentam as mesmas características da infecção descritas acima. Entretanto, como já demonstrado pelas análises por microscopia óptica, não ocorre formação de poliedros. Podemos observar possíveis acúmulos de poliedrina nuclear, principalmente nas regiões periféricas do núcleo (figura 36 E e F), com algumas associações dos nucleocapsídeos sem indícios de formação de poliedros.

Quando infectadas com os vírus vSynYFE e vAcPolAgEnv, além dos sinais típicos da infecção baculoviral com a formação de poliedros no primeiro, podemos observar a fusão das membranas plasmáticas de várias células (figura 36 G e H). Essas estruturas multinucleadas são denominadas sincícios e são características da infecção pelo vírus selvagem da febre amarela.

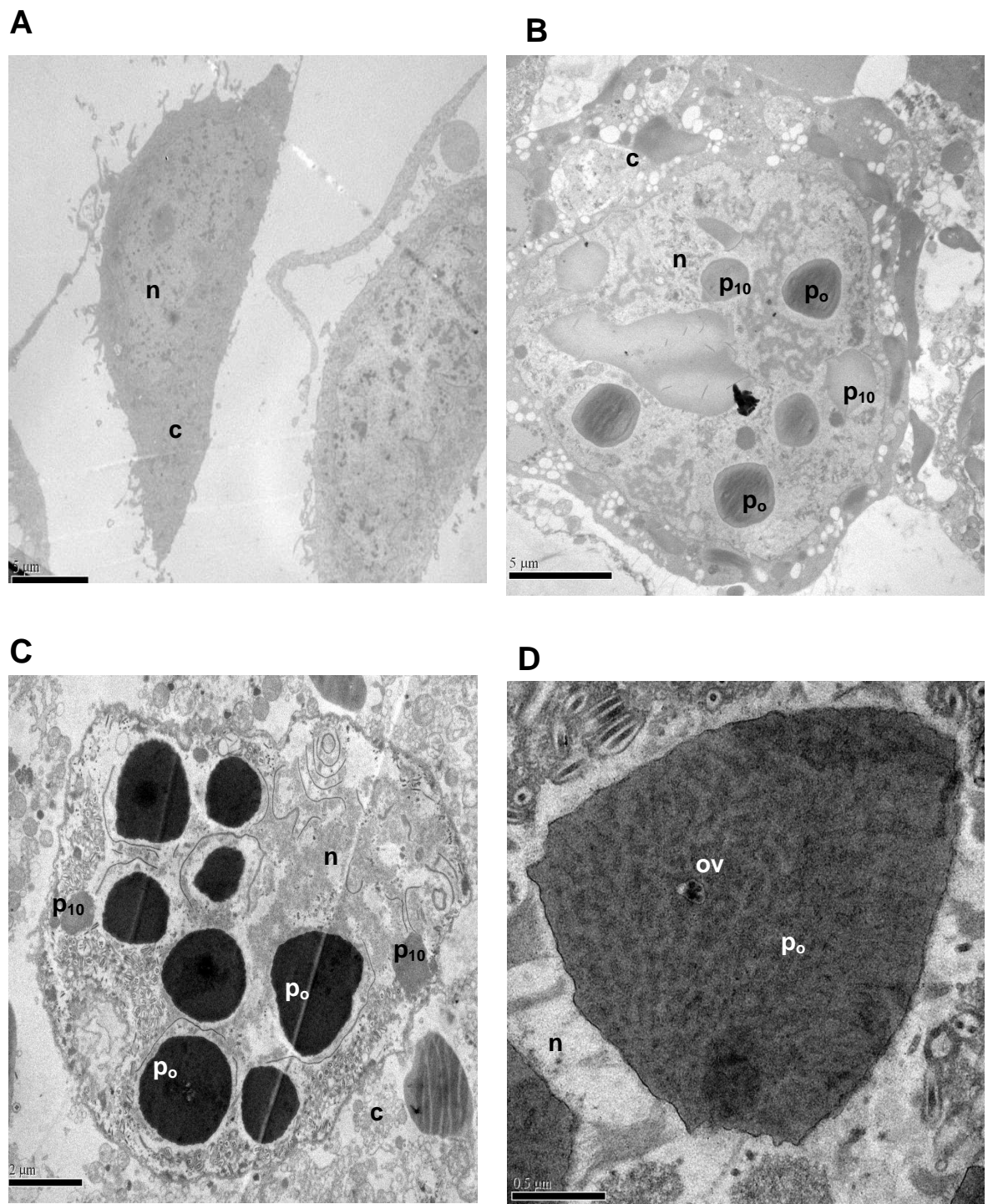


Figura 36. Micrografias eletrônicas de transmissão em células BTI-TN5B1-4, não infectadas (A) e infectadas com o vírus AcMNPV (B), vAcPH3 (C e D).

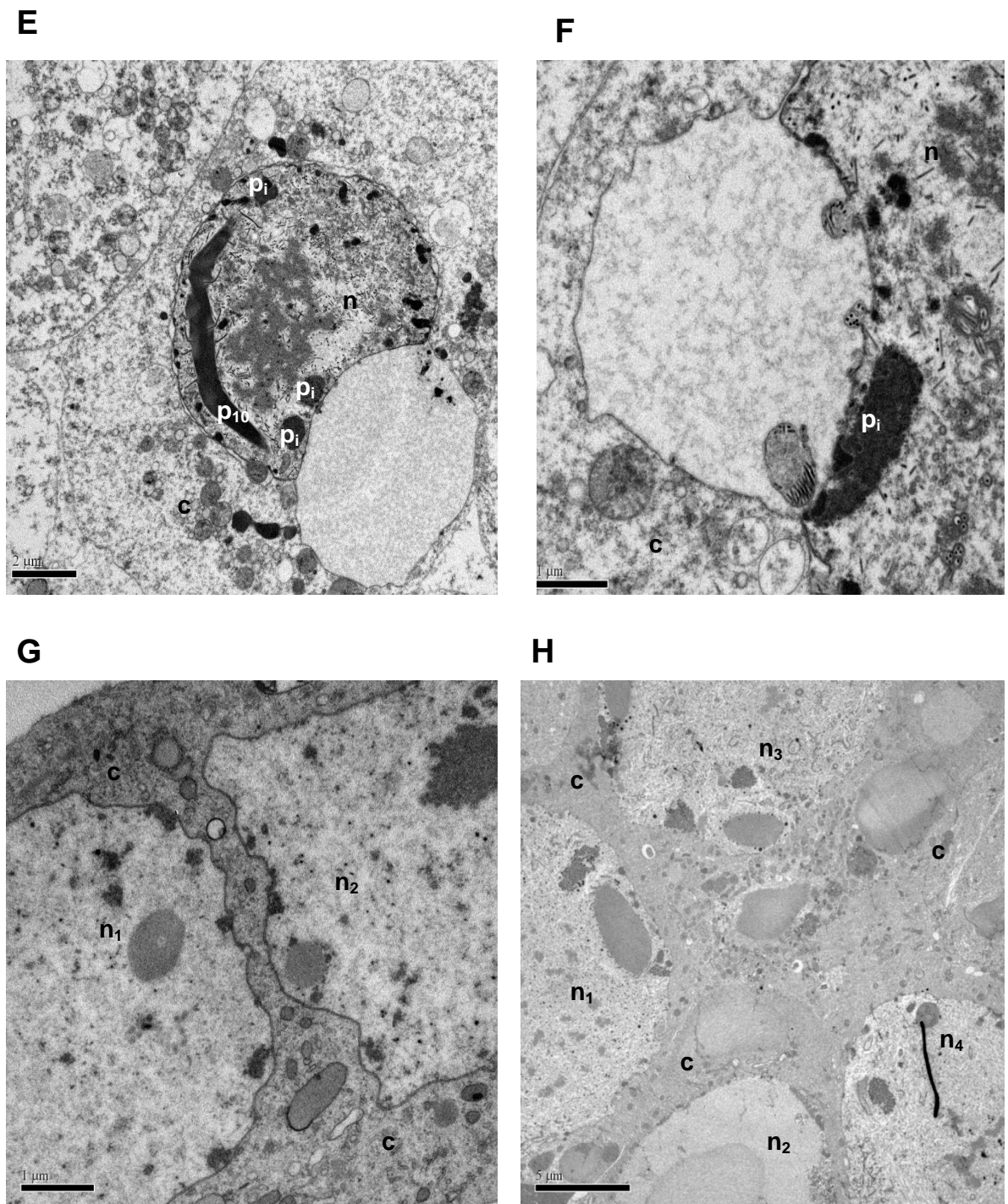


Figura 36. Micrografias eletrônicas de transmissão em células BTI-TN5B1-4. vAcPolAg (E e F); vSynYFE (G) e vAcPolAgEnv (H). **n**, núcleo (**n**₁ núcleo 1, **n**₂ núcleo 2, **n**₃ núcleo 3 e **n**₄ núcleo 4); **c**, citoplasma; **p**_o, poliedro; **p**_i, poliedrina e **p**₁₀, P10. Barras equivalem a 5 μm, em A, B e H; 2 μm, em C e E; 0,5 μm, em D e 1 μm em F e G. Foto G foi gentilmente cedida por Maria Creuza Barros.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram construídos dois baculovírus recombinantes: o vAcPolAg, que apresenta o gene da proteína poliedrina do vírus AgMNPV, contendo um sítio de restrição para a enzima *Bam*HI substituindo o códon de terminação do gene, o que faz com que a proteína poliedrina adquira 41 aminoácidos a mais na sua porção C-terminal, e o vAcPolAgEnv que possui, fusionado ao gene da poliedrina do AgMNPV, o gene da proteína do envelope da vírus da Febre Amarela.

A construção do vírus vAcPolAg foi concluída com sucesso. Porém, ao contrário do esperado, a proteína poliedrina recombinante, apesar de não possuir nenhuma modificação na sua seqüência gênica (figura 17) e ser corretamente expressa (ver item 4.5), foi incapaz de produzir os corpos de oclusão (poliedros). Costa (2008), também construiu um baculovírus recombinante derivado do AcMNPV (vAcPH3) contendo uma poliedrina modificada na porção C-terminal (adição de seis histidinas). Esse vírus recombinante, ao contrário do produzido neste trabalho, é capaz de formar os corpos de oclusão.

Uma das hipóteses para a ausência dos poliedros no vírus vAcPolAg é que, ao modificar o sítio de terminação da poliedrina para a introdução do sítio de fusão, foram adicionados 41 aminoácidos no C-terminal. Cinquenta e um por cento (4 Glicinas, 6 Alaninas, 1 Isoleucina, 1 Prolina, 3 Triptofanos, 3 Leucinas, 2 Valinas e 1 Fenilalanina) desses aminoácidos são apolares, ou seja, possuem como característica uma natureza hidrofóbica, por isso tendem a se agrupar no interior da proteína e podem desestruturar a formação tridimensional original impedindo a formação do poliedro. Os outros 50% correspondem a 10 aminoácidos polares (4 Argininas, 4 Ác. Glutâmicos e 2 Lisinas) e 10 aminoácidos neutros (6 Serinas, 1 Glutamina, 2 Lisinas e 1 Tirosina). Como sugerido por X *et al.*, (2010), alterações

no corpo proteico (região β -barril) (64- 232 aa) e no C-terminal (233-245 aa) que contém 13 resíduos altamente conservados tendem a dificultar a formação do corpo de oclusão.

Brown *et al.* (1980), isolou dois baculovírus mutantes que formam apenas um grande corpo de oclusão cuboidal por célula infectada. Esses vírus foram obtidos a partir da infecção viral do AcMNPV tratada com o agente mutagênico N-metil-N'-nitro-N-nitrosaguanidina. A estrutura paracristalina dos mutantes é similar à do selvagem, entretanto vírus oclusos no poliedro são raramente encontrados levando a uma baixa infectividade viral. Carstens *et al.*, (1986), analisou um dos mutantes descritos acima e detectou que a alteração fenotípica é devido a uma mutação pontual no gene da poliedrina. Esta mutação causa a substituição do aminoácido leucina pela prolina na posição 58. Em 1987, Carstens *et al.*, também caracterizou outra mutação no gene da poliedrina de um mutante derivado do AcMNPV incapaz de formar inclusões cristalinas. Este vírus mutante apresenta minúsculas partículas dispersas no núcleo e, provavelmente, este fenótipo é resultado da substituição do aminoácido fenilalanina pela leucina na posição 84.

Cheng *et al.* (1998), criando mutações sítio dirigidas por PCR comprovou a importância da sequência do gene da poliedrina do baculovírus ThorNPV. Ao substituir o gene *polh* do vírus AcMNPV pelo o do ThorNPV com a leucina da posição 58 modificada, observou-se a formação de poliedros maiores que o do vírus parental selvagem. Katsuma *et al.* (1999), caracterizou diversos *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV) mutantes para o gene da poliedrina . Foi constatado que mutações pontuais ao longo da poliedrina podem gerar corpos de oclusão similares ao selvagem, porém com poucos ou nenhum vírus oclusos; massas proteicas dispersas no citoplasma e no núcleo; e corpos de oclusão pequenos ou com formas irregulares. Ribeiro *et al.* (2009), isolou um baculovírus mutante derivado do AcMNPV, que devido á uma modificação pontual na sequência de aminoácidos do gene da poliedrina, é incapaz de produzir corpos de oclusão. A substituição de uma guanina por timina

no nucleotídeo + 352 levou a troca do aminoácido valina pelo aminoácido fenilalanina. Ao invés da formação dos poliedros no núcleo, uma massa proteica é encontrada dispersa no citoplasma e no núcleo de células infectadas.

Todos os trabalhos descritos acima estão de acordo com a ideia de que a formação dos poliedros depende da interação da proteína poliedrina com outras proteínas virais presentes no envelope viral, da sua interação com outras proteínas do hospedeiro, mas também da própria sequência de aminoácidos. Ou seja, as interações entre as moléculas que compõe esta proteína são fundamentais para a organização e formação da estrutura proteica.

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), construiu 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. Chang *et al.* (2003), utilizando o plasmídeo pColorPol descrito em Je *et al.*, (2003), construiu e caracterizou um recombinante do baculovírus AcMNPV que produz uma poliedrina fusionada à porção N-terminal tóxica da proteína Cry1Ac. O recombinante demonstrou possuir uma maior patogenicidade com um aumento significativo na velocidade de ação do vírus (mortalidade do hospedeiro) quando comparado com a estirpe selvagem ou com qualquer outro recombinante já descrito para o AcMNPV.

Rocha (2008), também fusionou o gene da poliedrina de AcMNPV com os genes codificantes das capas proteicas do *Leek yellow stripe virus* (LYSV) e de *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV). As proteínas de fusão obtidas também foram expressas em células de inseto e detectadas por anticorpos específicos para a poliedrina e para a cauda de histidina. Entretanto, apenas a proteína do vírus GarMbFV foi capaz de produzir corpos de

oclusão. Com o mesmo vetor de expressão (pFastPH3), Ribeiro (2008), 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. Rodrigues (2010), expressou o gene da capa proteica do vírus Citrus sudden death-associated virus (CSDaV), possível causador da morte súbita dos citros, também no vetor pFastPH3. Esta proteína também foi efetivamente expressa, produzindo corpos de oclusão e sendo detectada com o mesmo anticorpo para a cauda de histidina.

A febre amarela encontra-se controlada em muitos países que possuem um programa de vacinação. Entretanto, a ocorrência de surtos urbanos esporádicos na África demonstra que o risco do reaparecimento da doença, como epidemia, é alto. Devido às reações cruzadas com outros flavivírus que possuem semelhança antigênica, em especial o vírus da dengue, um diagnóstico diferencial seguro torna-se extremamente necessário.

Utilizar proteínas recombinantes, como a proteína fusionada expressa pelo vírus vAcPolAgEnv para a interação antígeno-específico poderá tornar o diagnóstico mais seguro e direcionado, evitando o gasto excessivo com teste inespecíficos. Saijo *et al.* (2007), utilizou o sistema da expressão em baculovírus para produzir a ribonucleoproteína do vírus Lassa, causador da febre hemorrágica Lassa. Esta proteína recombinante foi usada como antígeno na detecção de anticorpos contra o vírus selvagem e como imunógeno para a produção de anticorpos monoclonais. Os métodos de diagnóstico ELISA e IIFA (ensaio indireto de imunofluorescência) foram desenvolvidos com o uso do antígeno recombinante. Os anticorpos monoclonais contra a ribonucleoproteína produzidos também foram utilizados e reconhecidos pelo teste ELISA. Estes resultados são uma alternativa para métodos de diagnósticos sem a manipulação direta de vírus infecciosos e com alto grau de transmissão como Lassa vírus.

Além de sua importância para o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico diferencial, as proteínas recombinantes com partes antigênicas virais podem ser uma solução para o aumento na biossegurança de muitas vacinas que utilizam vírus atenuados. Tanto a vacina 17D quanto 17D-24, ambas utilizadas para combater a febre amarela, são desenvolvidas a partir de uma linhagem viral atenuada e, dessa forma, pessoas com o sistema imune comprometido, gestantes e crianças recém-nascidas não podem ser vacinadas. Além disso, já foram reportados casos do desenvolvimento da doença em adultos saudáveis. Bonafé *et al.* (2009), expressou via baculovírus o antígeno da proteína do envelope truncada do vírus do Oeste do Nilo (West Nile virus), também pertencente ao gênero dos flavivírus. A proteína recombinante expressa em culturas de células de inseto foi capaz de induzir a neutralização viral por anticorpos em múltiplas espécies animais e de proteger imunologicamente duas espécies de roedores. Esse antígeno recombinante é um promissor candidato a ser usado como vacina.

Zhang *et al.*, (1988), utilizando 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 proteicos exibiram um baixo título de anticorpos contra as proteínas pré-mebrana, do envelope e NS1.

Shiu *et al.*, (1991), construiu um baculovírus recombinante contendo um fragmento de DNA com os genes da proteína de membrana e do envelope do vírus atenuado da febre amarela 17D utilizado na produção da vacina. Células de *Spodoptera frugiperda* infectadas com o recombinante foram capazes expressar uma proteína de tamanho equivalente ao esperado pelo tamanho do inserto e outro fragmento proteico correspondente a proteína do envelope. Ensaios de imunofluorescência com anticorpos monoclonais contra a Proteína E

demonstrou que a proteína recombinante é encontrada tanto no interior quanto na superfície celular, sendo antigenicamente indistinguível da proteína do E do vírus 17-D.

Desprès *et al.*, (1991), também utilizando o sistema baculoviral, expressou os antígenos virais da Proteína E e do NS1 sozinhas e fusionadas. 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.

Outros sistemas de expressão proteica como os baseados em células bacterianas e de mamíferos vem sendo utilizados para o estudo das proteínas do gênero Flavivírus. Chen *et al.* (2009), utilizou um vetor de expressão procarioto para estudar o papel das proteínas estruturais do vírus da encefalite japonesa. Após a purificação das proteínas recombinantes e adição em macrófagos para análise das respostas inflamatórias, pôde-se observar que apenas as proteínas formadoras do nucleocapsídeo sem o envelope são capazes de regular mediadores do processo inflamatório desempenhando um importante papel nos estágios iniciais de infecção viral.

XL *et al.* (2009), com o objetivo de analisar as similaridades e diferenças nos epítomos da Proteína E dos vírus causadores da dengue dos sorotipos 1 a 4, da encefalite japonesa e da febre amarela, expressou em *E. coli* seis epítomos específicos. Além da correta expressão, dois antígenos característicos do vírus da dengue tipo 1 e do tipo 2 foram confirmados por Western Blot. Wang *et al.*, (2009), produziu, de maneira eficiente em célula HeLa estáveis, subpartículas recombinantes contendo as proteína prM e E todos os sorotipos do vírus da dengue. Este estudo demonstrou que a utilização de células estáveis é segura e também pode ajudar nas pesquisas de desenvolvimento de vacinas e drogas contra a dengue.

Um vírus vaccinia recombinante foi produzido por Zhao *et al.*, em 1987, codificando três proteínas estruturais e duas proteínas não estruturais do vírus da dengue tipo 4. As

proteínas estruturais recombinantes exibiram a mesma massa molecular e padrões de glicosilação encontrados nas proteínas selvagens. Porém, camundongos infectados com o vírus construído não demonstraram resposta imunológica contra as proteínas pré-membrana e do envelope. Provavelmente, o baixo nível de expressão foi a razão para a limitada resposta sorológica destes antígenos. Putnak & Schlesinger, (1990), para estudar a possibilidade de incorporação da proteína NS1 em possíveis vacinas, também construíram um vírus vaccinia recombinante contendo toda a região o C-terminal da proteína do envelope até o N-terminal da proteína não estrutura NS3 do vírus amarelíco 17D. Tanto o recombinante proteico NS1 quanto o nativo foram detectados na superfície de células infectadas. Camundongos imunizados com o vírus recombinante foram capazes de produzir anticorpos não neutralizantes, estimular a resposta do sistema complemento e conferir proteção parcial contra a inoculação intracerebral do vírus 17D.

Sugrue *et al.*, (1997), expressou, em *Pichia pastoris*, o cDNA das proteínas estruturais do vírus da dengue. A proteína recombinante E foi corretamente expressa em levedura com a adição de pequenas cadeias de manose. Também foram observadas partículas esféricas similares aos vírions da dengue. Essas partículas tiveram atividade imunogênica em animais e capazes de induzir a neutralização de anticorpos.

Zhang *et al.*, (2007), clonou, em um vetor para células de *Drosophila*, os genes da proteína pré-membrana e do envelope do flavivírus causador da encefalite japonesa. As células estáveis que expressaram a Proteína E foram selecionadas; e a proteína foi analisada e testada para três anticorpos monoclonais contra a proteína do envelope do vírus selvagem. Como esperado, a proteína recombinante apresentou uma massa molecular de 50 kDa, foi detectada pelos três anticorpos e é encontrada tanto no citoplasma quanto no meio de cultura das células. Além disso, camundongos tratados com o purificado proteico foram capazes de produzir anticorpos específicos contra a proteína do E.

Os diversos sistemas de expressão proteica têm obtido bons resultados para os estudos das proteínas flavivirais. Entretanto, a utilização do sistema de expressão baculoviral, além de seguro e de viabilizar um meio eucariótico capaz de modificações pós-traducionais, é capaz de expressar vários genes ao mesmo tempo e permite a expressão de grandes quantidades de proteínas recombinantes (até 1g de proteína heteróloga/10⁹ células).

A construção do vírus recombinante vAcPolAgEnv e expressão da proteína fusionada foram bem sucedidas. Porém, novos estudos de caracterização, produção e validação de anticorpos contra a proteína recombinante são necessários para a futura utilização como diagnóstico e produção de vacinas virais. Por exemplo, para uma melhor caracterização da proteína fusiona com experimentos de imunodeteccção, a utilização de anticorpos policlonais ao contrário do monoclonal anti-proteína E, provavelmente, deve levar a uma marcação mais forte e evidente. Anticorpos monoclonais reconhecem sítios específicos que podem ter sofrido alterações quando a proteína E foi fusionada á poliedrina. Tais alterações podem ter dificultado a imunodeteccção da proteína fusionada nos métodos de imuno-marcação utilizados neste trabalho.

Era esperado um maior nível de expressão da proteína recombinante, uma vez que esta se encontra sob o comando de um forte promotor. Uma das limitações do sistema de expressão baculoviral é o processo de N-glicosilação com vias distintas em células de inseto e em células mamíferos. Logo, como a proteína do E possui diversos sítios de N-glicosilação (Hanna *et al.*, 2005) necessários para a sua maturação, talvez o sistema utilizado não permita as corretas modificações pós-traducionais, podendo vir a influenciar nos níveis de expressão proteica.

Outra modificação para aperfeiçoamento deste trabalho é uma nova construção do vetor de transferência pFastAgPol. Como o vírus recombinante vAcPolAg é incapaz da produção de poliedros, apenas expressa uma massa proteica disforme, a purificação das

proteínas fusionadas é dificultada. Quando ocorre a formação de poliedros, estes podem ser facilmente purificados por um gradiente de sacarose. Para melhorar o vetor, poderemos incorporar ao C-terminal da proteína poliedrina, uma cauda de hexa-histidina similar á adicionada ao vetor pFastPH3 (Costa, 2008), evitando a introdução de 41 aminoácidos na porção C-terminal e facilitando a purificação da proteína recombinante fusionada por cromatografia por afinidade. Outra possibilidade é a clonagem de todo o cassete de fusão do pFastAgPol em outro vetor que já possua o gene da poliedrina selvagem, como por exemplo o p2100 (Hallwass *et alli*, 2005), e analisar se a presença de outra poliedrina pode auxiliar a formação do poliedro, como mostrado no trabalho de Chang *et al* (2003).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIF, B.M. The structure of the viral genome. **Current Topics Microbiology and Immunology** v.131, p.21-29, 1986

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

BARRETT, A.D.T and HIGGS, S. Yellow Fever: a disease that has yet to be conquered. **Annual Review of Entomology** v.52, p.209-229, 2007.

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

BLISSARD, G.W; ROHRMANN, G.F. Localization, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. **Virology** v.170, p.537-555, 1989.

BONAFÉ, N.; RININGER, J.A.; CHUBET, R.G.; FOELLMER, H.G.; FADER, S.; ANDERSON, J.F.; BUSHMICH, S.L.; ANTHONY, K.; LEDIZET, M.; FIKRIG, E.; KOSKI, R.A.; KAPLAN, P. A recombinant West Nile virus envelope protein vaccine candidate produced in *Spodoptera frugiperda* expresSF+cells. **Vaccine** v. 27 (2), p. 213-222, 2009.

BONALDO, M.C; GARRATT, R.C; CAUFOUR, P.S; FREIRE, M.S; RODRIGUES M.M; NUSSENZWEIG, R.S; GALLER R. Surface expression of an immunodominant malaria protein B cell epitope by yellow fever virus. **J. Mol. Biol** v.315, p. 873-885, 2002.

BONALDO, M.C; GARRATT, R.C; MARCHEVSKY, R.S; COUTINHO, E.S; JABOR, A.V; ALMEIDA, L.F; YAMAMURA, A.M; DUARTE, A.S; OLIVEIRA, P.J; LIZEU, J.O; *ET AL.* Attenuation of recombinant yellow fever 17D viruses expressing foreign protein epitopes at the surface. **Journal of Virology** v.19, p.8602-8613, 2005.

BONALDO, M.C; MELLO, S.M; TRINDADE, G.F; RANGEL, A.A.C; DUARTE, A.S; OLIVEIRA, P.J; FREIRE, M.S; KUBELKA, C.F; GALLER, R. Construction and characterization of recombinant flaviviruses bearing insertions between E and NS1 genes. **Virology Journal** v.4:115, 2007.

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

BREDENBEEK, P.J.; KOOI, E.A.; LINDENBACH, B.; HUIJKMAN, N.; RICE, C.M; SPAAN, W.J.M. A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. **Journal of General Virology** v.84, p. 1261-1268, 2003.

BROWN, M.; FAULKNER, P.; COCHRAN, M.A.; CHUNG, K.L. Characterization of two morphology mutants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus with large cuboidal inclusion bodies. **Journal of General Virology** v.50, p. 309-316, 1980.

BRYANT, J.E; VASCONCELOS, P.F.C; RIJNBAND, R.C.A; MUTEBI, J.P; HIGGS, S.; BARRET, A.D.T. Size heterogeneity in the 3' Noncoding Region of South American isolates of Yellow Fever Virus. **Journal of Virology** v.79(6), p.3807-3821, 2005.

CARTENS, E.B.; KREBS, A.; GALLERNEAUT, C.E. Identification of an amino acid essential to the normal assembly of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedral. **Journal of Virology** v.58, p.684-688, 1986.

CARSTENS, E.B.; LIN-BAI, Y.; FAULKNER, P. A point mutation in the polyhedron gene of a baculovirus, *Autographa californica* MNPV, prevents crystallization of occlusion bodies. **Jornal of General Virology** v. 68, p. 901-905, 1987.

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

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.

CHAMBER, 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.

CHAMBER, 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

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.

CHEN, S-O.; FANG, S-H.; SHIH, D-Y.; CHANG, T-J.; LIU, J-J. Recombinant core proteins of Japanese encephalitis virus as activators of the innate immune response. **Virus Genes** v.38, p.10-18, 2009.

CHENG, X.; CARNER, G.R.; FESCEMYER, H.W. Poyhedrin sequence determines the tetrahedral shape of occlusion bodies in *Thysanoplusia orichalcea* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology** v. 79, p. 2549-2556, 1998.

CHOI, H.S.; KIM, S.Y.; PARK, K.J.; KIM, J.Y.; HWANG, S.B. Hepatitis C virus core protein is efficiently released into the culture medium in insect cells. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology** v 37(6), p.735-740, 2004.

COSTA, M.H.O. Construção do vetor baculoviral modificado capaz de produzir proteínas fusionadas á células de inseto. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biologia. Biologia Molecular, Universidade de Brasília, 2008.

CROOK, N.E. Baculoviridae: sub-group B: comparative aspects of granulosis viruses. In: KURSTAK, E. (Ed.). **Viruses of invertebrates**. New York: Marcel Dekker. p.73-110, 1991.

DESPRÈS, P.; DIETRICH, J.; GIRARD, M.; BOULOY, M. Recombinant baculoviruses expressing yellow fever virus E and NS1. **Journal of General Virology** v.72, p.2811-2816, 1991.

ENGLEHARD, E.K.; KAM-MORGAN, L.N.; WASHBURN, J.O.; VOLKMAN, L.E. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA** v.91, p.3224-3227, 1994.

FAULKNER, P.; KUZIO, J.; WILLIAMS, G.V.; WILSON, J.A. Analysis of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity *in vivo*. **Journal of General Virology** v.78, p. 3091-3100, 1997.

FEDERECI, B.A. Baculovirus pathogenesis. In: MILLER, L.K. **The baculoviruses**. New York; Plenum Press p.33-59, 1997.

FRIESEN, P.D.; MILLER, L.K. Divergent transcription of early 35- and 94- kilodalton protein genes encoded by the Hind III K genome fragment of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology** v.61, p.2264- 2272, 1987.

GAUCHER, D.; THERRIEN, R.; KETTAF, N.; ANGERMANN, B.R.; BOUCHER, G.; FILALI-MOUHIM, A.; MOSER, J.M.; MEHTA, R.S.; DRAKE III, D.R.; CASTRO, E.; AKONDY, R.; RINFRET, A.; YASSINE-DIAB, B.; SAID, E.A.; CHOUNIKH, Y.; CAMERON, M.J.; CLUM, R.; KELVIN, D.; SOMOGYI, R.; GRELER, L.D.; BALDERAS, R.S.; WILKINSON, P.; PANTALEO, G.; TARTAGLIA, J.; HADDAD, E.K.; SÉKALY R-P. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. **The Journal of Experimental Medicine**. v.205(13), p. 3119-3131, 2008.

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.

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.

HALLWASS, M. Uso do bioinseticida baculovírus *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) como vetor de expressão de proteínas com interesse fitopatológico e como sistema biológico para análise da interação vírus/hospedeiro. **Dissertação de Mestrado** – Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília 2005.

HANAHAN, D. Techniques for transformation of *E. coli*. In: GLOVER, D.M.; HAMES, B.D. **DNA Cloning: A Practical Approach**. Oxford University Press, USA.v.1, p.109-135, 1995.

HANNA, S.; PIERSON, T.C.; SANCHEZ, M.D.; AHMED, A.A.; MURTADHA, M.M.; DOMS, R.W. N-Linked glycosylation of West Nile Virus envelope proteins influences particle assembly and infectivity. **Journal of Virology** v. 79(21), p.13262-13274, 2005.

HERNIOU, E.A.; OLSZEWSKI, J.A.; CORY, J.S.; O'REILLY, D.S. The genome sequence and evolution of baculoviruses. **Annual Review of Entomology** v.48, p.211-234, 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.

HU, Z.; LUIJCKX, T.; VAN DINTEN, L.C.; *ET AL.* Specificity of polyhedron in the generation of baculovirus occlusion bodies. **Journal of General Virology** v.80, p.1045-1053.

JARVIS, D.L.; REILLY, L.M.; HOOVER, K.; SCHULTZ, C.; HAMMOCK, B.D.; GUARINO, L.A. Construction and characterization of immediate early baculovirus pesticides. **Biological Control** v.7, p.228-235, 1996.

JARVIS, L.D.; HOWE, D.; AUMILLER, J.J. Novel baculovirus expression vectors that provide sialylation of recombinant glycoproteins in Lepidopteran Insect Cells. **Journal of Virology** v.75(13), p.6223-6227, 2001.

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 SK. 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; CORY, J.S; HERNIOU, E.A; ROHRMANN, G.F; THEILMANN, D.A; THIEM, S.M; VLAK, J.M. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal of revision. **Archives of Virology** v. 151, 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.

JOHNSON, D. W.; MARUNIAK, J. E. Physical map of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus (AgMNPV-2) DNA. **Journal of General Virology**, v. 70, p.1877-1883. 1989.

KALMAKOFF, J.; WARD, V.K. **Baculoviruses**. Dunedin: University of Otago, 2003. Disponível em: <<http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/kalmakoff/baculo/baculo.html>>. Acesso em: 25 nov. 2005.

KATSUMA, S.; NOGUCHI, Y.; SHIMADA, T.; NAGATA, M.; KOBAYASHI, M.; MAEDA, S.; Molecular characterization of baculovirus *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus polyhedron mutants. **Archives of Virology** v.144, p.1275-1285, 1999.

KEELAPANG, P.; SRIBURI, R.; SUPASA, S.; PANYADEE, N.; SONGJAENG, A.; JAIRUNGSRI, A.; PUTTIKHUNT, C.; KASINRERK, W.; MALASIT, P.; SITTISOMBUT, N. Alterations of pr-M cleavage and virus export in pr-M junction chimeric Dengue viruses. **Journal of Virology** v. 78(5), p.2367-2381, 2004.

KELLY, B.J.; KING, L.A.; POSSEE, R.D. Introduction to Baculovirus Molecular Biology. In: MURHAMMER, D.W (Ed). **Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols**. Totowa, NJ. v.338, p.25-53, 2007.

KELLY, P.E.; GREENE, J.J.; KING, A.D.; INNIS, B.L. Purified dengue 2 virus envelope glycoprotein aggregates produced by baculovirus are immunogenic in mice. **Vaccine** v.18, p.2549-2559, 2000.

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.

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

LAI, C.J.; MONATH, T.P. Chimeric flaviviruses: novel vaccines against dengue fever, tick-borne encephalitis, and Japanese encephalitis. **Adv Virus Res** v.61, p.469-509, 2003.

LANGEREIS, M.A.; ACOSTA-ROSAS, G.; MULDER, K.; WILSON, V.G. Production of sumoylated proteins using a baculovirus expression system. **Journal of Virological Methods** v. 139(2), p.189-194, 2007.

LEE, E.; FERNON, C.; SIMPSON, R.; WEIR, R.C.; RICE, C.M.; DALGARNO, L. Sequence of the 3' half of the Murray Valley encephalitis virus genome and mapping of the non-structural proteins NS1, NS3 and NS5. **Virus Genes**. In press, 1990.

LEE, H. H. & Miller, L. K. Isolation of genotypic variants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology**. v.27, 754-767, 1978.

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. **The Journal of Gene Medicine** v.11, p.57-65, 2009.

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.

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.

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.

MARX, F.; GRITSUN, T.S.; GRUBECK-LOEBENSTEIN.; GOULD, E.A. Diagnostic immunoassays for tick-borne encephalitis virus based on recombinant baculovirus protein expression. **Journal of Virological Methods** v.91, p. 75-84, 2001.

MCALLISTER, A.; ARVETMAN, A.E.; MANDL, S.; PENA-ROSSI, C.; ANDINO, R. Recombinant yellow fever viruses are effective therapeutic vaccines for treatment of murine experimental solid tumors and pulmonary metastases. **Journal of Virology** v.74, p.9197-9205, 2000.

MILLER, L.K.; MILLER, D.; ADANG, M. An insect virus for genetic engineering: developing baculovirus polyhedron substitution vectors. In P. Lurquin & Kleinhfs (eds), **Genetic engineering in eukaryotes**. New York, Plenum Press, p. 89-97, 1983.

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: an update. **Lancet Infectious Diseases** v.1, p.11-20, 2001.

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

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology** v.44, p.257-298, 1999.

MUKHOPADHYAY, S; KUHN, R.J; ROSSMANN, M.G. A structural perspective of the *flavivirus* life cycle. **Nature** v. 3, p.13-22, 2005.

MURPHY, F.A.; FAUKQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D. (Eds.). **Virus Taxonomy; classification and nomenclature of viruses. Sixth Report of international Committee on Taxonomy of Viruses.** New York: Springer-Verlag Wien, p.104-113, 1995.

MUTEBI, J.P.; WANG, H.; LI, L.; BRYANT, J.E.; BARRET, A.D.T. Phylogenetic and evolutionary relationships among yellow fever isolates in Africa. **Journal of Virology** v.75(15): 6999-7008, 2001.

MUTEBI, J.P.; RIJNBRAND, R.C.A.; WANG, H.; RYMAN, WANG, E.; FULOP, L.D.; TITBALL, R.; BARRETT, A.D.T. Genetic relationships and evolution of genotypes of Yellow Fever virus and other members of the Yellow Fever virus group within the *Flavivirus* genus based on the 3' noncoding region. **Journal of Virology** v. 78(18), p. 9652-9665, 2004.

NAKAI, M.; GOTO, C.; KANG, W.; SHIKATA, M.; LUQUE, T.; KUNIMI, Y. Genome sequence and organization of *nucleopolyhedrovirus* isolated from smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai*. **Virology** v.316, p.171-183, 2003.

NYBAKKEN, G.E.; NELSON, C.A.; CHEN, B.R.; DIAMOND, M.S.; FREMONT, D.H. Crystal structure of the West Nile virus envelope glycoprotein. **Journal of Virology** v.80(23), p.11467-74, 2006.

OP DE BEECK, A.; ROUILLÉ, Y.; CARON, M.; DUVET, S.; DUBUISSON, J. The transmembrane domains of the prM and E proteins of Yellow Fever virus are endoplasmic reticulum localization signals. **Journal of Virology** v.78(22), p. 12591-12602,2004.

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

PATTERSON, R.M.; SELKIRK, J.K.; MERRICK, B.A. Baculovirus and insect cell gene expression: review of baculovirus biotechnology. **Environmental Health Perspectives** v. 103(7-8), p.756-759, 1995.

PAYNE, C.C. Insect pathogenic viruses as pest control agents. **Fortschritte der Zoologie** v.32, p.183-2000, 1986.

PEARSON, M.N.; GROTEN, C.; ROHRMANN, G.F. Identification of the *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus envelope fusion protein provides evidence for phylogenetic division of the *Baculoviridae*. **Journal of Virology** v.74, p.6126-6131, 2000.

PENNOCK, G.D.; SHOEMAKER, C.; MILLER, L.K. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* b-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. **Molecular and Cellular Biology** v.4, p.399-406, 1984.

PIERSON, T.C.; DIAMOND, M.S. Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralization of flavivirus infection. **Expert reviews in molecular medicine** v.10(12),2008.

PUGACHEV, K.V.; GUIRAKHOO, F.; MONATH, T.P. New developments in flavivirus vaccines with special attention to yellow fever. **Curr Opin Infect Dis** v.18, p.387-394,2005.

PULENDRAN, B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. **Nature Reviews** v.9, p.741-747, 2009.

PUTNAK, J.R.; SCHLESINGER, J.J. Protection of mice against yellow fever virus encephalitis by immunization with a vaccinia virus recombinant encoding the yellow fever virus non-structural proteins NS1, NS2a and NS2B. **Journal of General Virology** v.8, p.1697-1702, 1990.

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.; SOUZA, M.L.; KITAJIMA, E.W. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 481-507,1998.

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.

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

ROCHA, J.R; COSTA, M.H; RIBEIRO B.M; RESENDE, R.O. **XIX Encontro Nacional de Virologia**, 16-19 novembro, Caxambu- MG, 2008.

RODRIGUES, K. Expressão de proteína recombinante da capa do Citrus Sudden Death-associated Virus utilizando sistema de baculovírus e produção de anticorpo. **Dissertação de Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia**. Universidade Católica de Brasília, 2010.

SAIJO, M.; GEORGES-COURBOT, M-C.; MARIANNEAU, P.; ROMANOWSKI, R.; FUKUSHI, S.; MIZUTANI, T.; GEORGES, A-J.; KURATA, T.; KURANE, I.; MORIKAWA, S. Development of recombinant nucleoprotein based diagnostic systems for Lassa Fever. **Clinical and Vaccine Immunology** v. 14(9), p. 1182-1189, 2007.

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.

SELIGMAN, S.J. Constancy and diversity in the flavivirus fusion peptide. **Virology Journal** v.5(27), doi:10.1186/1743-422X-5-27, 2008.

SHIU, S.Y.W.; MORIKAWA, S.; BUCKLEY, A.; HIGGS, S.; KARUNAKARANNAIR, V.; BLACHERE, C.; GOULD, E.A. 17D yellow fever vaccine virus envelope protein expressed by recombinant baculovirus is antigenically indistinguishable from authentic viral protein. **Journal of General Virology** v.72, p. 1451-1454, 1991.

SIL, B.K.; DUNSTER, L.M.; LEDGER, T.N.; WILLS, M.R.; MINOR, P.D.; BARRETT, A.D.T. Identification of Envelope Protein Epitopes that are important in the attenuation process of wild-type yellow fever virus. **Journal of Virology** v.66(7), p.4265-4270, 1992.

SMITH, G.E.; SUMMERS, M.D. Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. **Virology** v.89, p.517-527, 1978.

SMITH, G.E.; VLAK, J.M.; SUMMERS, M.D. Physical analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus transcripts for polyhedron and 10.000 molecular weight protein. **Journal of Virology** v.45, p.215-225, 1983.

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

STOCKS, C.E. & LOBIGS, M. Signal peptidase cleavage at the Flavivirus C-prM junction: dependence on the viral NS2B-3 protease for efficient processing requires determinants in C, the signal peptide, and prM. **Journal of Virology** v.72(3), p.2141-2149, 1998.

SUGRUE, R.J.; FU, J.; HOWE, J.; CHAN, Y-C. Expression of the dengue virus structural proteins in *Pichia pastoris* leads to the generation of virus-like particles. **Journal of General Virology** v.78, p. 1861-1866, 1997.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Innate immunity to virus infection. **Immunological Reviews**. v.227, p.75-86, 2009.

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.9799-9808,2003,2003.

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.

THIEM, S.M.; MILLER, L.K. Identification, sequence, and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology** v.63, p. 2008-2018, 1989.

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

VERA, A.V. Fiebre amarilla: a propósito de la alerta. **MedUNAB** v. 7, p.15-20, 2004.

VOLK, D.E; MAY, F.J; GANDHAM, S.H.A; ANDERSON, A; VON LINDERN, J.J; BEASEY, D.W.C; BARRETT, A.D.T; GORENSTEIN, D.G. Structure of yellow fever virus envelope protein domain III. **Virology** v.394, p. 12-18, 2009.

VOLKMAN, L.E.; GOLDSMITH, P.A.; HESS, R.T.; FAULKNER, P. Neutralization of budded *Autographa californica* NPV by a monoclonal antibody: identification of the target antigen. **Virology** v.133, p.354-362, 1984.

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

VON LINDERN, J.J.; ARONER, S.; BARRETT, N.D.; WICKER, J.A.; DAVIS, C.T.; BARRET, A.D.T. Genome analysis and phylogenetic relationships between east central and west African isolates of Yellow fever virus. **Journal of general Virology** v.87, p. 895-907, 2006.

XIAOYUN, J.; SUTTON, G.; EVANS, G.; AXFORD, D.; OWEN, R.; STUART, D.I. How baculovirus polyhedra fit square pegs into round holes to robustly package viruses. **The EMBO Journal** v.29, p.505-524, 2010.

XU, X.L.; YANG, J.J.; REN, R.W.; LIU, J.W.; MA, S.B.; BAI, Z.J.; FANG, M.Y. Study on E protein epitopes and primary identification of main yellow fever virus. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi** v. 30(5), p. 489-92, 2009.

WANG, P-G.; KUDELKO, M.; LO, J.; SIU, L.Y.L.; KWOK, K.T.H.; SACHSE, M.; NICHOLLS, J.M.; BRUZZONE, R.; ALTMAYER, R.M.; NA, B. Efficient assembly and secretion of recombinant subviral particles of the four dengue serotypes using native prM and E proteins. **Plos one** v.4(12): e8325. doi:10.1371/journal.pone.0008325, 2009.

WANG, X.; OOI, B.G.; MILLER, L.K. Baculovirus vectors for multiple gene expression and for occluded virus production. **Gene** v.100, p.131-137, 1991.

WEIR, E and HAIDER, S. Yellow fever: readily prevented but difficult to treat. **CMAJ** v.170 (13), p.1909-10, 2004.

WILLIAMS, G.V.; ROHEL, D.Z.; KUZIO, J.; FAULKNER, P. A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion/deletion mutants. **Journal of General Virology** v.70, p.187-202, 1989 .

WILLIAMS, G.V.; FAULKNER, P. Cytological changes and viral morphogenesis during Baculovirus infection. In: Miller, L.K. **The baculoviruses**. New York; Plenum Press p.61-107, 1997.

WILSON, M.E.; MAINPRIZE, T.H.; FRIESEN, P.D.; MILLER, L.K. Location, transcription and sequence of baculovirus gene encoding a small arginine-rich polypeptide. **Journal of Virology** v.61, p.661-666, 1987.

WINSTANLEY, D.; CROOK, N.E. Replication of *Cydia pomonella* granulosis virus in cell cultures. **Journal of General Virology** v. 74, p.1599-1609, 1993.

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.

ZANOTTO, P.M.A.; KESSING, B.D.; MARUNIAK, J.F. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. **Journal of Invertebrate Pathology** v.62 (2), p.147-164, 1993.

ZHANG, F.; MA, W.; ZHANG, L.; AASA-CHAPMAN, M.; ZHANG, H. Expression of particulate-form of Japanese encephalitis virus envelope protein in a stably transfected *Drosophila* cell line. **Virology Journal** v.4(17), doi: 10.1186/1743-422x-4-17, 2007.

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.

ZHAO, B.; PRINCE, G.; HORSWOOD, R.; ECKELS, K.; SUMMERS, P.; CHANOCK, R.; LAI, C-J. Expression of dengue virus structural proteins and nonstructural protein NS₁ by a recombinant vaccinia virus. **Journal of Virology** v.61, p. 4019-4022, 1987.