



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

Expressão da proteína do envelope do vírus da Febre Amarela em células de inseto

Tatiane Guerreiro Campanhoni Machado

Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro

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

Brasília, 15 de maio de 2007



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

Expressão da proteína do envelope do vírus da Febre Amarela em células de inseto

Tatiane Guerreiro Campanhoni Machado

Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro

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

Brasília, 15 de maio de 2007

Trabalho realizado junto ao programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, sob orientação do Prof^o Ph.D. Bergmann Morais Ribeiro e apoio institucional e financeiro do CNPq.

Aprovado por:

Dr. Bergmann Morais Ribeiro (orientador)

Departamento de Biologia Celular

Universidade de Brasília

Dr. Carlos André Ornelas Ricart

Departamento de Biologia Celular

Universidade de Brasília

Dra. Cynthia Maria Kyaw

Departamento de Biologia Celular

Universidade de Brasília

ÍNDICE

Figuras	vi
Citações	viii
Dedicatória	ix
Agradecimentos	x
Abreviaturas e símbolos	xii
Resumo	xiv
Abstract.....	xvi
1. Introdução.....	18
1.1. Febre amarela	18
1.1.1. Transmissão	18
1.2. Epidemiologia.....	21
1.3. <i>Yellow fever virus</i>	23
1.4. Manifestações clínicas	28
1.5. Diagnóstico.....	29
1.6. Proteína Envelope.....	31
1.7. Baculovírus.....	32
1.8. Classificação dos Baculovírus	33
1.9. Estrutura do vírion.....	34
1.10. Modo de infecção <i>in vivo</i>	36
1.11. Modo de infecção <i>in vitro</i> : infecção de cultura de células de inseto.....	39
1.12. Baculovírus como sistema de expressão	40
2. Objetivos.....	43
2.1. Estratégias.....	43
3. Material e métodos	44

3.1. Obtenção do gene do Envelope	44
3.2. Clonagem do gene <i>env</i> no plasmídeo pGEM-T Easy (Promega) e sequenciamento	48
3.3. Construção do vetor pSynYFE	50
3.4. Construção do vetor p2100XIVYFE	52
3.5. Construção dos baculovírus recombinantes vSynYFE e vAgYFE	54
3.6. Análise da expressão das proteínas Env através de SDS-PAGE e imunomarcacão	56
4. Resultados.....	60
4.1. Obtenção do gene do <i>env</i> do vírus da febre amarela	60
4.2. Clonagem do gene <i>env</i> no plasmídeo pGEM-T Easy (Promega) e sequenciamento	61
4.3. Obtenção do vetor de transferência pSynYFE	62
4.4. Obtenção do vetor p2100XIVYFE	62
4.5. Obtenção dos baculovírus recombinantes vSynYFE e vAgYFE	66
4.6. Análise da expressão da proteína Env através de SDS-PAGE e imunomarcacão	71
5. Discussão	75
6. Conclusões e perspectivas	82
7. Referências bibliográficas	84

FIGURAS

Figura 1: Imagens dos diferentes mosquitos vetores da febre amarela	19
Figura 2: Desenho esquemático mostrando ciclos de transmissão.....	20
Figura 3: Esquema da partícula viral dos flavivirus e micrografia eletrônica do vírus da febre amarela	24
Figura 4: Organização genômica do vírus da febre amarela	25
Figura 5: Esquema da replicação do vírus da febre amarela	27
Figura 6: Esquema e micrografia eletrônica da estrutura dos baculovírus.....	35
Figura 7: Desenho esquemático do ciclo de infecção por baculovírus <i>in vivo</i>	38
Figura 8: Seqüência gênica da região do gene do envelope do vírus da febre amarela de um paciente infectado.....	46
Figura 9: Plasmídeo pGEM-T Easy (Promega).....	49
Figura 10: Plasmídeo pSynXIV VI ⁺ X3	51
Figura 11: Plasmídeo p2100	53
Figura 12: Imagens das lagartas <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>Anticarsia gemmatalis</i>	57
Figura 13: Amplificação do gene <i>env</i> do vírus da febre amarela por RT-PCR.....	60
Figura 14: Clonagem do gene <i>env</i> no vetor pGEM-T Easy (Promega).....	61
Figura 15: Clonagem do gene <i>env</i> no vetor de transferência pSynXIV VI ⁺ X3	63
Figura 16: Obtenção do cassete contendo o promotor pXIV e o gene <i>env</i>	64
Figura 17: Clonagem do cassete contendo o promotor pXIV e o gene <i>env</i> no vetor de transferência p2100	65
Figura 18: Esquema de construção do vírus recombinante vSynYFE	67
Figura 19: Análise dos efeitos citopáticos de células de inseto infectadas com diferentes baculovírus	68

Figura 20: Esquema de construção do vírus recombinante vAgYFE.....	69
Figura 21: Confirmação da presença do gene <i>env</i> nos vírus recombinantes vSynYFE e vAgYFE.....	70
Figura 22: Análise da expressão da proteína recombinante Env do vírus da febre amarela em células de inseto	72
Figura 23: Análise da expressão da proteína recombinante Env e NS1 do vírus da febre amarela no tecido adiposo de insetos infectados com baculovírus recombinantes	73

Vamos até a montanha onde Deus mora
-comentou um cavaleiro com seu amigo.
- Quero provar que Ele só sabe pedir, e
nada faz para aliviar nosso fardo.

- Pois vou para demonstrar a minha fé -
disse o outro. Chegaram à noite no alto do
monte e escutaram um Voz na escuridão:
Encham seus cavalos com as pedras do
chão!

- Viu? - disse o primeiro cavaleiro.
- Depois de tanto subir, ele ainda nos faz
carregar com mais peso. Jamais
obedecerei!

O segundo cavaleiro fez o que a Voz dizia.
Quando terminaram de descer o monte, a
aurora chegou e os primeiro raios de sol
iluminaram as pedras que o cavaleiro
piedoso havia trazido: eram diamantes
puríssimos.

Diz o mestre: As decisões de Deus são
misteriosas; mas estão sempre a nosso
favor.

(Maktub - Paulo Coelho)

À minha família linda, meu companheiro Mateus, às Guerreiras da Luz e a todos que de alguma forma fizeram parte deste trabalho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Edson e Fátima por serem incríveis, pelo amor, apoio incondicional, compreensão e incentivo. Não há palavras pra expressar a alegria em tê-los como pais. Obrigado por tudo que me ensinaram, por estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis e acreditarem sempre em mim.

Aos meus adoráveis irmãos Danilo e Andiará, pela companhia, por fazerem meus dias mais alegres e por serem muito mais que irmãos, por serem meus amigos. Obrigada por me apoiarem sempre.

Ao meu querido companheiro Mateus, por ser meu amigo, confidente, cúmplice. Obrigada por estar presente em minha vida, tornando meus dias mais leves, pela paciência nos dias de estresse e cansaço. Enfim, obrigada por tudo.

À minha querida amiga Maria Creuza, por ser um verdadeiro Sol, lindo e brilhante. Amiga, não tenho palavras pra te agradecer, nem descrever o quanto você é importante e especial. Obrigada pelo grande incentivo, pelo aprendizado e pela bela amizade.

Aos queridos Odemar e Kátia, pessoas extraordinárias a quem devo muito. Obrigada pela paciência, boa vontade, por terem me recebido tão bem e por serem adoráveis.

Às minhas amigonas do peito Carol, Sara, Susane e Ju indescritível a essencial participação de vocês na minha vida. Obrigada de coração pela amizade, confiança, apoio e por serem tão maravilhosas.

Aos meus avós, tios e primos, que mesmo morando longe sempre me apoiaram.

Ao professor Bergmann, por tudo. Pela paciência, pelos ensinamentos, compreensão e apoio. Obrigado por ser um guia, um profissional brilhante que admiro muito.

Ao professor Antônio Chaib, pelas oportunidades, incentivo e confiança.

Aos amigos do Laboratório de Microscopia Eletrônica Aline, Anabele, Ana Paula, Breno, Bruno, Cláudia, Davi, Érica, Gláucia, Greice, Hugo, Juliana, Malu e Arthur, Marcelo, Nayara, Paulo, Pinedo, Raimundo, Ramon, Roberto, Sandra, Shélida, Susane, Thiago, Virgínia, Vítor, pela companhia, por serem excelentes colegas de trabalho. Obrigada por fazerem meus momentos de trabalho mais descontraídos e pela ajuda quando necessário. Em especial agradeço ao Pinedo, pela amizade e incentivo. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos e boa vontade.

A Deus, pela vida e por me permitir a convivência com pessoas fantásticas.

À Universidade de Brasília, pela oportunidade de realização do trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	grau Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
µM	micromolar
cDNA	DNA complementar
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	deoxinucleotídeos
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
g	grama
h	hora
h.p.i.	horas pós-infecção
HCl	ácido clorídrico
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
kb	quilobase
KCl	Cloreto de potássio
kDa	quilodalton
L	litro
M	molar
mg	miligrama
min	minuto

mL	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NBT/BCIP	4-nitro-azul de tetrazólio/5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
ng	nanograma
nm	nanômetro
ORF	fase aberta de leitura
p/v	peso do soluto/volume da solução
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial de hidrogênio
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotação por minuto
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
s	segundo
SDS	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
Tris	tris(hidroximetil) aminometano
U	unidade enzimática
UTR	região não traduzida

RESUMO

A febre amarela é uma doença hemorrágica causada por um vírus pertencente à família Flavivirus que é transmitido aos humanos através de picada por mosquitos. O vírus possui RNA fita simples, sentido positivo, com genoma de 10.862 nucleotídeos e uma única fase aberta de leitura ou ORF (do inglês: "Open Reading Frame") de cerca de 10.233 nucleotídeos. A ORF codifica três proteínas estruturais (capsídeo, pré-M e envelope) e 7 não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5), sendo que destas, a proteína do envelope é uma das mais estudadas devido ao seu alto potencial antigênico. O isolamento de partes virais pode ser importante na utilização de antígenos para o desenvolvimento de novas vacinas e métodos diagnósticos. Na tentativa de isolar partes virais e expressá-las em separado são utilizados diferentes sistemas de expressão e dentre eles pode ser utilizado o sistema de expressão baseado em Baculovírus e células de inseto, que é um dos sistemas de expressão mais popular e eficiente. Baculovírus são vírus de DNA circular, dupla fita, que infectam artrópodes, principalmente os insetos. Existem muitas vantagens em se usar o sistema de expressão baseado em baculovírus e células de inseto, como altos níveis de expressão e modificações pós-traducionais, que permitem às proteínas recombinantes, serem montadas corretamente e biologicamente ativas. O gene do envelope do vírus da Febre Amarela foi isolado por técnica de RT-PCR, apresentando um tamanho de aproximadamente 1.600 pares de base. Em seguida, foi clonado em dois diferentes plasmídeos de transferência: pSynXIV VI⁺X3 e p2100, os quais foram co-transfectados, em células de inseto, com DNA de baculovírus recombinantes (vSynVI-gal, derivado do *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), para o pSynXIV VI⁺X3 e vAgGalA2, derivado do *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus*

(AgMNPV), para o p2100. Sete dias após a transfecção o sobrenadante da cultura celular foi coletado e utilizado para purificar o vírus recombinante pelo método de diluição seriada em placa de 96 poços. Os vírus recombinantes vSynYFE e vAgGalA2 foram, então, utilizados para infectar células de *Trichoplusia ni* em cultura (BTI-Tn5B1-4) e lagartas de *Spodoptera frugiperda* (para o vSynYFE) e *Anticarsia gemmatalis* (para o vAgYFE). Células de inseto infectadas com o vírus vSynYFE mostraram efeitos citopáticos manifestados pela formação de sincício celular (que é típico da infecção por flavivirus) e a análise desse extrato celular por SDS-PAGE detectou a presença de um polipeptídeo de aproximadamente 50 kDa, similar ao tamanho da proteína do envelope do vírus da Febre Amarela. Entretanto, extratos de tecido adiposo de lagartas infectadas (96 h p. i.) analisadas por SDS-PAGE e western blot detectaram um polipeptídeo por volta de 70 kDa, maior do que o esperado para a proteína do envelope da Febre Amarela.

ABSTRACT

Yellow fever is an haemorrhagic disease caused by a virus that belongs to the genus *Flavivirus* (*Flaviviridae* family) and is transmitted by mosquitoes. It is a positive-sense, single-stranded, enveloped RNA virus, and its genome consists of 10,862 nucleotides coding for a single ORF of 10,233 nucleotides. This ORF encodes three structural proteins (capsid, pre-M, and envelope) and seven non-structural proteins (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5). Among the viral proteins, the envelope protein is the most studied one, due to its high antigenic potencial. Isolated recombinant viral antigens may be useful in new vaccine and/or diagnosis development. On the purpose of isolating viral parts and expressing them separately, different heterologous expression systems may be used and within these, the Baculovirus Expression System in insect cells is one of the most popular and efficient. Baculoviruses have a circular, double stranded DNA genome and infect arthropodes, mainly insects. There are many advantages of using the baculovirus expression system such as high expression levels and post-translational modifications that allow the expressed proteins to be correctly folded and biologically active. The Yellow fever envelope gene was isolated by RT-PCR (1,600 base pairs). This fragment was cloned into two different transfer vectors: pSynXIV VI⁺X3 and p2100, that were co-transfected, in insect cells, with DNA from recombinant baculoviruses vSynVI-gal, derived from *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), for the pSynXIVVI⁺X3 and vAgGalA2, derived from *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV), for the p2100]. Seven days after transfection, the cell culture supernatant was collected and used to purify the recombinant virus by the end-point dilution method in 96-well plates. The recombinant viruses, vSynYFE e vAgGalA2 were used to infect *Trichoplusia ni* insect

cells (BTI-Tn5B1-4) and *Spodoptera frugiperda* larvae (for vSynYFE) and *Anticarsia gemmatalis* larvae (for vAgYFE). Insect cells infected with vSynYFE virus showed cytopathic effects manifested by multinucleated syncytial cells (which is typical of *Flavivirus* infection) and analysis of these cells extracts by SDS-PAGE detected the presence of a polypeptide around 50 kDa, similar to the size of the original Yellow fever envelope protein. However, fat body extracts of infected larvae (96 h p.i.) analysed by SDS-PAGE and Western blot detected a polypeptide around 70 kDa, different from the predicted size of the envelope protein.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Febre amarela

A febre amarela é uma doença viral infecciosa, não contagiosa e que se manifesta, em sua forma clássica, na forma de uma febre hemorrágica de alta letalidade. Ela é considerada uma arbovirose (arbo, do inglês “*Arthropod Borne Virus*”), ou seja, a transmissão é feita exclusivamente por picada de um vetor artrópode (Chang *et alli.*, 1995). Muito da distribuição mundial dos casos de febre amarela se deve a densidade e distribuição geográfica dos mosquitos vetores. O principal vetor na América do Sul é o *Haemagogus janthinomys* e mosquitos pertencentes ao gênero *Sabethes* e *Aedes*, no continente Africano, mosquitos pertencentes ao gênero *Aedes* (Bryant & Barrett, 2003) (Figura 1).

1.1.1. Transmissão

São descritos dois ciclos básicos de transmissão da febre amarela: um urbano, onde o mosquito *Aedes aegypti* é o vetor responsável pela disseminação da doença, e a transmissão se dá de pessoa a pessoa pela picada da fêmea do mosquito contaminado, não necessitando de hospedeiros amplificadores, pois o próprio homem infectado e em fase de viremia (período no qual o vírus pode ser isolado do sangue circulante) atua como amplificador (Vasconcelos, 2002); e um ciclo silvestre mais complexo, que tem como vetores mosquitos do gênero *Haemagogus* e *Sabethes* (América) e *Aedes* (África), na qual a transmissão envolve macacos como hospedeiros amplificadores da virose e mosquitos como reservatório permanente do vírus, pois uma vez infectados

permanecem assim por toda a vida, o que não ocorre com o homem e com os macacos, que uma vez infectados morrem ou curam-se, ficando imunes (Pelczar Jr. *et alli*, 1996; Vasconcelos, 2003) (Figura 2).

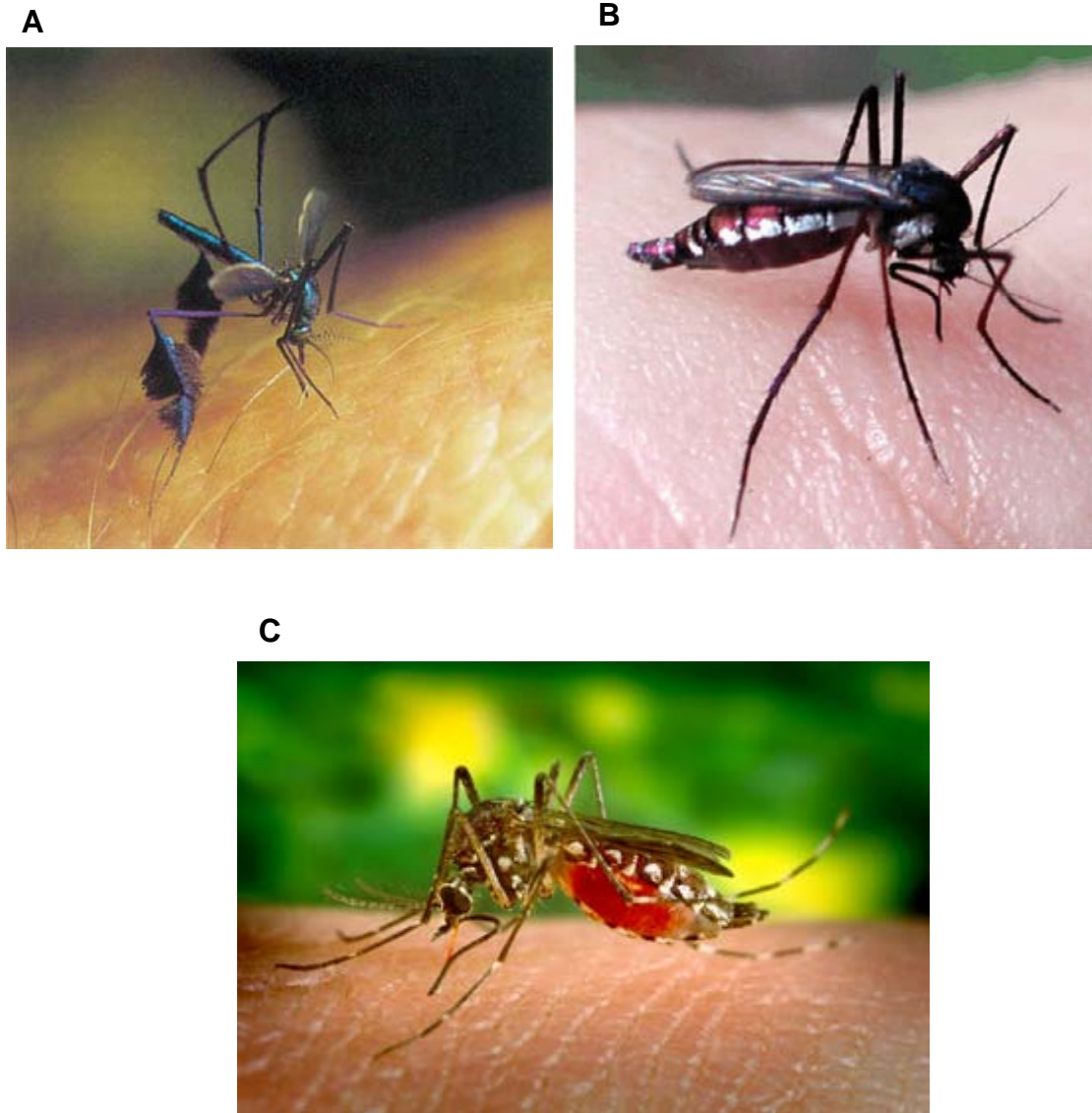


Figura 1: Imagens dos mosquitos transmissores da febre amarela. **A)** Foto de um mosquito *Sabethes cyaneus*. <http://www.sulinet.hu/eletestudomany/archiv/1997/9731/virulencia/virulencia.html> **B)** Foto de um mosquito *Haemagogus janthinomys*. Adaptado de Vasconcelos, 2003. **C)** Foto de um mosquito *Aedes aegypti*. <http://www.bg-sentinel.com/en/stegomyia.html>

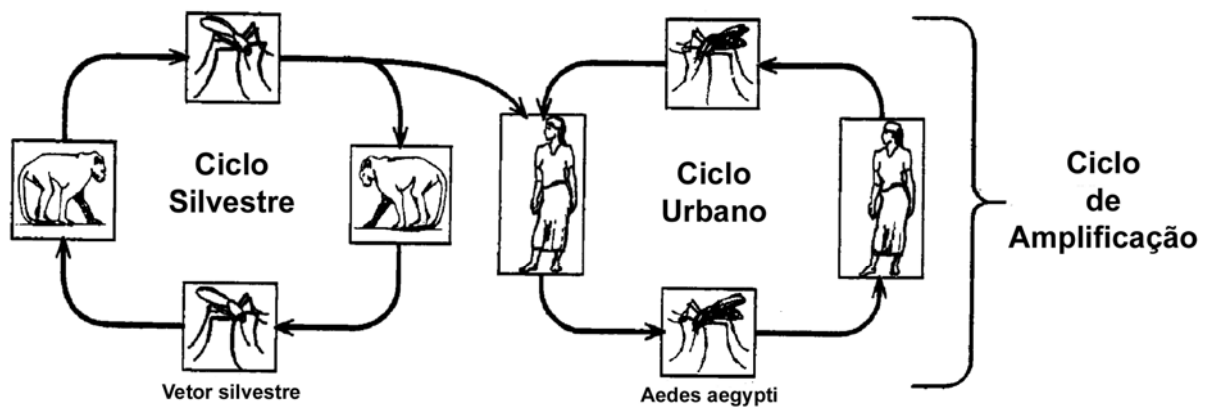


Figura 2: Esquema mostrando os ciclos selvagem e urbano de transmissão da febre amarela. Adaptado de Gubler, 2004.

Diferentes estratégias já foram utilizadas na tentativa de erradicação da febre amarela, dentre elas a diminuição dos índices de infestação dos mosquitos vetores e a prevenção da doença através de vacinação (Gubler, 2004). Entretanto, os sucessivos métodos de controle dos mosquitos vetores não obtiveram sucesso, e a febre amarela ainda se mantém presente no ciclo silvestre, de forma enzoótica, ou seja, causando epidemias silvestres esporádicas (Gomes *et alli*, 1999). O risco de reurbanização da febre amarela está intimamente ligado à globalização, juntamente com um crescimento urbano não ordenado e a ocupação de áreas silvestres. Além disso, uma maior amplitude na competência de mosquitos vetores de transmitirem a doença, associada à distribuição da mesma em populações primatas não humanas, que atuam como amplificadores do vírus, geram uma situação que favorece o risco da febre amarela se tornar novamente um grave problema de saúde pública (Tuboi *et alli*, 2007).

1.2. Epidemiologia

A Febre amarela urbana não é relatada no Brasil desde 1942, quando ocorreu a última epidemia urbana no estado do Acre, isso se deve, em especial, a utilização de uma vacina eficaz e segura, desenvolvida por Theiler e Smith em 1927 e disponibilizada para uso desde 1937 (Chang *et alli*, 1995; Bryant & Barrett, 2003; Weir & Haider, 2004). O uso da vacina assegurou um controle da febre amarela, mantido pela intensa ação de vigilância epidemiológica de diversas organizações nacionais e internacionais. A febre amarela é uma doença de notificação compulsória internacional, e a notificação dos seus casos, juntamente com os casos de Cólera e Peste, são sujeitos ao Regulamento Sanitário Internacional, o que permite que países vizinhos possam adotar medidas preventivas para conter epidemias (Vasconcelos, 2003).

A vacina da febre amarela é produzida com vírus vivo atenuado, linhagem 17D, cultivado em ovos embrionados de galinha, sendo que duas subcepas são utilizadas em sua produção: 17DD no Brasil e 17D-204 nas demais partes do mundo (Vasconcelos, 2003; Monath, 2005). Esta vacina apresenta algumas propriedades que a tornam bastante atraente, como a replicação viral limitada no hospedeiro, porém, com significativa expansão e disseminação viral, produzindo uma robusta e duradoura resposta de anticorpos neutralizantes. A vacina tem baixo custo e é aplicada como uma única dose (que deve ser reaplicada a cada dez anos), possui metodologia de produção bem estabelecida e procedimentos de controle de qualidade, incluindo o teste de neurovirulência em macacos (Bonaldo *et alli*, 2005).

Duas severas complicações clínicas devido à vacinação contra febre amarela são reconhecidas atualmente: febre amarela associada à doença neurotrópica (previamente conhecida como encefalite pós-vacina e agora chamada de efeitos

adversos neurotrópicos associados a vacina da febre amarela), que leva à infecção e lesão das células do sistema nervoso; e febre amarela associada à doença viscerotrópica (também denominada efeitos adversos viscerotrópicos associados à vacina), que consiste em um tropismo do vírus pelo fígado, rins e coração, levando a infecção e lesão desses tecidos (Monath, 2005). Porém, cabe ressaltar que os casos de complicações são raros, (Vasconcelos *et alli*, 2001) mas por se tratar de uma vacina de vírus atenuado, deve-se evitar a vacinação de pacientes com imunodeficiência, face aos riscos de reversão da virulência em um hospedeiro com depressão do sistema imune; gestantes, considerando o risco de transmissão para o feto e; pessoas com histórico de alergia à proteína do ovo, devido ao elevado risco de desenvolverem reação alérgica do tipo I (choque anafilático) (Vasconcelos, 2003).

Os primeiros casos de febre amarela datam de 1648 na Península de Yucatan no México. Porém, melhor conhecimento sobre a doença se deve às descobertas de Walter Reed e a Comissão de febre amarela, em Cuba, em 1900, quando foi documentado que a doença era causada por um agente filtrável transmitido por mosquito. Desde então, diversos programas foram implementados na busca da erradicação da doença, o que resultou em um grande decréscimo do número de epidemias e incidência de febre amarela. Entretanto, a doença re-emergiu em algumas áreas onde os programas de controle não foram rigorosos (Gubler, 2004).

O continente Africano é o mais afetado pela febre amarela, sendo responsável por cerca de 90% dos casos notificados anualmente à Organização Mundial da Saúde e a América do Sul é responsável pelos 10% restantes (Vasconcelos, 2003; Weir & Haider, 2004). Felizmente, o vírus nunca emergiu na Ásia, onde acredita-se que os vetores apresentem menor susceptibilidade e capacidade de transmissão (Monath, 2001). Na América do Sul, o Brasil é responsável por 25% dos casos reportados, onde a

doença é mantida principalmente na região amazônica, com surtos periódicos ou casos esporádicos (Gubler, 2004; Vasconcelos *et alli*, 2004).

1.3. *Yellow fever virus*

O agente etiológico da febre amarela é o *Yellow fever virus* pertencente ao gênero *Flavivirus*, e espécie-tipo da família *Flaviviridae* (Lee *et alli*, 2000). A família *Flaviviridae* possui três gêneros principais: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus* (gênero ao qual pertence o vírus responsável pela Hepatite C) (Fauquet *et alli*, 2005). Fazem parte do grupo dos flavivirus outros vírus de importância médica, como os quatro sorotipos do vírus da Dengue, o vírus da Encefalite Japonesa, o vírus do Oeste do Nilo, (também conhecido como *West Nile virus* - WNV) e o vírus que causa a encefalite transmitida por carrapato (*Tick-borne encephalitis virus*) (Corver *et alli*, 2003).

O vírus da febre amarela é uma partícula esférica (Figura 3), com 50nm de diâmetro, apresenta um capsídeo icosaédrico contendo uma molécula de RNA fita simples não segmentado, polaridade positiva, com genoma de 10.862 nucleotídeos, que codifica o precursor de uma única poliproteína (Galler *et alli*, 1997; Jones *et alli*, 2003; Chambers *et alli*, 2005). Este genoma é organizado em uma única fase aberta de leitura (do inglês: *Open Reading Frame* - ORF), que contém 10.233 nucleotídeos, que codifica as proteínas estruturais e as proteínas não estruturais (Monath, 2001). Essa ORF é flanqueada por duas regiões não codificantes: a região 5', que possui estrutura "cap" tipo I (m⁷GpppAmp) e a região 3', que não possui cauda poli-A (Bredenbeek *et alli*, 2003; Mutebi *et alli*, 2004).

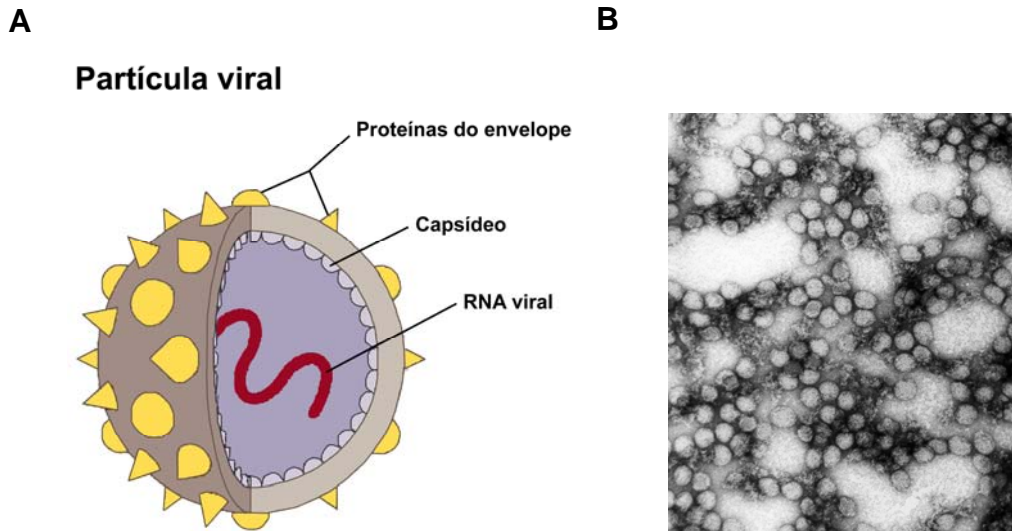


Figura 3: Partícula viral. **A)** Esquema mostrando estrutura da partícula viral de vírus pertencentes ao grupo *Flavivirus*. Adaptado de Strauss, 2001 **B)** Micrografia eletrônica mostrando múltiplos vírions do vírus da febre amarela (aumento de 234.000 X). Adaptado de <http://www.answers.com/topic/yellow-fever>

A regulação gênica do vírus está intimamente ligada ao processamento correto da poliproteína originada da tradução (Stocks & Lobigs, 1998). No caso do vírus da febre amarela, o processamento ocorre no lúmen do retículo endoplasmático rugoso através de proteases celulares e na face citoplasmática da mesma organela através de proteases virais (Wu *et alli*, 2005). A poliproteína, com 3.411 aminoácidos, ao ser processada dá origem a três proteínas virais estruturais (Capsídeo - C, Membrana - Pré-M/M, Envelope - E) e a sete proteínas virais não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Vasconcelos, 2003; Wu *et alli*, 2005) (Figura 4). Em geral, as proteínas não estruturais responsáveis pela replicação permanecem nas células infectadas, já as proteínas estruturais são incorporadas na montagem das partículas virais maduras (Monath, 2001).

Estrutura do genoma do vírus da febre amarela

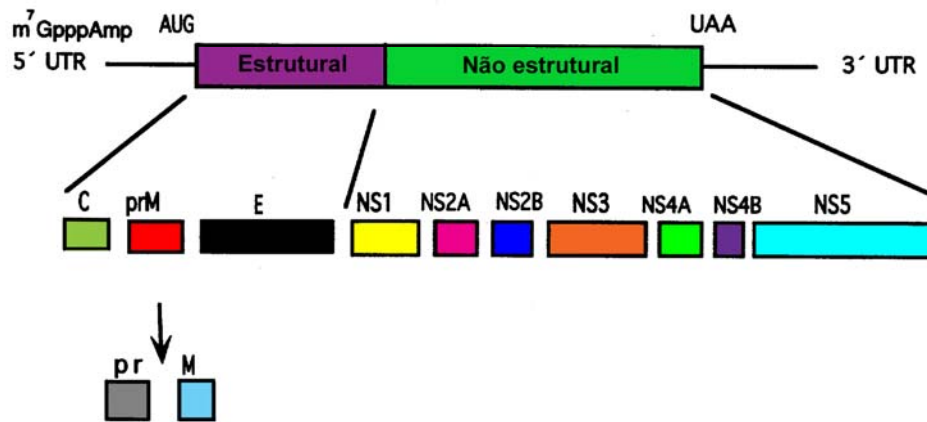


Figura 4: Esquema da estrutura genômica do vírus da febre amarela, mostrando os genes estruturais e não estruturais, as regiões não traduzidas 5'UTR e 3'UTR e a formação das proteínas estruturais C, prM e E e das proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4b e NS5 após o processamento proteolítico. Adaptado de McMinn, 1997.

O vírus da febre amarela, ao contrário do que acontece com o vírus da Dengue, apresenta um único sorotipo (Monath, 2001). Entretanto, baseado na análise de seqüência das regiões pré-M/M, E e região não codante 3' do genoma, foram identificados sete genótipos do vírus da febre amarela. Cinco genótipos são africanos e dois genótipos são sul-americanos. No Brasil, o genótipo I sul-americano é o mais prevalente, apresentando apenas alguns casos isolados do genótipo II sul-americano (von Lindern *et alli*, 2006).

A partícula viral madura é composta por 180 cópias da proteína do capsídeo, que envolve o genoma de RNA formando o nucleocapsídeo. Este encontra-se envelopado por uma bicamada lipídica onde estão ancoradas 180 cópias de cada uma das duas proteínas transmembranas, envelope (E) e membrana (M) (Corver *et alli*, 2003; Op de Beeck *et alli*, 2004). A proteína M é sintetizada como um precursor chamado pré-

M que, uma vez clivado por uma protease celular (uma furino protease, localizada no Complexo de Golgi), leva à dissociação da pré-M da proteína do envelope, promovendo a reorganização da superfície do vírion, permitindo assim, que as projeções da proteína do envelope se tornem mais evidentes, o que resulta na aquisição da habilidade de indução de fusão celular, aglutinação de eritrócitos e infecção eficiente de células susceptíveis. A clivagem de pré-M em M é fundamental para a infectividade viral, pois está intimamente relacionada à fase de entrada do vírus na célula (Keelapang *et alli*, 2004; Op de Beeck *et alli*, 2004).

Na partícula viral madura, a proteína do envelope governa a ligação dos flavivirus a receptores específicos celulares, que são responsáveis pela endocitose mediada por receptor e direcionamento do vírus a um compartimento endossomal. Mudanças conformacionais induzidas pelo baixo pH no interior do endossomo permitem a fusão do envelope viral com a membrana endossomal, e conseqüente liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular. Após a perda do capsídeo, o RNA viral encontra-se livre para replicação e tradução em proteínas (Jones *et alli*, 2003; Vlaycheva *et alli*, 2004). As regiões flanqueadoras 3' e 5' não traduzidas são requeridas para a replicação e tradução do RNA viral (Corver *et alli*, 2003). As proteínas não estruturais se associam para formar o complexo de replicação viral, no qual diversas funções enzimáticas têm sido identificadas, entre elas a função de protease, RNA polimerase RNA dependente, metiltransferase e helicase (Jones *et alli*, 2003). Uma vez formada, a partícula viral brota do retículo endoplasmático e o vírus é levado à superfície celular através da via de exocitose (Pugachev *et alli*, 2004) (Figura 5).

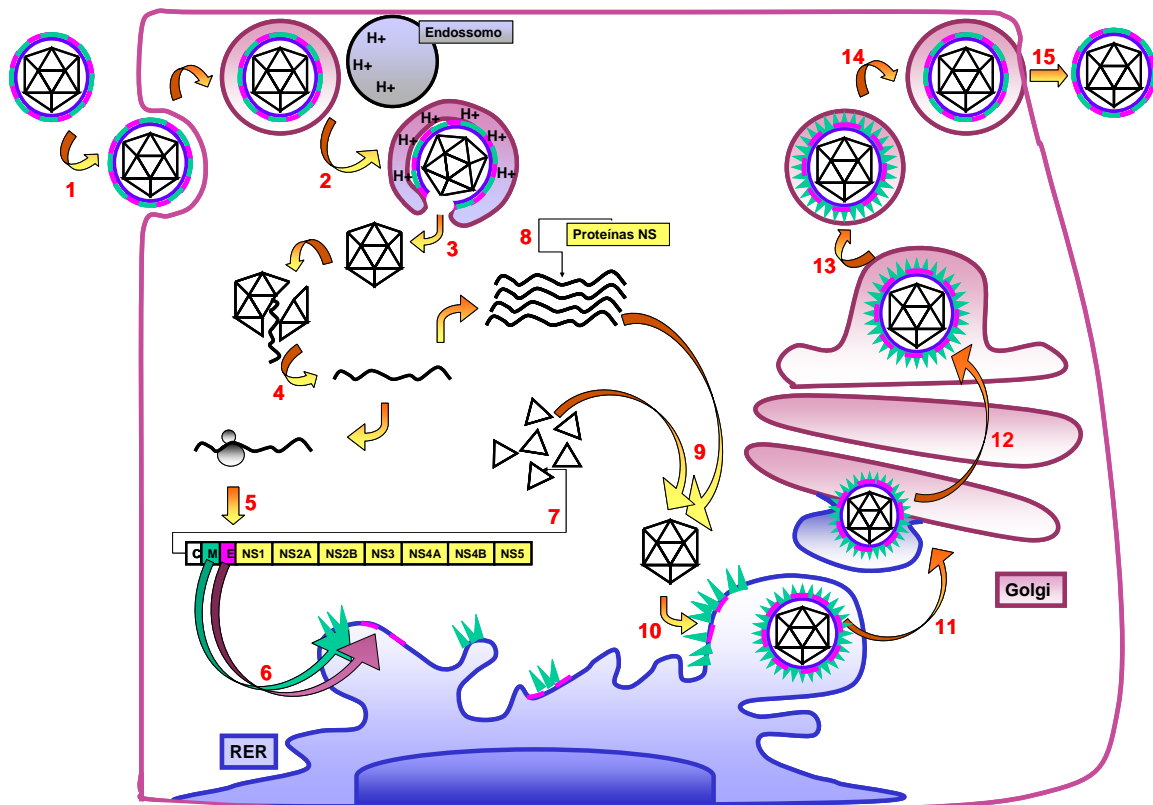


Figura 5: Esquema do ciclo de replicação de flavivírus. **1)** Entrada do vírus por endocitose mediada por receptor. **2)** Fusão do endossomo à vesícula contendo o vírus e diminuição do pH, induzindo a fusão da membrana viral à membrana do endossomo. **3)** Liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular. **4)** Descapsidação e conseqüente liberação do genoma viral. **5)** Tradução do genoma de RNA sentido positivo em uma poliproteína. **6)** Proteína pré-M (prM) e envelope (E) seguem para o retículo endoplasmático rugoso (RER) sendo expressadas em sua membrana. **7)** Proteína do capsídeo é direcionada para formação das subunidades que irão compor o capsídeo. **8)** Proteínas não estruturais atuam na replicação do RNA viral. **9)** Montagem do nucleocapsídeo. **10)** Aquisição da membrana do RER contendo a proteína prM e E. **11)** Vesícula contendo a partícula viral imatura segue do RER para o Complexo de Golgi. **12)** Modificações pós-traducionais ocorrem no Complexo de Golgi. **13)** Vesícula contendo a partícula viral imatura brota do complexo de Golgi em direção à membrana celular. **14)** Maturação da partícula viral. **15)** Vesícula contendo o vírus se funde à membrana celular, liberando o vírus para o exterior da célula. Figura gentilmente cedida por Maria Creuza Barros.

1.4. Manifestações clínicas

O espectro da manifestação clínica da infecção amarela revela-se amplo e variável, abrangendo desde uma doença febril não específica, que só pode ser diagnosticada por testes virológicos, até uma infecção severa, caracterizada por falência do fígado e dos rins, choque e hemorragia (Vasconcelos, 2003; Monath, 2005). A doença pode apresentar-se de forma leve, moderada e severa (também conhecida como clássica), havendo casos de quadros assintomáticos (Vasconcelos, 2002). O período de incubação após a picada do mosquito infectado é de 3 a 6 dias, podendo chegar a 10 dias (Monath, 2001). Na forma leve e moderada, a sintomatologia não é característica e pode ser confundida com outras doenças infecciosas. Na forma leve apresenta, geralmente, febrícula ou febre moderada de início súbito, que pode ou não ser acompanhada de cefaléia, cansaço, indisposição passageira e tontura. Nos casos moderados, ocorre o surgimento abrupto de febre e cefaléia, acompanhados ou não, de náuseas com ou sem vômito, dores musculares e nas articulações. Na forma severa da doença, os pacientes apresentam os três sintomas clássicos que caracterizam a falência hepato-renal: hematêmese (presença de sangue no vômito), icterícia (pigmentação amarelada da pele e da esclerótica, do qual resulta o nome da doença) e oligúria (decréscimo na quantidade de urina secretada) ou anúria (débito urinário inferior a 50mL por dia) (Vasconcelos, 2003). Os sintomas aparecem de forma repentina, inicialmente com febre elevada, calafrios, cefaléia, dores na região lombar, dores musculares generalizadas, náuseas, vômitos e tontura (Monath, 2005).

1.5. Diagnóstico

Não há dificuldades em se fazer o diagnóstico clínico da febre amarela durante uma epidemia, porém quando ocorrem casos esporádicos em moradores ou viajantes, o diagnóstico se torna mais difícil. Isso devido ao fato de que a clínica da febre amarela é facilmente confundida com outras doenças como hepatite viral fulminante (por exemplo, a causada pelo vírus da hepatite E severa), leptospirose, malária severa, febre tifóide, febre do dengue hemorrágico, febre do Vale de Rift, febre hemorrágica da Criméia e Congo e vírus Ebola. Nesses casos é necessário se fazer um diagnóstico diferencial (Vasconcelos, 2002; Monath, 2005). A febre hemorrágica causada pelo vírus Ebola causou pânico como a infecção emergente mais assustadora dos últimos anos, mas cabe ressaltar que a febre amarela é responsável por mil vezes mais doença e morte que o Ebola, visto que o vírus é mais severo em suas injúrias hepáticas (Monath, 2001).

Para detecção do vírus da febre amarela, diferentes exames específicos podem ser realizados utilizando diferentes métodos, entre eles virológicos, identificação de antígenos virais e do RNA viral (Vasconcelos, 2003). Os métodos virológicos consistem no isolamento do vírus, que só pode ser feito durante a fase virêmica, uma vez que os anticorpos neutralizantes produzidos por volta do quinto dia da doença promovem o "clearance" viral (eliminação do agente viral da circulação). O isolamento viral pode ser feito através da inoculação da amostra do paciente em cérebro de camundongos recém-nascidos, inoculação intratorácica de mosquitos e, inoculação de cultura de células animais (Vero, BHK-21, SW13, AP61) e de mosquito (células C6/36 de *Aedes albopictus*) (Monath, 2001; Vasconcelos, 2003; Vera, 2004). Os métodos sorológicos consistem em detectar anticorpos através de testes laboratoriais que incluem ELISA (do

inglês: “Enzyme linked immunosorbent assay”), imunofluorescência, inibição da hemaglutinação e neutralização (Monath, 2005).

O diagnóstico laboratorial de rotina da febre amarela segue os mesmos princípios dos testes para detecção do vírus da Dengue. O método de escolha para isolamento viral é a cultura de células de mosquito C6/36, em especial pelo baixo custo apresentado pela técnica e alta sensibilidade. Após inoculação da amostra suspeita, obtêm-se evidências de replicação viral por volta do quinto ou sétimo dia através da observação de efeitos citopáticos na cultura celular, em especial formação de sincício (células gigantes multinucleadas originadas a partir da fusão de membrana de células infectadas), efeito citopático típico de infecções por flavivirus. Após isolamento, a amostra viral é identificada através de testes de imunofluorescência indireta, usando anticorpos monoclonais ou, como alternativa, testes de fixação de complemento (Vasconcelos, 2002).

O método sorológico de escolha na rotina laboratorial de diagnóstico de Febre amarela é o MAC-ELISA anti-IgM, que permite um diagnóstico rápido em uma amostra sorológica obtida a partir do 5º dia da doença, período esse que coincide com o aparecimento dos primeiros sintomas e a procura do paciente por ajuda médica. Cabe lembrar que a vacina anti-amarílica também induz a produção de IgM e, para que haja uma diferenciação no resultado entre um paciente vacinado e um que está realmente infectado pelo vírus é necessário observar os antecedentes vacinais e o quadro clínico do indivíduo (Vasconcelos, 2003). Por se tratar de um método colorimétrico, é necessário assegurar que os títulos de anticorpos para febre amarela sejam bastante superiores aos títulos de anticorpos para outros flavivirus, uma vez que existem reações cruzadas no reconhecimento de anticorpos entre vírus pertencentes a esse gênero (Antônio Chaib, Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal - LACEN-

DF, comunicação pessoal). Não há tratamento específico para a febre amarela, deve-se administrar medicamentos para minimizar os sintomas da doença, evitando uso de ácido acetil-salicílico e derivados, pois estes podem agravar os fenômenos hemorrágicos (Monath, 2001; Vasconcelos, 2003).

A detecção do RNA viral pode ser realizada através da transcrição do RNA em um DNA complementar (cDNA), pela ação de uma enzima transcriptase reversa, e a amplificação deste material por PCR (do inglês: “Polimerase Chain Reaction”), técnica essa denominada RT-PCR (do inglês “Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction” (Drosten *et alli*, 2003). Porém, esta técnica apresenta custo elevado, e seu uso na rotina laboratorial não está estabelecido nem padronizado, mesmo porque são limitados os laboratórios que possuem estrutura e profissionais capacitados para desenvolvê-la (Vasconcelos *et alli*, 2003).

1.6. Proteína Envelope

A proteína do envelope é a principal proteína estrutural do vírus e acredita-se que tenha papel importante nas funções virais, atuando como um receptor de ligação à célula hospedeira; atividade de fusão de membrana, passo este essencial para a infecção viral, catalisada pelo pH ácido no interior do endossomo; e montagem do vírion (Chang *et alli*, 1995; Ryman *et alli*, 1997). É também, o antígeno viral dominante presente na superfície do vírus, responsável pela hemaglutinação de eritrócitos em pH baixo, reatividade com anticorpos neutralizantes e resposta imunológica do hospedeiro (Desprès *et alli*, 1991a; McMinn *et alli*, 1997). Estudos sugerem que a proteína do envelope apresenta um importante papel na neurovirulência causada pelo vírus, idéia

que pode ser reforçada pelo fato de que mutações nessa proteína podem levar a alterações na virulência (Nickells & Chambers, 2003; Charlier *et alli*, 2004).

1.7. Baculovírus

Os baculovírus são os principais vetores de expressão utilizados em células de inseto. Além disso, apresentam outras aplicações bastante interessantes: são bioinseticidas virais capazes de infectar uma gama de hospedeiros artrópodes, em especial diferentes ordens de insetos, principalmente Lepidóptera, Díptera e Himenóptera (Federici, 1986, 1997); apresentam-se como candidatos promissores a vetores de terapia gênica, sendo capazes de promover uma infecção em hospedeiros não-artrópodes sem que haja replicação e conseqüente risco à biossegurança (Ribeiro & Crook, 1998; Tani *et alli*, 2003). Sua utilização como bioinseticida apresenta inúmeras vantagens frente ao uso dos inseticidas químicos. São de fácil aplicação e disseminação no ambiente, específicos em relação ao hospedeiro e sua patogenicidade restrita aos insetos garante um bom nível de biossegurança ambiental.

O maior programa de utilização de um vírus para o controle biológico de uma praga está estabelecido no Brasil, no controle da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). O baculovírus utilizado neste programa é o *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) (Moscardi, 1999).

1.8. Classificação dos baculovírus

O AgMNPV, assim como o baculovírus mais estudado até o momento, o AcMNPV (*Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*) pertencem à família *Baculoviridae*. Essa família apresenta dois gêneros: os *Granulovirus*, também denominados de *granulosis viruses* (vírus da granulose - GV) e os *Nucleopolyhedrovirus*, também conhecidos como *nuclear polyhedrosis virus* (vírus da poliedrose nuclear - NPV) (Ribeiro & Crook, 1998; Van Regenmortel, *et alli*, 2000). O vírus AcMNPV é o espécie tipo do gênero e teve seu sequenciamento concluído em 1994 (Aires *et alli*, 1994), já o AgMNPV, teve seu sequenciamento recentemente concluído (Oliveira *et alli.*, 2006).

Tanto os NPV quanto GV são constituídos por vírus oclusos em uma oclusão cristalina, de natureza protéica, denominada corpo de oclusão (OB, do inglês: “Occlusion Body”) (Murphy *et alli*, 1995). Nos NPV, os corpos de oclusão, também chamados de poliedros, variam de 0,15 a 15 µm em diâmetro e são compostos principalmente por subunidades de uma proteína denominada poliedrina, de massa molecular por volta de 30.000 Daltons, que corresponde a cerca de 95% do conteúdo protéico do OB (Maruniak, 1986; Bilimoria, 1991). Cada poliedro contém vários vírions, que podem conter apenas um nucleocapsídeo (Single *nucleopolyhedrovirus* – SNPV) ou vários nucleocapsídeos (*multiple nucleopolyhedrovirus* – MNPV) (Van Regenmortel, *et alli*, 2000). Baseado em estudos comparativos de análises filogenéticas com relação ao gene da poliedrina, os NPV podem ser classificados em grupo I ou II (Zanotto *et alli*, 1993).

Os GV apresentam um corpo de oclusão denominado grânulo na forma ovicilíndrica, que possui 0,3 a 0,5 µm de diâmetro (Crook, 1991), e é composto da

proteína granulina, que apresenta massa molecular de aproximadamente 30.000 Daltons. Cada grânulo pode ter um ou raramente dois a três vírions. Os GV ainda são pouco estudados, em especial devido à dificuldade de se estabelecer uma linhagem celular adequada à replicação viral (Winstanley & Crook, 1993). Poucas linhagens de células de inseto foram descritas até o momento (Winstanley & Crook, 1993) e esse vírus apresenta uma restrita gama de hospedeiros (Dwyer & Granados, 1988; Funk & Consigli, 1992), ao contrário dos NPV, que são encontrados em mais de 600 espécies hospedeiras (Federici, 1997) e como cultura de células hospedeiras, diferentes linhagens de células de inseto podem ser utilizadas (Miller, 1997).

1.9. Estrutura do vírion

A origem do termo Baculovírus vem do latim *baculum* que significa bastão, e se refere à forma do capsídeo das partículas virais desta família (O'Reilly *et alli*, 1992; Fields *et alli*, 2001). O genoma do baculovírus é de DNA dupla fita, circular, "supercoiled", com tamanho que varia de 80 e 200 kb (Arif, 1986). Este genoma é envolto pelo capsídeo protéico com forma de bastonete, que apresenta um diâmetro de 40-50 nm, comprimento de 200-400 nm, constituindo a unidade infectiva do vírus (nucleocapsídeo) (O'Reilly *et alli*, 1992). Os vírus oclusos no corpo de oclusão constituem apenas um dos fenótipos apresentados pelos baculovírus e estão presentes na transmissão do vírus de inseto a inseto; o outro fenótipo encontra-se presente na transmissão do vírus de célula a célula e é chamado vírus extracelular ou BV (do inglês: "Budded virus"). O BV e o vírus derivado do corpo de oclusão são genotipicamente idênticos, mas diferem quanto a morfologia e a composição protéica, origem dos

envelopes virais, modo de penetração na célula hospedeira e infectividade (Castro *et alli*, 1999) (Figura 6).

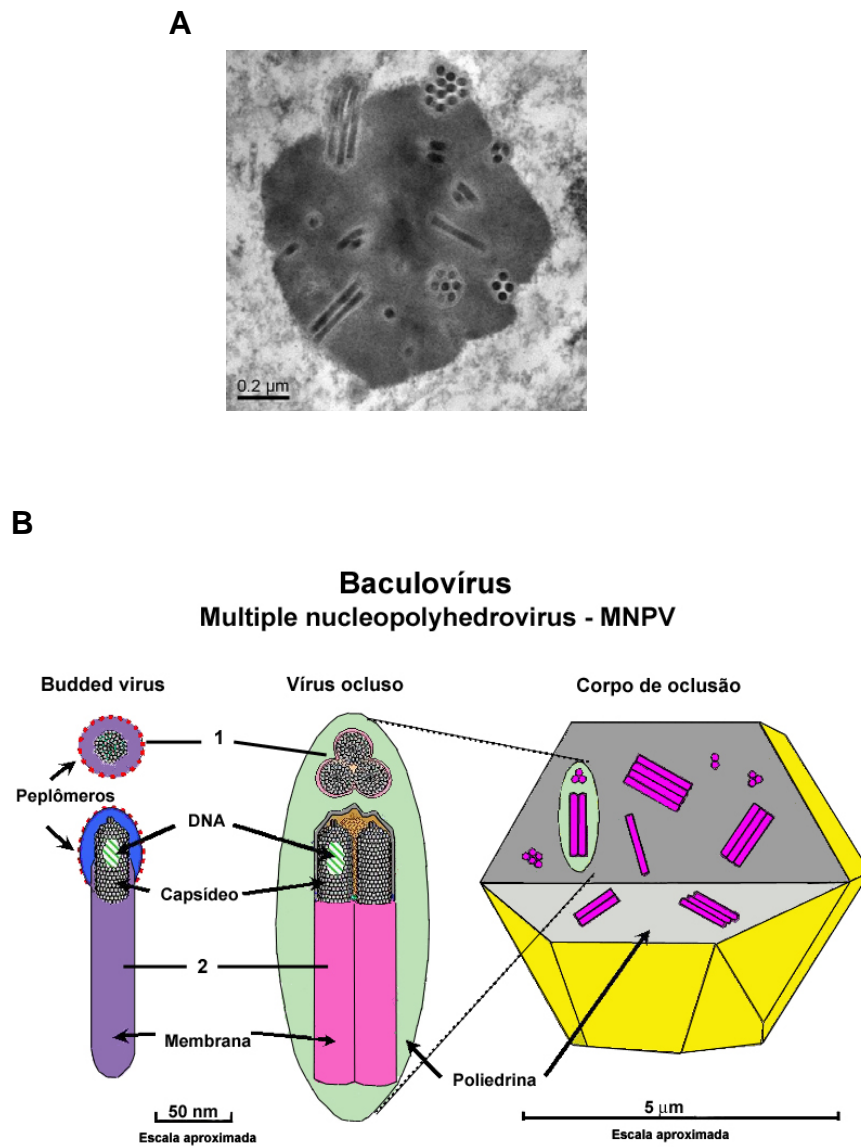


Figura 6: Estrutura dos baculovírus do gênero *Nucleopolyhedrovirus*. **A)** Micrografia eletrônica de transmissão mostrando múltiplas partículas virais envelopadas (vírus oclusos) no interior de um poliedro do vírus AcMNPV (Bergmann M. Ribeiro, dados não publicados). **B)** Esquema da organização interna do poliedro, mostrando em vista transversal (1) e longitudinal (2) os diferentes fenótipos característicos dos baculovírus, o budded vírus e o vírus ocluso (dentro de um corpo de oclusão). Adaptado de <http://en.wikipedia.org/wiki/Baculovirus>

1.10. Modo de infecção *in vivo*

O vírus na forma ocluída, uma vez liberado no ambiente, é fonte de infecção para os insetos. A rota natural de infecção é a ingestão destes OB que, uma vez ingeridos, seguem pelo trato intestinal da lagarta do inseto até o intestino médio, que apresenta pH bastante alcalino (9,5 a 11,5), onde a matriz protéica do corpo de oclusão é dissolvida. Uma vez liberadas, essas partículas virais darão início à infecção denominada primária: os vírions atravessam a membrana peritrófica e os nucleocapsídeos virais se fundem à membrana das microvilosidades das células colunares epiteliais do intestino médio (Benz, 1986; Horton & Burand, 1993); O DNA viral segue para o núcleo, onde é replicado e novos nucleocapsídeos são produzidos. Essas novas partículas virais são transportadas para a região basolateral das células colunares do intestino médio e são liberadas para infectar células do sistema traqueal ou se disseminar pela hemolinfa do inseto. Outra via alternativa é o transporte da partícula viral infectante diretamente para as células do sistema traqueal e/ou hemolinfa. Essa disseminação para outros tecidos caracteriza a infecção secundária e as células epiteliais infectadas produzem o fenótipo BV, que irá infectar outras células por endocitose mediada por receptor e fusão de membrana mediada pela proteína gp64, sendo essa uma estratégia de escape da partícula viral do endossomo e posterior liberação do DNA dentro da célula (Volkman & Hom, 2000).

Após 8 horas do início da infecção, o núcleo torna-se hipertrofiado e uma série de outras modificações ocorrem posteriormente, levando à manifestação de sintomas típicos da infecção por baculovírus, como a perda de apetite, acúmulo de vírus nos núcleos das células epidermais e adiposas, levando ao clareamento da epiderme, parada no desenvolvimento larval, diminuição de movimentos e a morte do inseto em poucos

dias. (Federici, 1997; Willians & Faulkner, 1997) Após a morte do inseto, este se torna um “saco” de poliedros e quando seu tegumento se desintegra e ocorre a liberação dos OB no ambiente, possibilitando a disseminação da infecção para outras lagartas através da ingestão dos OB. A quantidade de OB presente em uma larva no ultimo estágio de infecção, antes da morte, é de até 10^{10} OB nos NPV e 10^{11} OB nos GV. (Payne, 1986) (Figura 7).

O vírus AcMNPV foi primeiramente isolado na lagarta *Autografa californica*, e é espécie tipo do gênero *Nucleopolyhedrovirus*, além de ser considerado o principal modelo de estudo de baculovírus. (Willians & Faulkner, 1997) O AcMNPV foi o primeiro baculovírus a ser seqüenciado e o seu modelo de replicação é caracterizado e aceito como modelo para outros baculovírus. (Ayres *et alli*, 1994) Já o vírus AgMNPV foi isolado em 1972 (Allen & Knell, 1977) e, a partir desse ponto, muitas linhas de pesquisa foram desenvolvidas para definir suas principais características e atividade. É o tipo viral mais utilizado no Brasil como agente de biocontrole e a caracterização de genes desse baculovírus permitiu a realização de análises de filogenia que revelaram uma semelhança do AgMNPV com outros baculovírus (Zanotto *et alli*, 1993). Além disso, o sequenciamento completo de seu genoma, que foi recentemente concluído, permitiu que uma análise filogenética mais completa desse genoma com genomas de outros baculovírus, que revelou sua alta identidade de seqüência com o vírus CfDefNPV (*Choristoneura fumiferana* DEF nucleopolyhedrovirus) (Oliveira *et alli*, 2006).

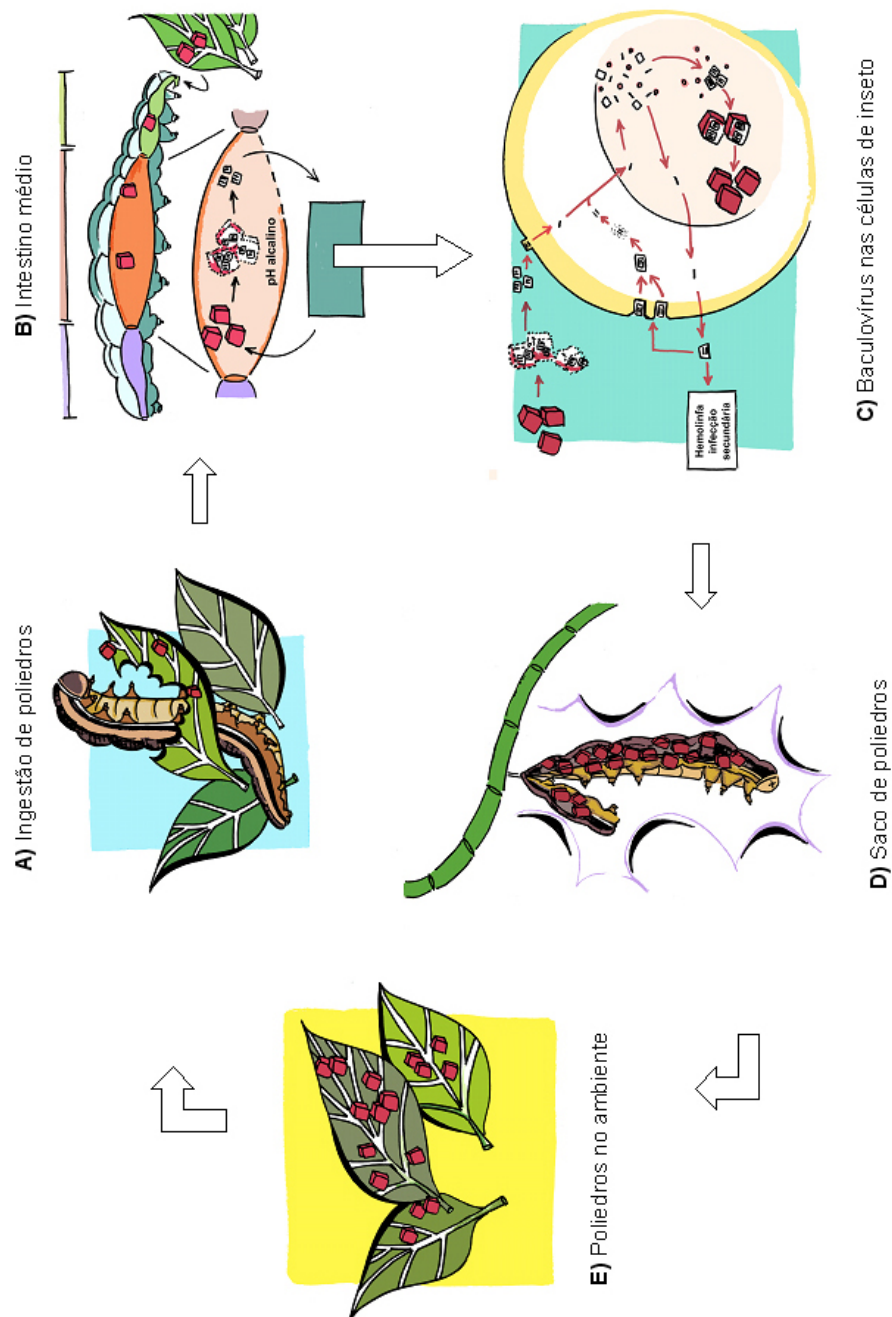


Figura 7: Desenho esquemático mostrando o ciclo de infecção *in vivo* de uma larva de lepidóptera infectada por um baculovírus. Em (A) ocorre a ingestão de poliedros pela larva do inseto e, após ingestão, estes seguem pelo trato digestivo (B) até chegarem ao intestino médio, onde são solubilizados devido ao alto pH e liberam as partículas virais. Com a passagem pela membrana peritrófica, o vírus pode infectar células colunares (caracterizando a infecção primária) e, em seguida, partir para infectar outros tipos celulares permitindo a disseminação do vírus pela hemolinfa (caracterizando a infecção secundária) (C). A infecção se espalha, causando a morte da larva (D) e ela se torna um “saco” de poliedros que, quando se desintegra, libera os poliedros no ambiente tornando-se fonte de infecção para outras lagartas (E).

1.11. Modo de infecção *in vitro*: infecção de culturas de células de inseto

Na replicação *in vitro*, a produção de BV começa por volta de 12 a 24 horas pós-infecção (h p. i.), enquanto a produção de OB, ocorre desde a fase final de infecção (a partir de 18 h p. i.) até a morte celular por volta de 72 h p. i. Os BV dos NPVs se caracterizam pela presença de um nucleocapsídeo simples, no interior de um envelope oriundo da membrana plasmática, que apresenta em sua superfície projeções denominadas peplômeros, compostas por glicoproteínas virais, a gp64 para os NPVs do grupo I e a proteína F para os NPVs do grupo II, que são responsáveis por intermediar a endocitose do vírus através de um receptor (O'Reilly *et alli*, 1992; Lung *et alli*, 2002).

A expressão dos genes no decorrer da infecção com o baculovírus AcMNPV pode ser classificada de acordo com o tempo de infecção. Inicialmente, o vírus se prepara para posterior replicação do genoma e essa fase é chamada de inicial (ou “early”). A fase em que ocorre a expressão de genes concomitante com a replicação do DNA viral é denominada tardia (ou “late”). Além disso, as fases inicial e tardia podem ser subdivididas em fase inicial imediata (ou “immediately early”), que corresponde à expressão de genes nas primeiras horas de infecção e a fase de expressão muito tardia (ou “very late”) de genes que são expressos a partir de 18 h p. i. Na fase inicial são expressos genes, rapidamente reconhecidos pelo complexo de transcrição celular (por isso são expressos inicialmente), que darão origem a proteínas que atuam como fatores de transcrição e a proteínas necessárias para a replicação do DNA viral. A expressão desses genes ocorre a partir de 30 min p. i. até em torno de 8 h p. i. (Passareli & Miller, 1993; Xu *et alli*, 1995; Todd *et alli*, 1996; Gross & Shuman, 1998; Guarino *et alli*, 1998). Durante esta fase, o vírus depende da célula hospedeira para posterior replicação

viral, pois os genes necessários para esta etapa dependem da RNA polimerase II do hospedeiro para sua expressão (Lu & Miller, 1997).

Após o início da replicação do DNA viral, inicia-se a fase tardia, que compreende a produção de proteínas essenciais para a montagem das partículas virais extracelulares (BV). Essa fase dura até aproximadamente 24 h p. i. e é nela que ocorre interrupção da produção de proteínas celulares e grande produção de BV. (Lu & Miller, 1997) Os genes tardios também estão relacionados com o processo de oclusão e com uma produção exacerbada da poliedrina, presente na composição do OB. Aproximadamente 72 h p. i. ocorre lise celular, indicando o estágio máximo da fase tardia (Jarvis *et alli*, 1996; Thiem *et alli*, 1996; Lu & Miller, 1997).

O sistema de expressão baculovírus tem como fundamento, a inserção de genes heterólogos no genoma do baculovírus sob o comando de um promotor forte, que geralmente é o promotor da poliedrina. Essas propriedades fazem com que os baculovírus, atualmente, sejam abundantemente utilizados como vetores de expressão em células de inseto (O'Reilly *et alli*, 1992).

1.12. Baculovírus como sistema de expressão

Os baculovírus apresentam características que os tornam vantajosos como vetores de expressão, tais como: produção de proteínas heterólogas em quantidades elevadas permitindo a obtenção, normalmente, de 10 a 100 mg por litro de cultura chegando até a um grama da proteína de interesse por litro de cultura; facilidade de manipulação em relação aos demais tipos de vetores de expressão (Castro *et alli*, 1999), sendo essa característica bastante interessante, pois torna o sistema acessível e popular

(Kost *et alli*, 2005); capacidade de inserção de genes de tamanhos grandes (fato esse favorecido pela organização do capsídeo que permite acolher grandes DNA genômicos) (O'Reilly *et alli*, 1992). Além do mais, apresenta modificações pós-traducionais semelhantes às que ocorrem em células de mamíferos, permitindo a produção de proteínas biologicamente ativas. (Castro *et alli*, 1999)

Desde a introdução dos genes da β -galactosidase (Pennock *et alli*, 1984) e do β -interferon (Smith *et alli*, 1983) em células de *Spodoptera frugiperda*, empregando-se baculovírus, uma gama de proteínas já foi expressada em células de inseto. Esse sistema de expressão pode ser utilizado com diferentes objetivos, que variam desde avaliar as características funcionais até avaliar as características estruturais de proteínas heterólogas, e seu uso para expressar proteínas de flavivirus tem sido bastante estudado. Marx *et alli*, (2001), expressou a proteína E truncada do vírus da encefalite transmitida por carrapato (“tick-borne encephalitis” - TBE) utilizando baculovírus com a finalidade de produzir de forma mais rápida e prática antígenos virais recombinantes, que serão utilizados em diagnóstico. Baumet *et alli*, (1998), demonstrou que é possível expressar proteínas estruturais do vírus da hepatite C, permitindo a montagem da partícula viral, utilizando o sistema baculovírus, o que representa uma potencial descoberta para o desenvolvimento de uma vacina. Bielefeldt-Ohmann *et alli*, (1997), expressou uma molécula híbrida com duas partes truncadas do envelope dos sorotipos 2 e 3 de dengue utilizando o sistema baculovírus para avaliar uma resposta imune efetiva, o que seria de grande interesse na confecção de uma possível vacina. Desprès *et alli*, (1991b) caracterizou as proteínas E e NS1 do vírus da febre amarela através da expressão em células Vero e em células de *Spodoptera frugiperda*, demonstrando que as proteínas recombinantes apresentam-se bastante similares mas não idênticas àquelas produzidas durante a infecção pelo vírus autêntico. Desprès *et alli*, (1991a) avaliou a imunidade

protetora contra o vírus da febre amarela em camundongos, através de imunização utilizando baculovírus recombinantes com os genes E e NS1. Shiu *et alli*, (1991), demonstrou que a proteína E da febre amarela expressada por um baculovírus recombinante é antigenicamente indistinguível da proteína viral original.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho visou a expressão da proteína do envelope do vírus da febre amarela em células de inseto utilizando Baculovírus como vetor de expressão. Objetivando a futura utilização da proteína recombinante para fins de diagnóstico ou mesmo a produção de vacinas utilizando partes virais.

2.1. ESTRATÉGIAS

As estratégias baseiam-se na clonagem do gene do envelope em diferentes vetores, seguida da construção de dois baculovírus recombinantes vSynYFE e vAgYFE e posterior análise da expressão do gene do envelope em células de inseto infectadas com os vírus recombinantes, bem como a avaliação da expressão das proteínas recombinantes por SDS-PAGE e imuno-deteção.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção do gene do Envelope

RNA total de células de cérebro de camundongo infectadas com o vírus da Febre Amarela isolado de um paciente infectado (cedidas pelo Instituto Evandro Chagas fornecidas gentilmente por Antônio Chaib do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal - LACEN-DF) foi extraído, liofilizado e ressuscitado em 1mL de água “mili-Q” "depada", ou seja, que sofreu tratamento com dietilpircarbonato (DEPC), o que torna a água livre de RNases. O método utilizado para a extração foi o do Trizol, seguindo recomendações do fabricante (Gibco-BRL), e uma vez obtido o RNA, procedeu-se à realização de uma RT-PCR. Para a confecção do cDNA (fita de DNA complementar) utilizou-se o Kit M-MLV-RT (Invitrogen) de acordo as instruções do fabricante e o oligonucleotídeo YFE2460R (Figura 8) confeccionado pela Invitrogen. (Tabela 1).

O cDNA obtido foi utilizado como molde para uma reação de PCR. Foram utilizados 5 µL do tampão de reação 10 X da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1 µL da mistura dos quatro dNTPs (de uma solução estoque 10 mM), 1 µL do oligonucleotídeo YFE2460R (de um estoque de 10 µM) utilizado para confecção do cDNA, 1 µL do oligonucleotídeo (de um estoque de 10 µM) YFE878F (Figura 8) sintetizado pela Invitrogen (Tabela 1), 5 µL do cDNA diluído 2:3, 5U (unidades) da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e água “milli-Q” para um volume final de 50 µL. Foi utilizado o seguinte programa: 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.

Oligo YFE878F

1 gTgACAgATCTgACCATTgCCTACCTTGTGGGAAGCAAC

40 atgacgcaacgagtcgtgattgccctactggctcttggctgttgg
M T Q R V V I A L L V L A V G

85 ccggcctactcagctcactgcattggaattactgacagggatttc
P A Y S A H C I G I T D R D F

130 attgagggggtgcatggaggaacttgggtttcagctaccctggag
I E G V H G G T W V S A T L E

175 caagacaagtgtgtcactggttatggcccctgacaagccttcattg
Q D K C V T V M A P D K P S L

220 gacatctcactagagacagtagccattgatagacctgagggc
D I S L E T V A I D R P A E A

265 aggaaagtgtgttacaatgcagttctcactcatgtgaagattaat
R K V C Y N A V L T H V K I N

310 gacaagtgccccagcactggagaggcccacctagctgaagagaac
D K C P S T G E A H L A E E N

355 gaaggggacaatgctgcaagcgcacttattctgatagaggctgg
E G D N A C K R T Y S D R G W

400 ggcaatggctgtggcctatttgggaaaggagcattgtggcatgc
G N G C G L F G K G S I V A C

445 gccaaattcacttgtgccaaatccatgagtttgtttgaggttgat
A K F T C A K S M S L F E V D

490 cagacaaaattcagtatgtcatcagagcacaattgcatgtaggg
Q T K I Q Y V I R A Q L H V G

535 gccaaagcaggaaaattggaataccagcattaagactctcaagttt
A K Q E N W N T S I K T L K F

580 gatgccctgtcaggctcccaggaagtcgagttcattgggtatgga
D A L S G S Q E V E F I G Y G

625 aaagctacactggaatgccaggtgcaaactgcggtggactttgg
K A T L E C Q V Q T A V D F G

670 aacagttacatagctgagatggaaacagagagctggatagtggac
N S Y I A E M E T E S W I V D

715 agacagtgggccaggacttgaccctgccatggcagagtggaagt
R Q W A Q D L T L P W Q S G S

760 ggcggggtgtggagagagatgcatcatcttgtcgaatttgaacct
G G V W R E M H H L V E F E P

805 ccgcatgccgccactatcagagtactggccctgggaaaccaggaa
P H A A T I R V L A L G N Q E

850 ggctccttgaaaacagctcttactggcgcaatgagggttacaaag
G S L K T A L T G A M R V T K

895 **gacacaaatgacaacaacctttacaaactacatgggtggacatggt**
D T N D N N L Y K L H G G H V

940 **tcttgacagagtgaattgtcagctttgacactcaaggggacatcc**
S C R V K L S A L T L K G T S

985 **tacaaaatgatgactgacaaaatgtttttgtcaagaaccaact**
Y K I C T D K M F F V K N P T

1030 **gacactggccatggcactggtgtgatgcaggtgaaagtgcacaaa**
D T G H G T V V M Q V K V P K

1075 **ggagccccctgcaggattccagtgatagtagctgatgatcttaca**
G A P C R I P V I V A D D L T

1120 **gcggaatcaataaaggcattttggttacagttaaccccatcgcc**
A A I N K G I L V T V N P I A

1165 **tcaaccaatgatgatgaagtgctgattgaggtgaaccacctttt**
S T N D D E V L I E V N P P F

1210 **ggagacagctacattatcggtggaagaggagattcacgtctcact**
G D S Y I I V G R G D S R L T

1255 **taccagtggcacaagagggaagctcaataggaagtgttctcact**
Y Q W H K E G S S I G K L F T

1300 **cagaccatgaaaggcgtggaacgcctggcctcatgggagacgct**
Q T M K G V E R L A V M G D V

1345 **gcctgggatttcagctccgctggagggttcttcaactcgggtggg**
A W D F S S A G G F F T S V G

1390 **aaaggaattcatacgggtgtttggctctgcctttcaggggctat**
K G I H T V F G S A F Q G L F

1435 **ggcggcttgaactggataacaaaggatcatcatggggcggtactt**
G G L N W I T K V I M G A V L

1480 **atatgggttggcatcaacacaagaacatgacaatgtccatgagc**
I W V G I N T R N M T M S M S

1525 **atgatcttggtaggagtgatcatgatgtttttgtctctaggagtt**
M I L V G V I M M F L S L G V

1570 **ggggcggatTaaggagATctg** 1589
G A D *
←
Oligo YFE2460R

Figura 8: Seqüência gênica da região do gene do envelope do vírus da febre amarela isolado da cepa 17D utilizada na vacina da Febre Amarela. Bases realçadas em azul: Gene do envelope. A partir dessa seqüência foram desenhados os oligonucleotídeos **YFE878F** e **YFE2460R** (bases realçadas em vermelho). Os nucleotídeos em negrito representam as modificações nos oligonucleotídeos para introdução do sítio de restrição *Bgl* II, e os nucleotídeos sublinhados representam o sítio de terminação Taa.

Tabela 1: Lista dos oligonucleotídeos utilizados no trabalho

Oligonucleotídeo	Sequência (5'→3')	Utilização/Localização
YFE878F	GTGACAGATCTGACCATTGCC	PCR; localizado a 96 nucleotídeos do começo do gene do envelope.
YFE2460R	CAGATCTCCTTAATCCGCCCAACTCC	RT-PCR e PCR; posicionado a +15 nucleotídeos do final do gene do envelope.
polR	CAACGCACAGAATCTAG	PCR; Posicionado à 56 nucleotídeos do sítio de terminação do gene da poliedrina do vírus AcMNPV.
orf 603	ACAGCCATTGTAATGAGACG	PCR; Posicionado de +8 a -11 bases do início da orf 603 do vírus AcMNPV.

O resultado da PCR foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 0,8% segundo protocolo descrito em Sambrook *et alli*, (1989). A banda com o tamanho correspondente ao gene do envelope (1.600 pb) foi extraída do gel, eluída e purificada utilizando-se o Kit Sephaglas (SephaglasTM Bandprep Kit, Amersham), de acordo com as indicações do fabricante.

3.2. Clonagem do gene *env* no plasmídeo pGEM-T Easy (Promega) e sequenciamento

Com o fragmento purificado de *env* foi realizada reação de ligação com o plasmídeo pGEM-T Easy (Kit pGEM[®]-T Easy Vector Systems, Promega) (Figura 9) de acordo com as instruções do fabricante. A ligação foi utilizada para transformação em células competentes *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen) utilizando o método de choque térmico, de acordo com protocolo de transformação bacteriana, descrito em Sambrook *et alli*, (1989). A bactéria contendo o plasmídeo de interesse, denominado pGEMYFE, foi cultivada em meio L-Broth (triptona 10g/L; extrato de levedura 5g/L; NaCl 5g/L) e o DNA plasmidial foi extraído segundo protocolo de lise alcalina em pequena escala, de acordo com Sambrook *et alli*, (1989).

A confirmação da clonagem pode ser feita através de seleção em meio com antibiótico (uma vez que o pGEM-T Easy possui o gene que confere resistência a ampicilina e somente as bactérias transformadas crescem em meio com ampicilina), digestão utilizando as enzimas de restrição *Eco* RI com o objetivo de liberar o fragmento de interesse e, através de sequenciamento, utilizando seqüenciador automático MEGA BACE 1000 da Amersham Bioscience pertencente ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB). O resultado do sequenciamento foi analisado através da pesquisa de similaridades de seqüências depositadas em um banco de dados, utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) disponível gratuitamente no sítio da Internet www.ncbi.nlm.nih.gov.

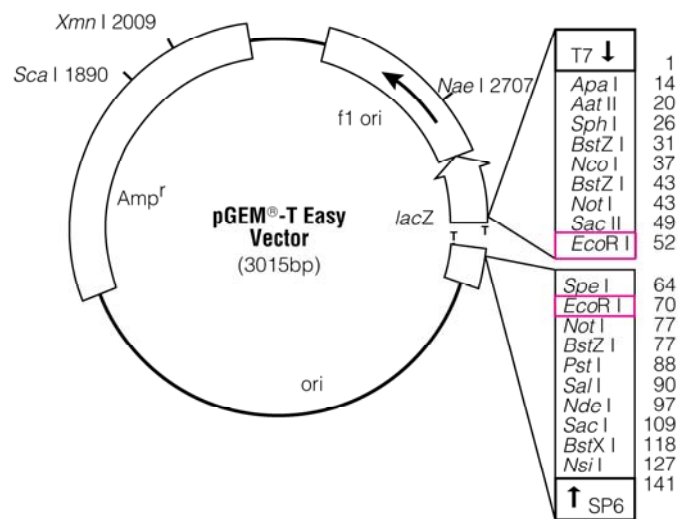


Figura 9: Plasmídeo pGEM-T Easy (Promega). Sítio de multiclonagem mostrado à direita; em rosa o sítio de restrição *Eco* RI, que foi usado para confirmação da inserção do gene de interesse. Adaptado de Technical Manual pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems da Promega

Com o objetivo de obter grande quantidade do plasmídeo pGEMYFE, as bactérias transformadas foram cultivadas em larga escala, através da inoculação em 500 mL de meio L-Broth (previamente descrito no item 3.2) contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubação a 37°C com agitação por 16h. Após esse período, as células foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 min em centrífuga J2-MI, rotor JA 14, Beckman. Em seguida, as células concentradas (pellet) foram ressuspensas em 5 mL de solução I, também chamado tampão de Lise (50 mM glicose; 25 mM Tris-HCl pH 8.0; 10 mM EDTA). Foram adicionados 10 mL da solução II (SDS alcalino composto por 0.2 N NaOH; 1% SDS) e o sistema incubado por 10 min à temperatura ambiente. Foram então, adicionado 7,5 mL da solução III (acetato de potássio 3 M pH 4.8) e o sistema incubado 10 min no gelo. Posteriormente, o material foi centrifugado (centrífuga J2-MI, rotor JA 14, Beckman) a 5.000 rpm, por 15 min. O sobrenadante foi cuidadosamente filtrado com pano fralda e foram adicionados 13 mL (correspondente a 0,6 X o volume)

de isopropanol. Em seguida, foi feita nova centrifugação a 5.000 rpm, por 15 min (centrífuga J2-MI, rotor JA 14, Beckman). O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 10 mL de etanol 70% gelado. A amostra foi centrifugada a 5.000 rpm, por 5 min (centrífuga J2-MI, rotor JA 14, Beckman), o sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco a temperatura ambiente. O material foi então, ressuscitado em 1 mL de água “milli-Q”. Foi feita uma purificação por polietilenoglicol de acordo com protocolo descrito em Sambrook *et alli*, (1989).

Foi realizada uma reação de digestão com o DNA purificado do plasmídeo pGEMYFE, a enzima de restrição utilizada foi a *Eco* RI (Promega), sítio presente no plasmídeo flanqueando o inserto, o protocolo seguido foi o do fabricante. A digestão foi avaliada em eletroforese em gel de agarose 0,8%. A banda de aproximadamente 1.600 pb referente ao gene do envelope foi extraída do gel, eluída e purificadas utilizando-se o Kit Sephaglas (SephaglasTM Bandprep Kit Amersham), de acordo com as indicações do fabricante.

3.3. Construção do vetor pSynYFE

Para a construção do vetor pSynYFE, o inserto purificado extraído do plasmídeo pGEMYFE foi ligado ao plasmídeo pSynXIV VI⁺X3 (Figura 10) sob o comando de dois promotores em tandem, *pXIV* (que é uma seqüência modificada do promotor da poliedrina) e *pSyn*. (Wang *et alli*, 1991) Este plasmídeo havia sido previamente digerido com *Eco* RI (Promega, seguiu-se protocolo do fabricante) e desfosforilado por reação utilizando a enzima CIAP - Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. Para a ligação foi utilizada enzima de ligação T4 DNA ligase (Promega) segundo protocolo do fabricante.

Foi feita transformação e os clones foram selecionados pela resistência a ampicilina (pSynXIV VI⁺X3 também possui gene que confere resistência a este antibiótico) e posterior extração de plasmídeos em larga escala, previamente descrito no item 3.2. Para confirmar a presença do gene do envelope da febre amarela no plasmídeo, foi realizada uma restrição com a enzima de restrição *Eco* RI (Promega), pois este sítio está presente no plasmídeo flanqueando o inserto. Protocolo seguido de acordo com as indicações do fabricante. O perfil de restrição foi avaliado em eletroforese em gel de agarose 0,8%.

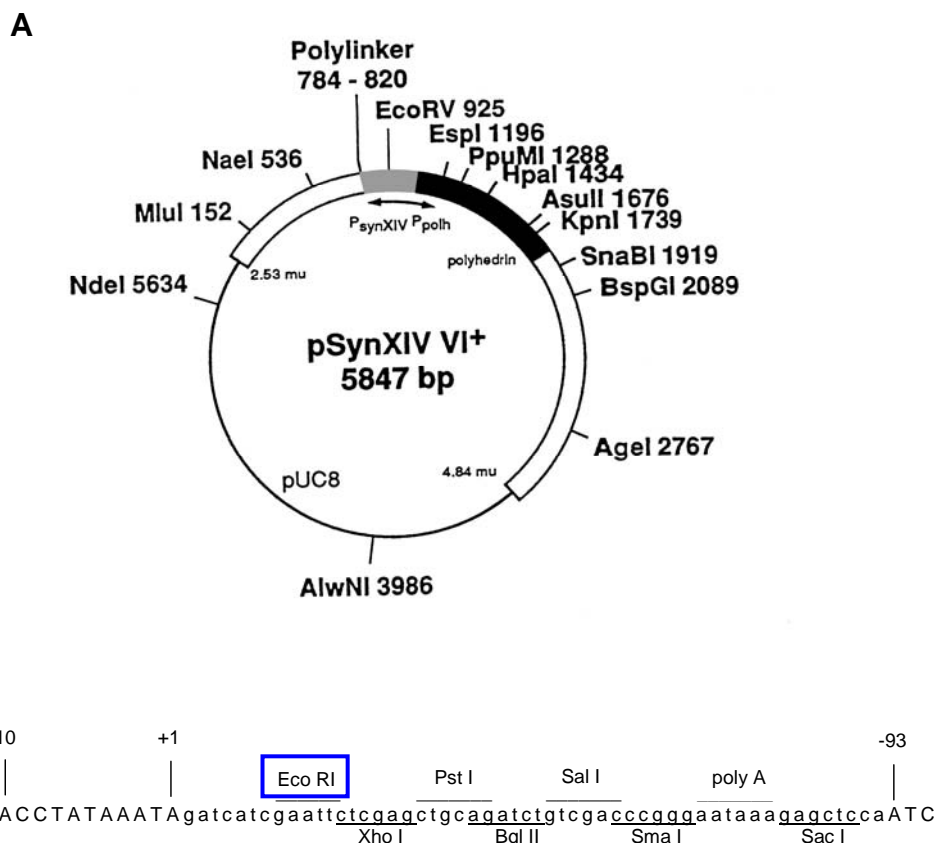


Figura 10: Plasmídeo pSynXIV VI⁺X3. **A)** Mapa do plasmídeo pSynXIV VI⁺X3, mostrando sítio múltiplo de clonagem ("polylinker"), promotores (*Ppolh*, *pSyn* e *pXIV*) e gene da poliedrina (polyhedrin). **B)** Esquema mostrando seqüência e sítios de restrição presentes no "polylinker". Em azul, sítio de restrição *Eco* RI escolhido para clonagem do gene *env*. Adaptado de O'Reilly *et alli*, (1992).

A correta direção da inserção do gene no plasmídeo é necessária para posterior expressão da proteína. Assim, para confirmar a direção do inserto clonado foram feitas duas reações de PCR. Em uma das reações foram utilizados os oligonucleotídeos polR e YFE2460R (ambos descritos na tabela 1) e na outra reação foram utilizados os oligonucleotídeos YFE878F e o orf603 (também descritos na tabela 1). O protocolo da reação e o programa utilizados foram previamente descritos no item 3.1. com algumas alterações: os oligonucleotídeos (anteriormente descritos) e o molde, que neste caso foram 2 μ L (50 ng) do DNA plasmidial em larga escala do pSynYFE diluído 1:10. O resultado das PCR foi avaliado em gel de agarose 0,8%.

3.4. Construção do vetor p2100XIVYFE

O DNA purificado do pSynYFE foi utilizado para uma restrição com as enzimas de restrição *Eco* RV e *Sac* I, com o objetivo de retirar o cassete contendo o gene do envelope e o promotor *pXIV*. Para a reação foram utilizados 20 μ L do DNA (5 μ g) purificado, 6 μ L do tampão 10 X One for All (Pharmacia), 10 U de *Eco* RV (Pharmacia), 10U de *Sac* I (Pharmacia) e água “milli-Q” para um volume final de 30 μ L. A amostra foi incubada a 37°C por 3 h. O perfil de restrição foi avaliada em gel de agarose 0,8%. Para obtenção de terminações abruptas do fragmento digerido, uma reação de Klenow (Promega) foi conduzida com o resto da digestão, de acordo com as indicações do fabricante. Os fragmentos da digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, o fragmento de 1.700 pb referente ao tamanho do cassete foi extraída, eluída e purificada utilizando o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham) seguindo as recomendações do fabricante.

O plasmídeo p2100 (Hallwass *et alli*, 2005) (Figura 11), foi digerido com a enzima de restrição *Eco* RV (Promega), segundo instruções do fabricante e posteriormente foi realizada desfosforilação através de reação utilizando a enzima CIAP - Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. Foi feita uma reação de ligação do cassete purificado com o plasmídeo p2100 desfosforilado utilizando a enzima de ligação T4 DNA ligase (Promega) segundo protocolo do fabricante. O plasmídeo p2100 possui gene de resistência a ampicilina, dessa forma, a transformação e a seleção dos clones positivos foram realizadas da mesma maneira como foi descrito no item 3.2., assim como a extração de plasmídeos em larga escala.

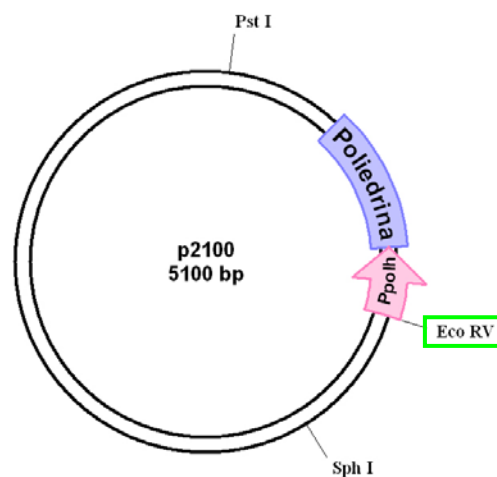


Figura 11: Plasmídeo p2100. Mapa do plasmídeo p2100, mostrando poliedrina, promotor da poliedrina (Ppolh) e os sítios de restrição *Eco* RV, *Pst* I e *Sph* I. Em verde, sítio de restrição *Eco* RV escolhido para clonagem do cassete (oriundo do plasmídeo pSynYFE) contendo o gene do envelope e o promotor pXIV.

A confirmação da presença do gene do envelope foi realizada através de uma reação de digestão do DNA plasmidial purificado (agora denominado p2100XIVYFE) com a enzima de restrição *Bgl* II, segundo protocolo do fabricante (Promega). Para confirmar a presença e a direção do cassete foi realizada uma restrição do

p2100XVIYFE com a enzima de restrição *Pst* I (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. As restrições foram avaliadas através de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.5. Construção dos baculovírus recombinantes vSynYFE e vAgYFE

O vírus vSynVI-gal foi linearizado com a enzima de restrição *Bsu* 36I (New England BioLabs) segundo indicações do fabricante. Essa digestão é necessária, pois, o vírus vSynVI-gal linearizado não é infectivo para as células de inseto, o que ocorre somente quando o mesmo se encontra na forma circular (Kitts *et alli*, 1990). Células de inseto, linhagem BTI-Tn5B1-4 (Granados *et alli*, 1994) ($0,5 \times 10^6$ células) foram transferidas para uma placa de 35 mm de diâmetro por pelo menos 1 h, para a formação de monocamadas de células. Foi realizada a co-transfecção com o DNA do plasmídeo pSynYFE o DNA do vírus vSynVI-gal linearizado da seguinte forma: em uma placa de 35 mm foi adicionado 0,5 mL de meio TC-100 (Gibco BRL) sem soro fetal bovino e 10 μ g de lipossomo (Cellfectin da Invitrogen); em outra placa foi misturado o DNA do pSynYFE (1 μ g), o DNA do vírus vSynVI-gal (0,5 μ g) e 0,5 mL do meio TC-100 sem soro fetal bovino. Após 10 min, a mistura do plasmídeo com o vírus foi adicionada ao meio TC-100 sem soro contendo lipossomo. O material foi incubado 10 min à temperatura ambiente. Durante esse período, o sobrenadante das células BTI-Tn5B1-4 foi removido e após os 10 min a mistura DNA/lipossomo foi adicionada às células e incubada à temperatura ambiente por 3 h. Ao final desse período foram adicionados 2 mL de meio TC-100 contendo 10% de soro fetal bovino e as células foram incubadas a 27°C por 7 dias.

A co-transfecção permite que, no interior das células de inseto, ocorra recombinação homóloga entre regiões flanqueadoras do gene de interesse, no vetor de transferência, e as regiões homólogas no genoma do vírus vSynVI-gal, que flanqueiam o gene da β -galactosidase e o genoma circular. Desta forma, após a recombinação homóloga, somente o vírus recombinante estará na forma circular e infectiva, facilitando a purificação do recombinante. O vírus vSynVI-gal não possui o gene da poliedrina (*polh*), o que não permite a formação de poliedros durante a infecção. Quando ocorre a recombinação homóloga entre o DNA plasmidial e o DNA viral o vírus passa a apresentar o gene *polh*, permitindo então que o vírus recombinante produza poliedros. Para isolar o vírus recombinante vSynYFE, foi feita purificação viral pelo método de diluição em placa de 96 poços (protocolo descrito em O'Reilly *et alli*, 1992), utilizando o sobrenadante das células transfectadas (após sete dias da co-transfecção). Após esse período, pode ser visualizada, através de microscopia óptica, a formação de poliedros e sincícios, características essenciais que confirmam a presença desse vírus recombinante.

Para a construção do vírus recombinante vAgYFE, realizou-se também co-transfecção com o plasmídeo p2100XVIYFE e o vírus vAgGalA2. O protocolo seguido foi o mesmo previamente descrito neste item, alterando-se o tipo celular, que no caso foi UFL-AG-286 (Sieburth & Maruniak, 1988). O isolamento do vírus recombinante vAgYFE foi feito através de purificação pelo método de diluição em placa de 96 poços, de acordo com protocolo descrito em O'Reilly *et alli*, (1992). Dentro das células de inseto, ocorreu recombinação homóloga entre regiões flanqueadoras do gene de interesse, no vetor de transferência, e as regiões homólogas no genoma do vírus vAgGalA2, que possui o gene *lac-Z* no lugar do gene *polh*. Sete dias pós-infecção foi

detectada a presença de poliedros, visualizados por microscopia óptica, caracterizando a presença desse vírus recombinante.

Células BTI-Tn5B1-4 (1×10^6 células/placa de 35 mm) foram infectadas com os vírus recombinantes purificados vSynYFE e vAgYFE para realização da extração de DNA viral em pequena escala, segundo protocolo descrito em O'Reilly *et alli*, (1992). O DNA viral purificado foi usado para uma reação de PCR com o objetivo de comprovar a presença do gene do envelope no vírus recombinante. Como controle positivo foram realizadas PCR com DNA dos plasmídeos pSynYFE e p2100XVIYFE e como controle negativo o DNA foi substituído por água “milli-Q”. Para as reações de PCR foi utilizado 1 μ L do DNA viral (20 ng) e os demais reagentes usados da mesma forma como descrito no item 3.1., assim como o programa, que também foi o mesmo. Os resultados das PCRs foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.6. Análise da expressão da proteína Env através de SDS-PAGE e Imuno-marcação

Para a avaliação da expressão da proteína Env, células de inseto foram infectadas pelos baculovírus recombinantes vSynYFE. A análise da expressão da proteína Env pelos baculovírus recombinantes vSYNYFE e vAgYFE foi feita pela avaliação de extrato de tecido adiposo lagartas infectadas.

Células BTI-Tn5B1-4 (1×10^6 células/placa de 35 mm) infectadas (72 h p. i.) com o 10 pfu/células do vírus vSynYFE foram centrifugadas (centrífuga J2-MI, rotor JA 14, Beckman) a 4000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi armazenado como estoque e o pellet (sedimento de células) foi ressuspensionado em 100 μ L de tampão de fosfato salino - PBS (136 mM NaCl, 1,4 mM KH_2PO_4 , 2,6 mM KCl, 8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,

pH 7.4). Como controle, foram utilizadas células BTI-Tn5B1-4 infectadas com os vírus vSynCAT (baculovírus contendo gene *cathepsina-L*, Welzel, 2006), vSynNS1 (vírus contendo o gene *ns1* do vírus da Febre Amarela, Ramos *et alli.*(2002), os vírus selvagens vSynVI-gal, AcMNPV, AgMNPV, e células não infectadas (células BTI-Tn5B1-4 "mock" infectadas).

Lagartas de *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis* (Figura 12) no terceiro e quarto instar, utilizadas para obtenção de extrato de tecido adiposo, foram gentilmente cedidas pela Dra. Rose Gomes Monnerat e Dra. Maria Elita Batista de Castro (EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia). As lagartas foram, então, inoculadas com aproximadamente 10-15 μ L do estoque de BV (aproximadamente 10^8 pfu/mL) utilizando-se uma micro-seringa de 1 mL, e alimentadas com dieta artificial.(62,5 g de feijão, 31,2 g de levedo de cerveja, 50 g de germe de trigo, 35 g de agar, 50 g de proteína de soja, 75 g de leite em pó, 3 g de ácido ascórbico, 1,5 g de ácido sórbico, 2,5 g de nipagin, 3 mL de formol 40%, 5 mL de solução vitamínica)

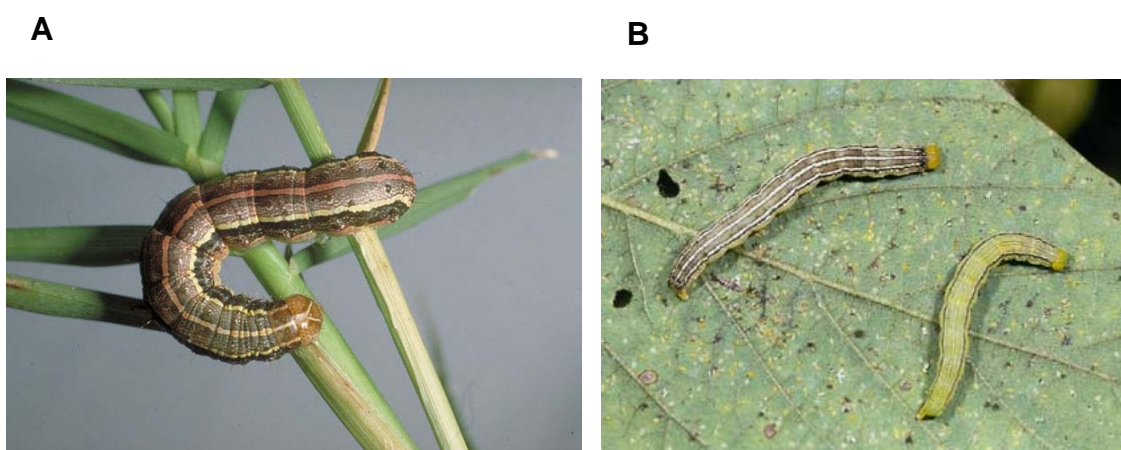


Figura 12: Fotos mostrando lagartas utilizadas neste trabalho. A) Lagarta de *Spodoptera frugiperda* Adaptado de <http://insects.tamu.edu/extension/youth/bug/bug102.html> B) Lagarta de *Anticarsia gemmatalis*. Adaptado de <http://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/agricultura/aa-insectos/anticarsia-gemmatalis-01.htm>

Para extração do tecido adiposo, lagartas de *S. frugiperda* inoculadas com vSynYFE e vSynYFNS1, *A. gemmatalis* inoculadas com vAgYFE e, como controle, *A. gemmatalis* inoculadas com o vírus selvagem vAgGalA2 e não inoculadas (como "mock" infectadas) foram incubadas por 72h. Após esse período, foi retirado o tecido adiposo das lagartas e imediatamente homogeneizado em uma solução contendo inibidores de proteases (PMSF 1 mM, EGTA 40 mM e EDTA 100 mM), filtrado em seringa contendo lâ de vidro e armazenado a -80°C (O'Reilly *et alli.*, 1992). Extrato de tecido adiposo de lagartas de *S. frugiperda* infectadas com o vírus recombinante vAcDENS1 (baculovírus recombinante expressando as proteínas Env e NS1 do vírus do Dengue) também foram utilizadas como controle (Barros *et alli.*, 2006)

Todas as amostras (extrato de células e extrato de tecido adiposo) foram aliquotadas e a elas foi adicionado tampão de amostra de proteínas (1 mL de 0,5 M Tris-HCl, 800 µL de glicerol, 1,6 mL de SDS 10% (p/v), 400 µL de 2-mercaptoetanol, 400 µL de azul de bromofenol 1% (p/v) e 3,8 mL de água destilada) na proporção 1:1 e incubado a 95° C por 5 min. A seguir foram avaliadas através de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE) segundo protocolo descrito em Laemmli (1970). Foram preparados três géis: dois para serem corados e fixados em solução de 40 % de metanol e 10 % de ácido acético e Comassie blue 0,1 %, por aproximadamente 16 h e descorado em solução de 40 % de metanol e 10% de ácido acético por 4 h, sob leve agitação; outro para transferência das proteínas para uma membrana de Nitrocelulose (Gibco BRL - Life Technologies), para o experimento de imuno-deteção de proteínas ("western-blot")

A transferência das proteínas para a membrana de Nitrocelulose foi feita com auxílio do equipamento Trans-Blot® SD - Semi Dry Transfer Cell, para transferência semi-seca (Bio-Rad) segundo as instruções do fabricante. Foi usado o tampão de

transferência Bjerrum and Schafer-Nielsen (48 mM de Tris; 39 mM de glicina; 20 % metanol, pH 9,2). Para verificar a presença de amostra na membrana foi usado corante Ponceau, que destaca a presença de proteínas e é facilmente removido após lavagem com água destilada e, principalmente, não interfere na reação de imuno-marcação. Após a retirada do corante, a membrana foi bloqueada com solução PBS 1X e 3 % de leite em pó desnatado, adicionado de 0,05 g de azida sódica (para evitar contaminação) durante 16 h à temperatura ambiente.

Após esse período, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS/Tween (0,05 %) com o objetivo de retirar o excesso de solução de bloqueio. Em seguida, a membrana foi colocada por uma 1h em solução PBS/albumina bovina (BSA) 0,5 % adicionada do anticorpo primário policlonal anti-Dengue diluído 1:500 (Rabbit anti-Dengue Type 1, 2, 3, 4 - Bidesign). A solução contendo o anticorpo foi descartada e a membrana lavada 3 vezes com PBS/Tween (0,05 %). Foi então, colocada durante uma 1h em solução PBS/BSA 0,5 % contendo o anti-IgG de coelho diluído 1:3.000 (anticorpos que reconhecem IgGs de coelho) conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma). Descartou-se a solução e a membrana foi novamente lavada 3 vezes com PBS/Tween (0,05 %). Após a lavagem a membrana ficou embebida, com agitação suave, no tampão da enzima fosfatase alcalina, que foi descartado após 5 min. A solução reveladora (NBT/BCIP da Roche), que é o substrato da fosfatase alcalina, foi adicionada à membrana e foi removida com sucessivas lavagens com água destilada somente após a marcação. O momento de interromper a reação é crucial para evitar marcação inespecífica ou alterações na qualidade do resultado.

4. RESULTADOS

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

Reação de RT-PCR, com oligonucleotídeos específicos, foi realizada com o RNA do vírus da febre amarela obtido de células de cérebro de camundongo infectadas, de acordo com procedimento descrito em Material e Métodos. O resultado obtido foi avaliado em eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com Brometo de Etídeo, apresentando um fragmento de aproximadamente 1.600 pb referente ao gene *env*, confirmando a amplificação do mesmo (oligonucleotídeos YFE2460R e YFE878F) (Figura 13).

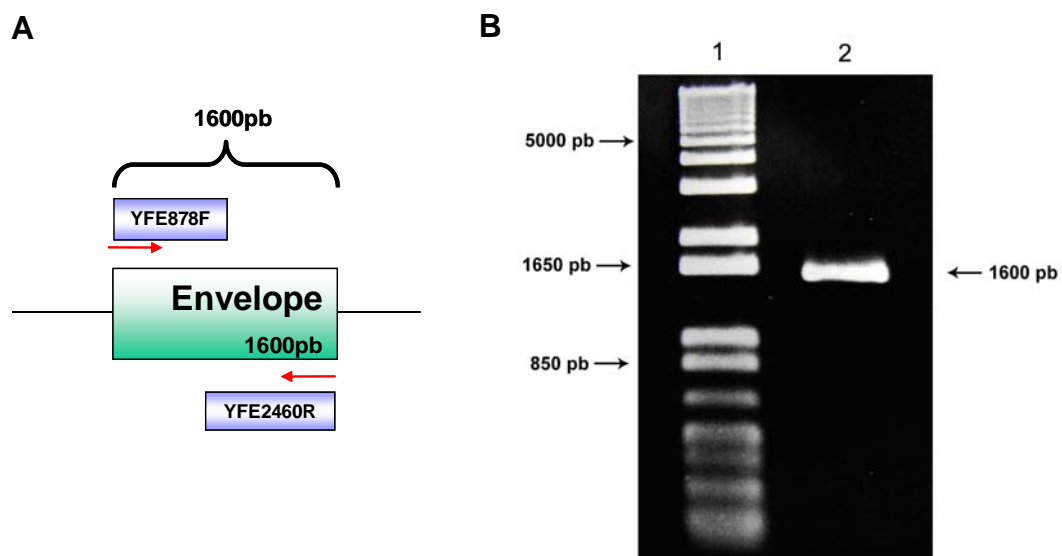


Figura 13: Amplificação do gene do envelope do vírus da febre amarela por RT-PCR. **A)** Esquema mostrando posição dos oligonucleotídeos **YFE2460R** e **YFE878F** no gene *env*. **B)** Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando produto de amplificação do RT-PCR (poço 2) utilizando os oligonucleotídeos **YFE2460R** e **YFE878F**. A seta a direita indica um fragmento de 1.600 pb referente ao tamanho do gene *env*. Poço 1: Marcador DNA ladder 1Kb plus da Invitrogen, setas à esquerda mostram o tamanho de algumas bandas do marcador.

4.2. Clonagem do gene *env* no plasmídeo pGEM-T Easy (Promega) e sequenciamento

Foi realizada clonagem do fragmento obtido por RT-PCR (1.600 pb), referente ao gene *env* no plasmídeo pGEM-T Easy (Promega). Após transformação e amplificação dos clones positivos de pGEMYFE, o DNA plasmidial foi digerido com *Eco* RI. O resultado obtido, avaliado em gel de agarose 0,8%, corado com Brometo de Etídeo, demonstrou a correta liberação do inserto de 1.600 pb referente ao gene *env* (Figura 14). O plasmídeo pGEMYFE foi utilizado para o sequenciamento do gene *env* para confirmar a presença do inserto. As extremidades do fragmento foram sequenciadas e a análise das seqüências confirmou a clonagem do gene de interesse (dados não mostrados)

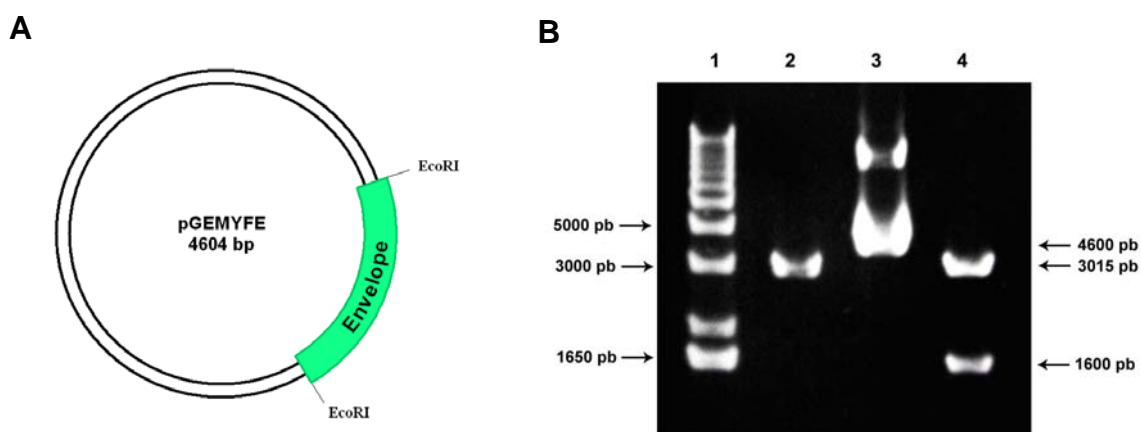


Figura 14: Clonagem gene *env* no vetor pGEM-T Easy. **A)** Esquema mostrando mapa do plasmídeo pGEMYFE. **B)** Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Poço 1: Marcador DNA ladder 1Kb plus (Invitrogen). As setas à esquerda mostram o tamanho de algumas bandas do marcador. Poço 2: plasmídeo pGEM-T Easy sem o inserto, apresentando fragmento de 3.015 pb. Poço 3: plasmídeo pGEMYFE não digerido, apresentando fragmento de 4.600 pb. Poço 4: plasmídeo pGEMYFE digerido com *Eco* RI, apresentando duas bandas, uma de 3.015 pb referente ao plasmídeo pGEM-T Easy e outra de 1.600 pb referente ao gene *env*.

4.3. Obtenção do vetor de transferência pSynYFE

Para construção do vetor pSynYFE o fragmento de 1.600 pb (gene *env*) obtido após digestão do plasmídeo pGEMYFE com *Eco* RI, foi ligado ao plasmídeo pSynXIV VI⁺X3 digerido (*Eco* RI) e desfosforilado. A confirmação da clonagem se deu através de digestão com *Eco* RI e a confirmação da direção do inserto através de amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos orf 603, YFE878F, polR e YFE2460R (Tabela 1) (Figura 15).

4.4. Obtenção do vetor p2100XIVYFE

O plasmídeo pGEMYFE foi digerido com *Eco* RV e *Sac* I, e o produto da digestão (cassete contendo o promotor pXIV e o gene *env*) visto na Figura 16, foi tratado com Klenow e ligado ao plasmídeo p2100, previamente digerido com *Eco* RV e desfosforilado, dando origem ao plasmídeo p2100XIVYFE. A confirmação da presença do cassete foi feita através de digestão com *Bgl* II e a verificação da direção foi demonstrada através de restrição com *Pst* I (Figura 17).

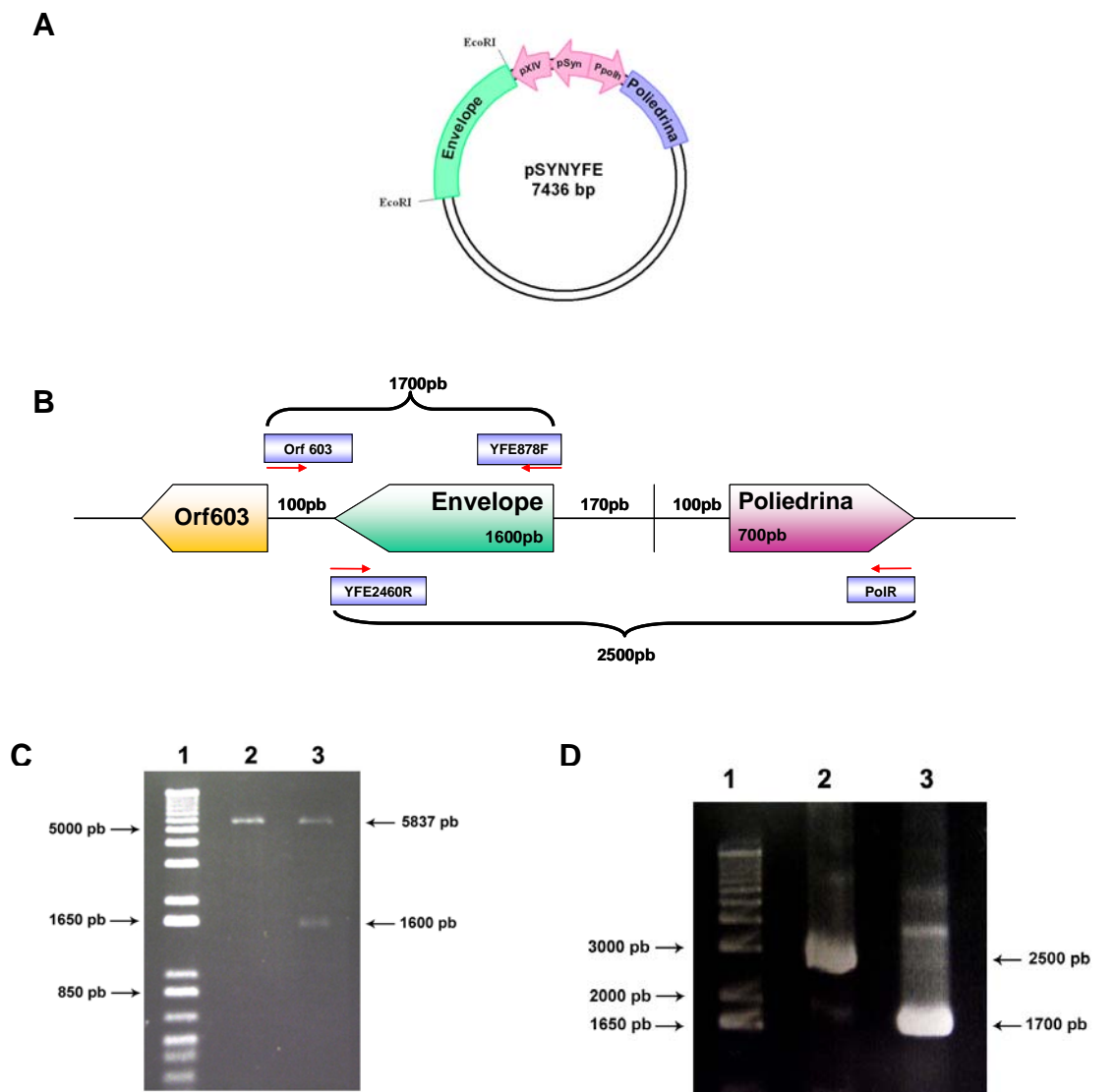


Figura 15: Clonagem do gene *env* no vetor de transferência pSynXIV VI⁺X3. **A)** Esquema mostrando mapa do plasmídeo pSynYFE, o gene *env*, o gene da poliedrina e os promotores *pXIV*, *pSyn* e *Ppolh*. **B)** Esquema mostrando a posição de anelamento dos oligonucleotídeos **orf 603**, **YFE878F**, **YFE2460R** e **polIR** no plasmídeo pSynYFE. **C)** Eletroforese em gel de agarose 0,8%, mostrando no poço 1: Marcador DNA ladder 1Kb plus (Invitrogen). As setas à esquerda mostram o tamanho de algumas bandas do marcador. Poço 2: plasmídeo pSynXIV VI⁺X3 linearizado, sem o inserto, apresentando tamanho de 5.837 pb. Poço 3: plasmídeo pSynYFE digerido com *Eco* RI, apresentando duas bandas, uma de 5.837 pb referente ao plasmídeo e outra de 1.600 pb referente ao gene *env*. **D)** Eletroforese em gel de agarose 0,8% para confirmar direção do gene *env* no vetor de transferência. Poço 1: Marcador DNA ladder 1Kb plus (Invitrogen). As setas à esquerda mostram o tamanho de algumas bandas do marcador. Poço 2: PCR utilizando oligonucleotídeos **polIR** e **YFE2460R**, evidenciando uma banda esperada de 2.500 pb. Poço 3: PCR utilizando oligonucleotídeos **orf 603** e **YFE878F**, evidenciando uma banda esperada de 1.700 pb.

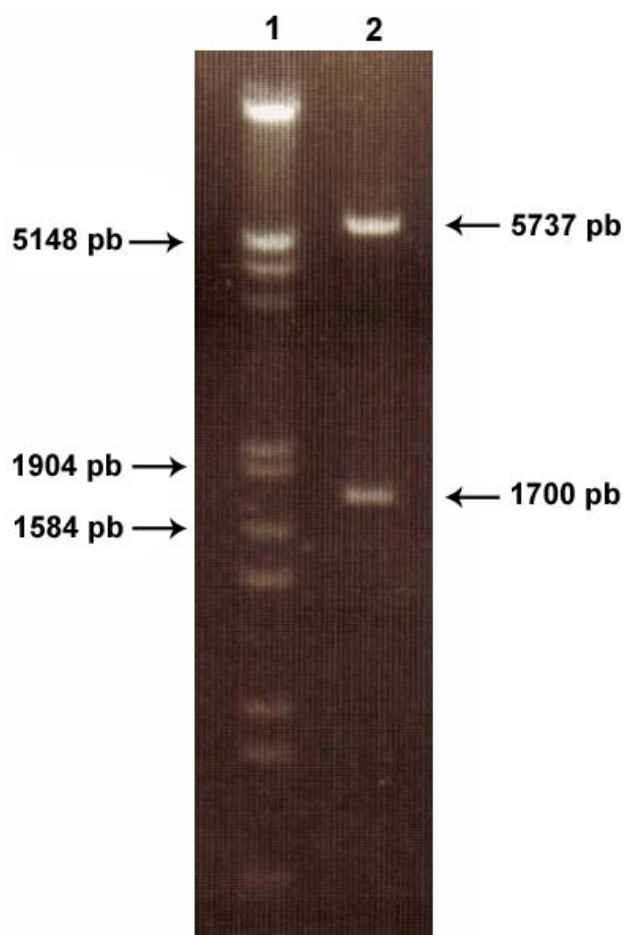


Figura 16: Obtenção do cassete contendo o promotor *pXIV* e o gene *env*. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Poço 1: Marcador Lambda Hind III/Eco RI (Promega). Poço 2: Plasmídeo pSynYFE digerido com *Eco* RV e *Sac* I contendo duas bandas, uma de 5.737 pb referente ao plasmídeo e outra de 1.700 pb referente ao cassete *pXIV-env*.

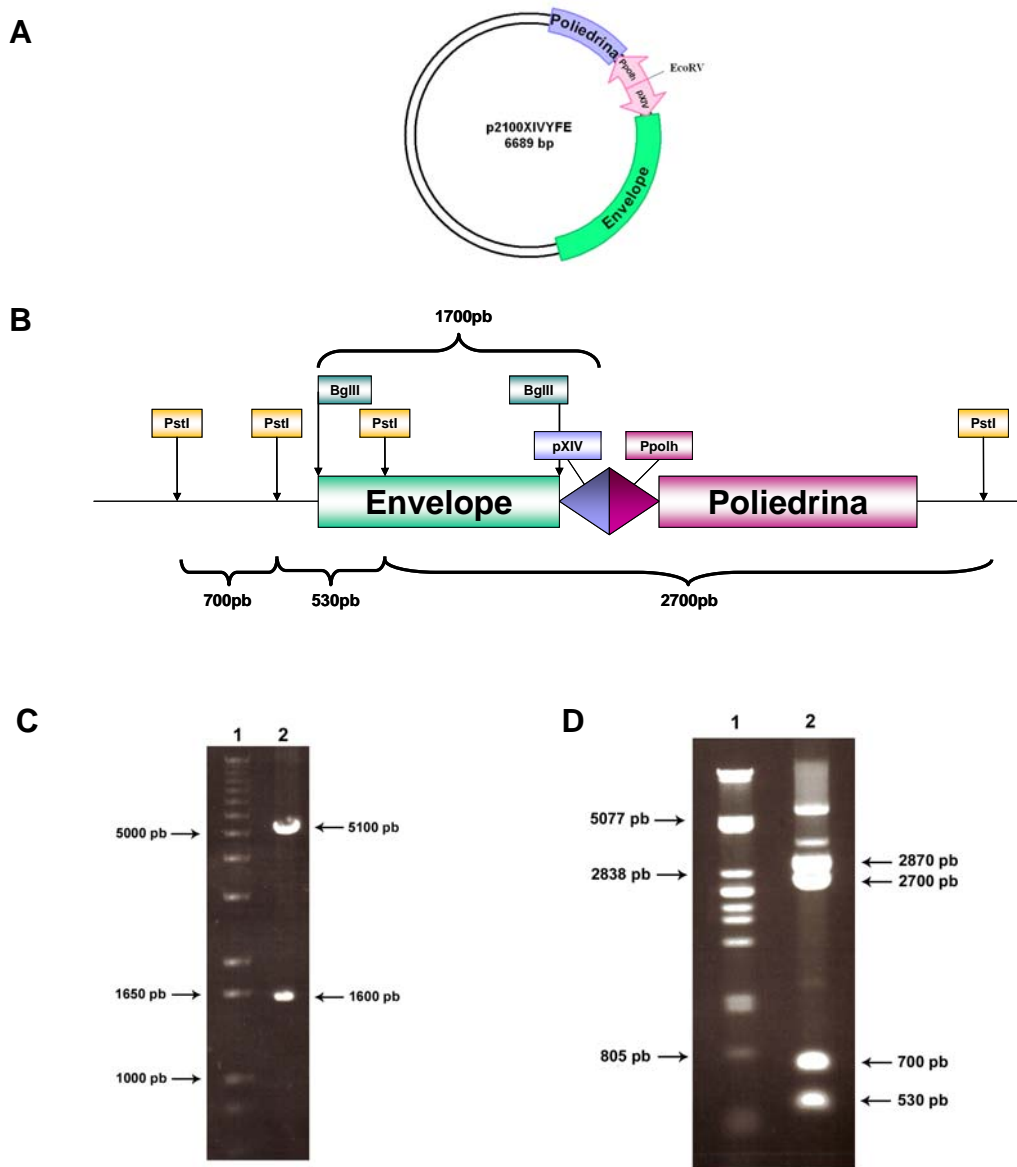


Figura 17: Clonagem do cassete contendo o promotor *pXIV* e o gene *env* no vetor de transferência p2100.

A) Esquema mostrando mapa do plasmídeo p2100XIVYFE, o gene *env*, o gene da poliedrina e os promotores *pXIV* e *Ppolh*. **B)** Esquema mostrando a posição dos sítios de restrição *Pst* I e *Bgl* II no plasmídeo p2100XIVYFE. **C)** Eletroforese em gel de agarose 0,8% para confirmar a presença do gene *env*. Poço 1: Marcador DNA ladder 1Kb plus (Invitrogen). As setas à esquerda mostram o tamanho de algumas bandas do marcador. Poço 2: Plasmídeo p2100XIVYFE digerido com *Bgl* II contendo duas bandas, uma de 5.100 pb referente ao plasmídeo e outra de 1.600 pb referente ao gene *env*. **D)** Eletroforese em gel de agarose 0,8% para confirmar a direção do inserto. Poço 1: Marcador (DNA do fago lambda da Promega digerido com *Pst* I) As setas à esquerda mostram o tamanho de algumas bandas do marcador. Poço 2: p2100XIVYFE digerido com *Pst* I, liberando quatro fragmentos de 530, 700, 2.700 e, 2.870 pb, que confirmam a direção do inserto de acordo com a presença de sítios para *Pst* I no plasmídeo (ver esquema em B).

4.5. Obtenção dos baculovírus recombinantes vSynYFE e vAgYFE

O vetor pSynYFE, que contém o gene do envelope foi co-transfectado com o DNA do vírus vSynVI-gal em células BTI-Tn5B1-4, permitindo que ocorresse, no interior das células, a recombinação homóloga entre regiões do plasmídeo vetor e o genoma do vírus. Após a recombinação o gene *env* foi colocado sob o comando do promotor pXIV (promotor da poliedrina modificado, Wang *et alli*, 1991) o que permite que o vírus recombinante vSynYFE seja expresso paralelamente com a expressão da poliedrina. (Figura 18) Posteriormente, o vírus foi isolado através da observação por microscopia óptica de OB, nas células infectadas com o sobrenadante da co-tranfecção e das diluições em placa de 96 poços (O'Reilly *et alli*, 1992). Também foi possível visualizar por microscopia óptica o efeito citopático característico da febre amarela: a formação de sincícios (Figura 19).

O vetor p2100XIVYFE, que contém tanto o gene *env* quanto o gene da poliedrina (*polh*), foi co-transfectado com o DNA do vírus vAgGalA2 em células UFL-AG-286. Ocorreu recombinação homóloga, no interior das células, entre regiões do plasmídeo vetor e o genoma do vírus. (Figura 20) O isolamento do vírus recombinante vAgYFE foi feito da mesma forma que para o vírus recombinantes vSynYFE (descrito anteriormente) (Figura 19).

A confirmação da presença do gene do envelope nos vírus recombinantes vSynYFE e vAgYFE foi realizada através de reação de PCR com o DNA dos vírus utilizando os oligonucleotídeos YFE2460R e YFE878F. (Figura 21)

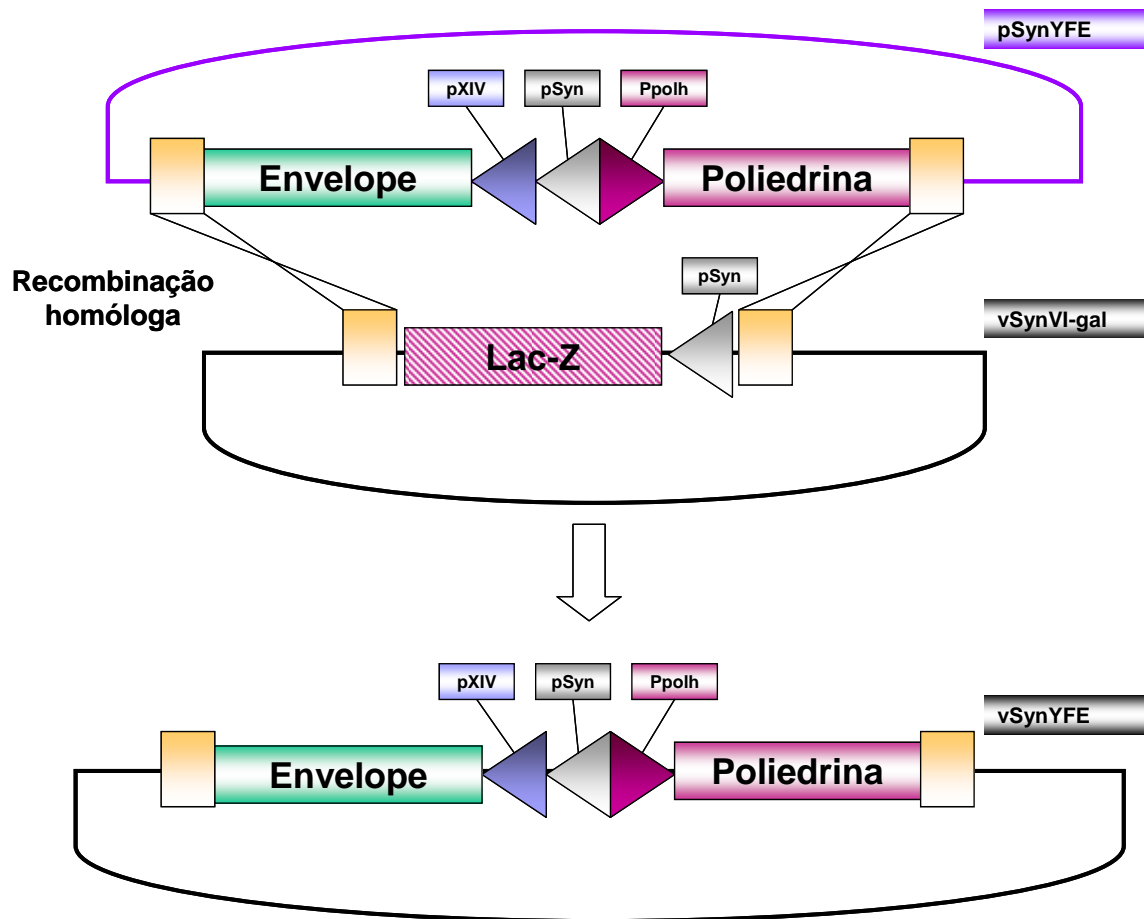


Figura 18: Esquema de construção do vírus recombinante vSynYFE. O esquema mostra o lócus do gene da poliedrina no plasmídeo pSynYFE e a mesma região (contendo o *lac-Z*) no vírus vSynVI-gal. O plasmídeo pSynYFE, que contém o gene do envelope do vírus da febre amarela, foi co-transfectado juntamente com o DNA do vírus vSynVI-gal, para a construção do vírus recombinante vSynYFE. Os genes da poliedrina, envelope e *lac-Z* estão indicados na figura, assim como os promotores *pXIV*, *pSyn* e *Ppolh* que controlam a expressão desses genes.

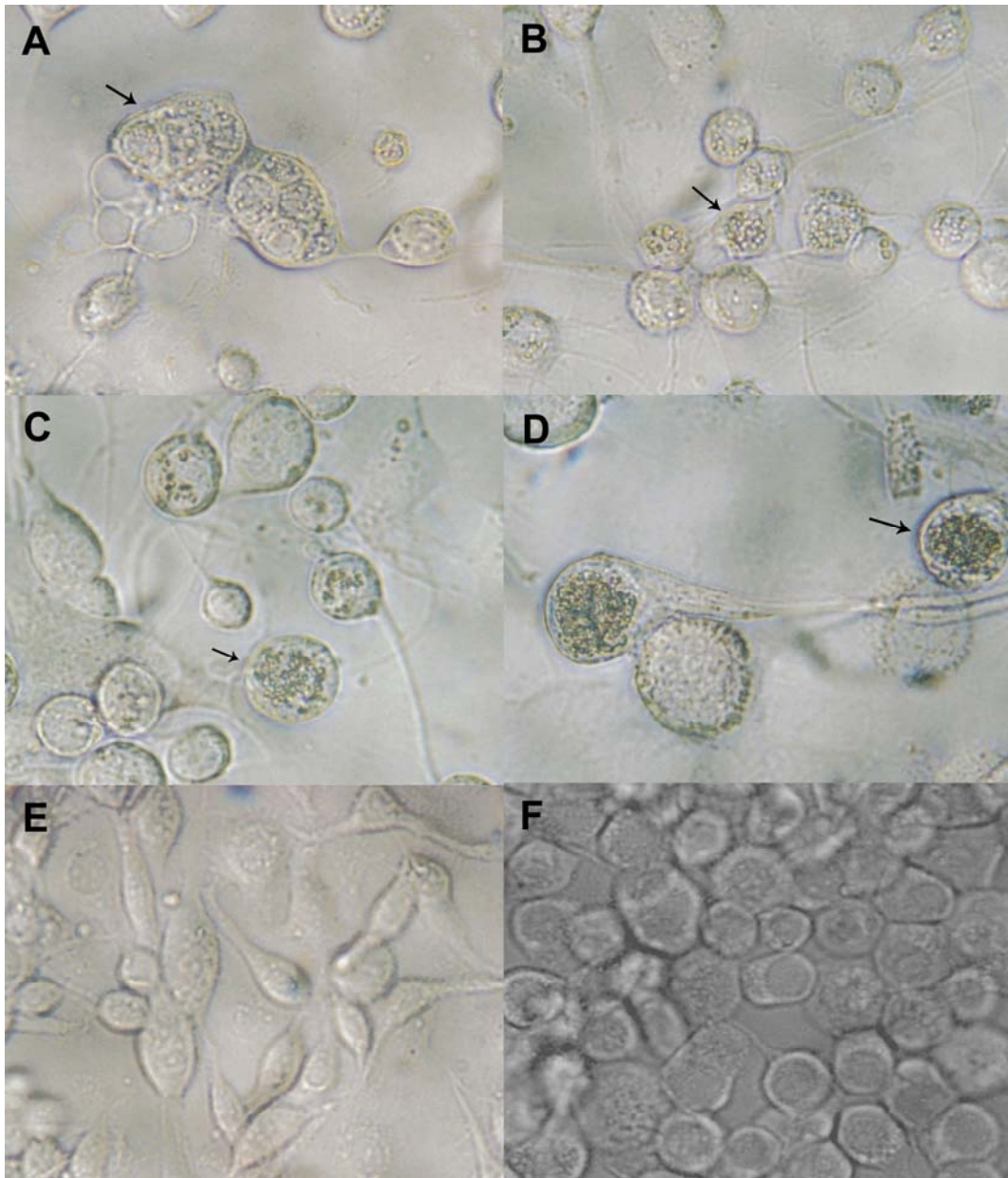


Figura 19: Análise dos efeitos citopáticos de células de inseto infectadas com diferentes baculovírus. Microscopia óptica das células BTI-Tn5B1-4 infectadas (96 h p. i.) com o vírus vSynYFE. **(A)**, a seta indica células infectadas apresentando poliedros no núcleo e a formação de sincícios, efeito citopático característico da Febre Amarela. **(B)** Células BTI-Tn5B1-4 infectadas (96 h p. i.) com o vírus vSynYFNS1, a seta indica células infectadas apresentando poliedros no núcleo. **(C)** Células BTI-Tn5B1-4 infectadas (96 h p. i.) com o vírus vAgYFE, a seta indica células infectadas apresentando poliedros no núcleo. **(D)** Células BTI-Tn5B1-4 infectadas (96 h p. i.) com o selvagem AgMNPV, a seta indica células infectadas apresentando poliedros no núcleo. **(E)** Células BTI-Tn5B1-4 não infectadas (“mock”). **(F)** Células BTI-Tn5B1-4 infectadas (96 h p. i.) com o vírus vSynVI-gal, este vírus não produz poliedros devido a presença do gene da β -galactosidase em substituição ao gene da poliedrina.

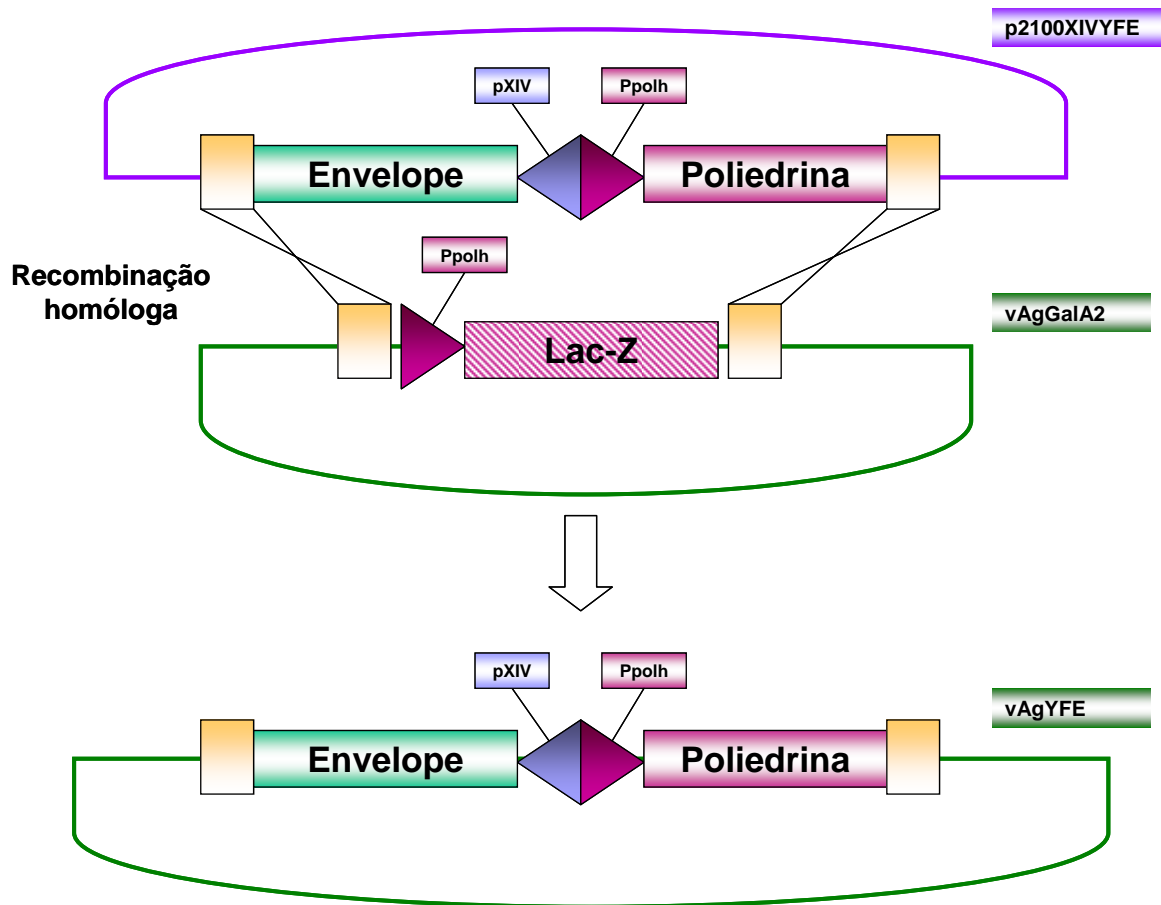


Figura 20: Esquema de construção do vírus recombinante vAgYFE. O esquema mostra o lócus do gene da poliedrina no plasmídeo p2100XVIYFE e a mesma região (contendo *lac-Z*) no vírus vAgGalA2. O plasmídeo p2100XVIYFE, que contém o gene do envelope do vírus da febre amarela, foi co-transfectado juntamente com o DNA do vírus vAgGalA2, para a construção do vírus recombinante vAgYFE. Os genes da poliedrina, envelope e *lac-Z* estão indicados na figura, assim como os promotores *pXIV* e *Ppolh* que controlam a expressão desses genes.

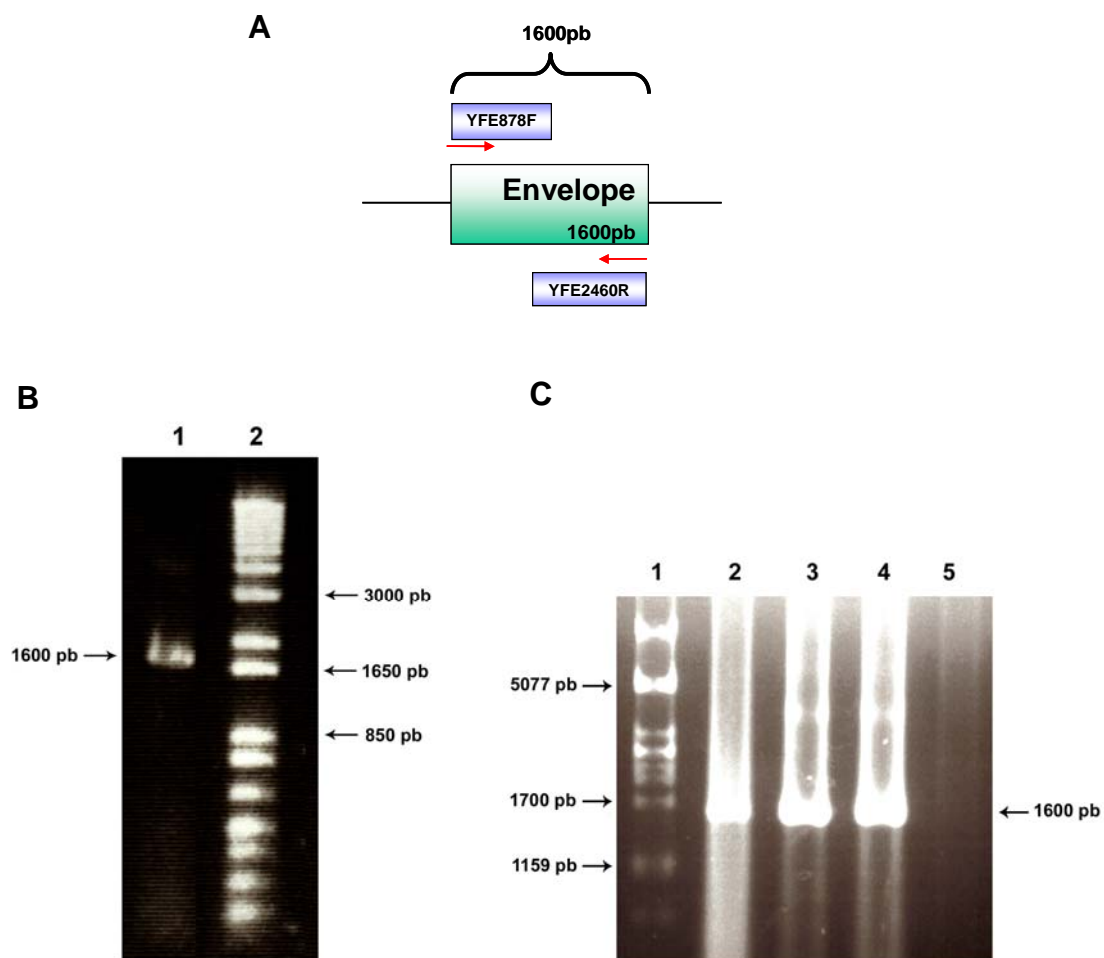


Figura 21: Confirmação da presença do gene *env* nos vírus recombinantes vSynYFE e vAgYFE. **A)** Esquema mostrando posição dos oligonucleotídeos **YFE2460R** e **YFE878F** no gene *env*. **B)** Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Poço 1: Análise do produto de PCR com o DNA do BV de vSynYFE utilizando os oligonucleotídeos **YFE2460R** e **YFE878F**. A seta a direita indica a banda de 1.600 pb referente ao gene *env*. Poço 2: Marcador DNA ladder 1Kb plus (Invitrogen). As setas à esquerda mostram o tamanho de algumas bandas do marcador. **C)** Poço 1: Marcador (DNA do fago lambda da Promega digerido com *Pst* I). As setas à esquerda mostram o tamanho de algumas bandas do marcador. Poço 2: Análise do produto de PCR com o DNA do BV de vAgYFE utilizando os oligonucleotídeos **YFE2460R** e **YFE878F**. Poço 3: Como controle positivo PCR com plasmídeo pSynYFE utilizando os oligonucleotídeos **YFE2460R** e **YFE878F**. Poço 4: Como controle positivo PCR com plasmídeo p2100XIVYFE utilizando os oligonucleotídeos **YFE2460R** e **YFE878F**. Poço 5: Controle negativo, PCR utilizando os oligonucleotídeos **YFE2460R** e **YFE878F** e o DNA foi substituído por água “milli-Q”. A seta a direita indica a banda de 1.600 pb referente ao gene *env*.

4.6. Análise da expressão da proteína Env através de SDS-PAGE e Imuno-marcação.

Extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas (96 h p. i) com o vírus recombinante vSynYFE foi utilizado para realização de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE), para analisar a expressão da proteína Env do vírus da Febre Amarela. Foram usados extratos celulares como controle de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com o vírus recombinante vSynCAT (que contém o gene *cathepsina-L*), os vírus selvagens vSynVI-gal, AcMNPV, AgMNPV, e células "mock" infectadas (células BTI-Tn5B1-4 não infectadas). O gel foi corado com solução de Comassie blue (descrito em Material e Métodos) que permitiu a visualização da proteína de interesse de aproximadamente 55 kDa, referente a proteína Env. (Figura 22)

Para avaliar a expressão de proteínas, extrato de tecido adiposo de lagartas de *Spodoptera frugiperda*, infectadas com os vírus recombinantes vSynYFE e vSynYFNS1 (Ramos *et alli.*, 2002), e lagartas de *Anticarsia gemmatalis* infectadas com o vírus recombinante vAgYFE, com 72 h p. i., foi utilizado para realização de dois géis desnaturantes de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE), um que foi corado e outro que foi utilizado para transferência das proteínas para uma membrana de Nitrocelulose para o experimento de imuno-deteção. Como controle, foi utilizado o extrato de tecido adiposo de lagartas *A. gemmatalis* infectadas com o vírus vAgGalA2 e não inoculadas (como "mock" infectadas) e lagartas de *S. frugiperda* infectadas com o vírus vAcDENS1 (que contém os genes *env* e *ns1* do vírus da Dengue fusionados). O gel corado em solução de Comassie blue (descrito em Material e Métodos) e a membrana podem ser vistos na Figura 23.

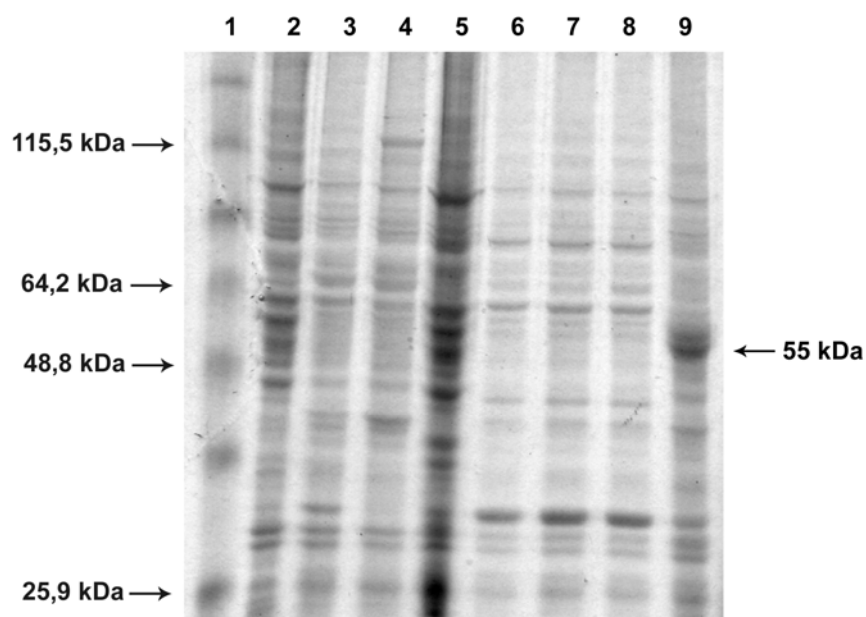


Figura 22: Análise da expressão da proteína recombinante Env do vírus da febre amarela em células de inseto. Gel desnaturante de poliacrilamida a 12% mostrando no poço 1: Marcador BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder da Invitrogen. Poço 2: Extrato de células BTI-Tn5B1-4 não infectadas (mock). Poço 3: Extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com o vírus AcMNPV. Poço 4: Extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com o vírus vSynVI-gal. Poço 5: Extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com o vírus AgMNPV. Poços 6, 7 e 8: Extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com o vírus vSynCAT. Poço 9: Extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com o vírus vSynYFE. A seta à direita indica a presença de uma banda de aproximadamente 55 kDa, referente, provavelmente, à proteína Env.

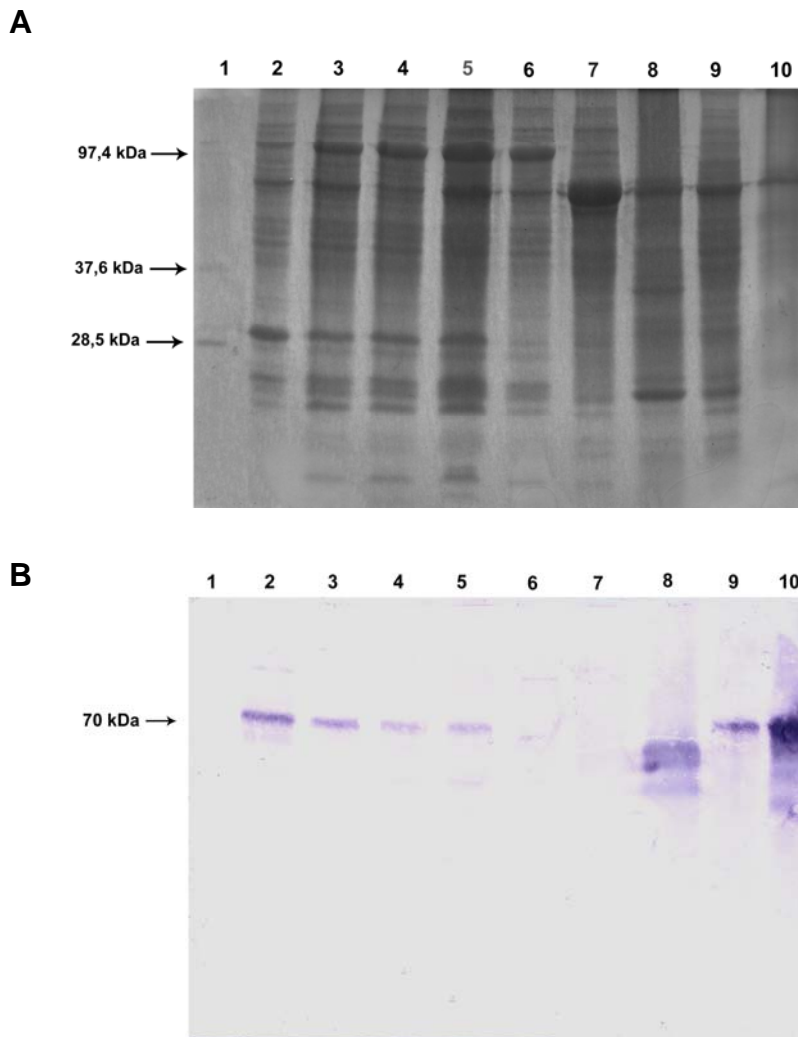


Figura 23: Análise da expressão da proteína recombinante Env e NS1 do vírus da febre amarela no tecido adiposo de insetos infectados com baculovírus recombinantes. **A)** Gel de poliacrilamida desnaturante a 12%, mostrando no poço 1: Marcador Protein MW Marker (14-116 kDa) Jena Bioscience; Poços 2, 3, 4 e 5: Extrato de tecido adiposo de larvas *A. gemmatalis* infectadas com o vírus vAgYFE. Poço 6: Extrato de tecido adiposo de larvas *A. gemmatalis* infectadas com o vírus vAgGalA2. Poço 7: Extrato de tecido adiposo de larvas *A. gemmatalis* "mock" infectadas. Poço 8: Extrato de tecido adiposo de larvas *S. frugiperda* infectadas com o vírus vSynYFE. Poço 9: Extrato de tecido adiposo de larvas *S. frugiperda* infectadas com o vírus vSynYFNS1. Poço 10: Extrato de tecido adiposo de larvas *S. frugiperda* infectadas com o vírus vAcDENS1, gentilmente cedido por Maria Creuza do Espírito Santo Barros. As setas indicam o tamanho de algumas bandas do marcador. **B)** Membrana de nitrocelulose marcada com anticorpo anti-Dengue. A ordem das amostras nos poços é igual ao que foi descrito para A. A seta indica a marcação por anticorpo na altura de 70 kDa.

A imuno-deteção das proteínas transferidas para a membrana de Nitrocelulose com o anticorpo Anti-Dengue, revelou a presença de bandas de 70 kDa para as amostras de extrato de tecido adiposo de lagartas *A. gemmatalis* infectadas com o vírus vAgYFE, e extrato de tecido adiposo de lagartas *S. frugiperda* infectadas com os vírus vSynYFNS1 e vAcDENS1. (Figura 23)

5. DISCUSSÃO

Atualmente, os casos de febre amarela são esporádicos e a maioria dos surtos se refere à febre amarela selvagem, principalmente devido à utilização de uma vacina bastante eficiente, produzida com vírus atenuado, que data de 1937 (Chang *et alli*, 1995). Entretanto, alguns casos de Febre Amarela urbana vêm sendo relatados na África e o risco de reaparecimento da doença, como uma epidemia, é elevado. A vacina, por ser de vírus atenuado, apresenta alguns problemas tanto por não ser indicada para pacientes imunodeprimidos quanto por levar, em alguns casos isolados, ao desenvolvimento da doença em pessoas saudáveis (Vasconcelos, 2003). O diagnóstico da Febre Amarela ainda depende de métodos dispendiosos e demorados, o que se torna um problema na contenção de uma possível epidemia, dada sua semelhança antigênica com outros flavivirus e a ocorrência de reações cruzadas (de Paula & Fonseca, 2004). A utilização de proteínas recombinantes de partes antigênicas virais pode ser de grande utilidade tanto no aumento da biossegurança com relação a vacinas quanto no direcionamento e especificidade de um diagnóstico mais rápido e preciso. Na produção de proteínas recombinantes são utilizados diferentes sistemas de expressão, entre os quais se destaca o baculovírus.

Os baculovírus foram originalmente utilizados como biopesticidas e muitas estratégias foram utilizadas para torná-los mais patogênicos contra os insetos praga, como por exemplo, a deleção de um gene viral (Pinedo *et alli*, 2003) ou inserção de genes que codificam toxinas inseticidas no genoma dos baculovírus (Aguiar *et alli*, 2006). Centenas de outros trabalhos relatam a inserção de genes heterólogos no genoma de baculovírus, o que serviu como base para a utilização destes vírus não só como biopesticida, mas também como vetor de expressão (Jarvis, 1997).

A expressão de genes heterólogos em células de inseto, usando baculovírus como sistema de expressão, tornou-se importante na área da saúde e acredita-se que o baculovirus possa ser usado inclusive para terapia gênica. (Tani *et alli*, 2003). Em se tratando de diagnósticos, baculovirus em células de inseto têm sido utilizados na expressão de proteínas que se comportam antigenicamente como o agente etiológico de interesse. Pereylygina *et alli*, (2005) expressou diferentes glicoproteínas do vírus da herpes B de macacos utilizando baculovírus. As glicoproteínas recombinantes foram utilizadas como antígeno em testes diagnósticos, cuja importância está na minimização de risco ocupacional humano no trato com macacos, o que vêm se tornando mais comum, pois macacos têm sido bastante utilizados como cobaias, em especial em estudo sobre a AIDS. O diagnóstico precoce permite um tratamento antiviral de bloqueio da infecção.

Schleiss & Jensen (2003), descrevem que, no estudo dos efeitos congênitos do citomegalovírus (CMV), a glicoproteína B tem um papel chave, pois o seu bloqueio por anticorpos neutralizantes confere uma proteção bastante eficaz contra a infecção e conseqüentes danos. Essa proteína foi clonada em baculovirus, expressada em células de inseto e usada para testes em modelos animais e avaliação de reações imunológicas. A proteína recombinante foi capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes, simulando o que ocorreria com o vírus intacto. Isso pode ser útil para confecção de vacinas contra CMV.

Outro exemplo de aplicação de baculovírus seria o do desenvolvimento de vacinas recombinantes para o vírus da gripe. A funcionalidade de vacinas de VLP (viral-like-particles, partículas semelhantes ao vírus) para vírus da gripe vem sendo testada e os resultados são bastante promissores. Quan *et alli*, (2007) descrevem baculovírus recombinantes contendo genes antigênicos do vírus da gripe H1N1 e estes

são capazes de promover reações imunológicas de proteção em camundongos inoculados intranasalmente. Outro exemplo de aplicação de baculovírus é o desenvolvimento de uma vacina experimental para o vírus H5N1, o vírus da gripe aviária ou ainda para o coronavírus causador de SARS, uma síndrome respiratória aguda severa. O desenvolvimento da vacina recombinante seria rápido, levando por volta de 8 semanas incluindo o tempo para identificação, sequenciamento e clonagem do gene de interesse (normalmente a fabricação da vacina tradicional em ovos embrionados pode levar muitos meses), e a rapidez na confecção da vacina é peça chave no combate à disseminação dos vírus de gripe, uma vez que esses possuem uma alta capacidade de mutação. (<http://www.tamu.edu/summerslab/baculovirus.html>)

Neste trabalho, duas espécies de baculovírus, AcMNPV e AgMNPV, foram utilizados para expressão da proteína do envelope do vírus da Febre Amarela em células de inseto. O baculovírus AcMNPV é o mais estudado, sendo considerado protótipo dos baculovírus, e encontra-se completamente seqüenciado desde 1994 (Ayres *et alli*, 1994) e tem sido usado como vetor de expressão desde a década de 80 (Smith *et alli*, 1983). Desde então, diferentes proteínas com os mais variados objetivos foram expressas utilizando este baculovírus, entretanto, sua utilização para fins comerciais é limitada devido à existência de uma patente americana (US Patent No. 4,745,051)

O AgMNPV é o baculovírus mais utilizado como biopesticida, tendo seu maior programa de controle de pragas estabelecido no Brasil. (Castro *et alli*, 1999), e seu sequenciamento foi recentemente concluído (Oliveira *et alli*, 2006). Apesar de seu uso como vetor de expressão ser mais recente que o do AcMNPV, alguns trabalhos já relatam seu uso para a produção de proteínas heterólogas. Hallwass *et alli*, (2005) descreve a construção de quatro baculovírus recombinantes, cada qual contendo uma proteína heteróloga diferente: vAg2100NS_M contém a proteína NS_M do TSWV (*Tomato*

spotted wilt virus), vAg2100egfp contém o gene *egfp* (enhanced green fluorescent protein), vAg2100GarMb contendo o gene da capa protéica do vírus do alho (*Garlic mite-borne filamentous virus*) e vAg2100Opiap-3 com o gene *iap-3* (um gene inibidor de apoptose) do baculovírus OpMNPV (*Orgyia pseudotsugata* multiple nucleopolyhedrovirus). Ribeiro *et alli*, (2001) construíram um baculovírus AgMNPV recombinante contendo o gene da β -galactosidase sob o comando do promotor da poliedrina. A expressão de β -galactosidase atingiu altos níveis e, além disso, a enzima recombinante foi biologicamente ativa em um ensaio para β -galactosidase.

Diferentes proteínas do vírus da Febre Amarela já foram expressadas em células de inseto, com o intuito de testar a antigenicidade de proteínas que pudessem oferecer o mesmo padrão de reação antigênica do que o vírus intacto. O gene NS1, por exemplo, foi expresso em células de inseto de *Spodoptera frugiperda* por Desprès *et alli*, (1991b) e a estrutura da proteína recombinante analisada foi bastante similar à produzida na infecção *in vivo*, mas não a forma de secreção desta para o meio extracelular. Shiu *et alli*, (1991) demonstraram que a proteína do envelope, expressada em baculovírus recombinantes contendo o gene do envelope, apresentou-se antigenicamente indistinguível da proteína do vírus da febre amarela 17D utilizada na vacina. Dessa forma, a glicoproteína do envelope, presente na face mais externa do vírus, se destaca dentre as demais, devido ao seu alto grau de antigenicidade e potencial uso em vacinas e diagnóstico na substituição do vírus, motivo pelo qual essa proteína foi escolhida para a realização deste trabalho.

Apesar da grande importância da proteína do envelope, vale lembrar que as pesquisas feitas com os genes não estruturais também são de grande valia, em especial por estudarem as etapas do processamento da poliproteína e como estas são essenciais para a funcionalidade viral. O correto processamento de NS2B e NS3 é fundamental

para a clivagem de uma grande parte das outras proteínas virais (Lin *et alli.*, 1993) e o conhecimento de quais proteínas são essenciais para o vírus e quais poderiam ser substituídas por outras proteínas de interesse deu origem a utilização do vírus da Febre Amarela como um vetor de expressão. Essa linha de pesquisa utiliza a cepa vacinal 17D da Febre Amarela como vetor de expressão de proteínas de outros flavivirus, com o objetivo de vacinas quiméricas, como no caso da Chimerivax. ChimeriVaxTM é constituída por um vírus recombinante vivo atenuado, construído a partir da cepa 17D do vírus da febre amarela, na qual o gene do envelope é substituído pelos genes correspondentes de outros flavivirus. (Monath, *et alli*, 2002)

Neste trabalho, foi feita a construção e purificação dos baculovírus recombinantes vSynYFE e vAgYFE. Para isso foram utilizados os plasmídeos de transferência pSynXIV VI⁺X3 (Wang *et alli*, 1991) e p2100 (Hallwass *et alli*, 2005) respectivamente. O gene do envelope foi clonado sob o comando do promotor *pXIV*, que é um promotor da poliedrina de AcMNPV modificado. Apesar de ser um promotor de AcMNPV, o cassete promotor *pXIV* e gene do envelope foi clonado no genoma do AgMNPV, o que pode ter uma relação com o nível de expressão da proteína neste baculovírus, que não foi possível detectar por SDS-PAGE.

A presença do gene do envelope nos vírus recombinantes foi confirmada por reação de PCR. No caso de vSynYFE foi observada a formação de sincícios celulares, o que corresponde a um efeito citopático típico de flavivirus (Vasconcelos, 2002). O interessante a ser observado é que o baculovírus recombinante vSynYFE permitiu a formação de sincício mesmo em pH 6,2, o que não ocorreu com os baculovírus AcMNPV e vSynVI-gal nem com o baculovírus recombinante vSynYFNS1. Entretanto, o recombinante vAgYFE só demonstrou capacidade de fundir membranas em pH 5, porém na mesma proporção de formação de sincícios quando utilizado o AgMNPV

selvagem (dados não mostrados). A capacidade de fusão de membrana do AgMNPV é devida à atividade de uma glicoproteína denominada gp64, presente nos baculovírus, que está relacionada a entrada do BV nas células de inseto via endocitose. (Blissard & Weinz, 1992) Um dos motivos do recombinante vAgYFE não ter apresentado formação de sincício de maneira semelhante ao que aconteceu com vSynYFE pode ser devido à ausência de expressão ou a baixa expressão da proteína.

Extrato de células de inseto infectadas com o vírus recombinante vSynYFE foram avaliadas pela técnica de SDS-PAGE e foi observado uma banda de 55 kDa correspondente ao tamanho esperado para a proteína do envelope. Lagartas foram infectadas com os vírus recombinantes vSynYFE, vSynNS1, vAgYFE e vAcDENS1 e o tecido adiposo dessas lagartas foi utilizado para avaliação da expressão da proteína através de SDS-PAGE e imuno-marcação utilizando anticorpo anti-dengue (a escolha deste anticorpo se deu devido a ausência de informações técnicas sobre o anticorpo Anti-febre amarela disponível). A marcação foi restrita somente aos vírus recombinantes contendo genes de flavivirus, mas o tamanho da proteína marcada foi diferente do esperado, o que pode ser devido a alterações nas modificações pós traducionais, em especial pela proteína do envelope ser uma glicoproteína. Outra hipótese seria a produção de uma proteína celular, induzida pela infecção pelo vírus recombinante através da presença de genes virais codificando trans-ativadores da transcrição de genes celulares.

O diagnóstico de flavivirus ainda apresenta alguns obstáculos a serem ultrapassados, em especial no que diz respeito a reações cruzadas entre as duas espécies virais mais comuns no Brasil, os vírus da Febre Amarela e de Dengue. A importância em promover um diagnóstico diferencial seguro entre essas duas doenças está na diferença da evolução clínica: dengue apesar de muito mais comum, possui um

prognóstico bom que progride para a cura após uma semana e mesmo quando hemorrágica o tratamento de suporte pode mostrar-se bastante eficaz; a febre amarela encontra-se controlada em países com programa de vacinação, mas clinicamente é bastante agressiva, apresentando alto índice de letalidade. Casos de febre amarela são de notificação internacional obrigatória, porém a dificuldade no diagnóstico pode levar à subnotificação e demora na implantação de medidas de emergência. O uso de proteínas recombinantes como antígenos tornaria o diagnóstico mais rápido e menos dispendioso, sendo que para isso é necessário estabelecer quais frações da proteína antigênica são específicas para cada espécie e, a partir disso, aumentar a especificidade do teste. Apesar da existência de uma vacina já estabelecida para Febre Amarela, a tentativa de obter novas vacinas que não contenham o agente etiológico é válida, considerando que essas seriam mais seguras para pacientes imunodeprimidos e para os profissionais que trabalham em sua confecção.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A proteína do envelope do vírus da febre amarela expressada em células de inseto pelo baculovírus recombinante vSynYFE pôde ser detectada através de SDS-PAGE, e demonstrou a formação de sincícios celulares, efeito citopático característico dos flavivírus. Entretanto, não foi detectada a expressão desta proteína pelo baculovírus recombinante vAgYFE por SDS-PAGE e a formação de sincícios. A presença do promotor *pXIV* no vírus recombinante vAgYFE pode ser uma das razões para a não detecção da expressão, visto que este é um promotor do vírus AcMNPV, que pode não ser reconhecido pelas proteínas regulatórias do vírus AgMNPV. O ensaio de imunomarcação detectou proteínas de tamanho esperado apenas para extrato de células infectadas com o vírus vSynYFE. Entretanto, outras proteínas de tamanho maior, foram detectadas tanto em extrato de células infectadas com o vírus vSynYFE, quanto para o vírus vAgYFE.

Deste modo, visando dar continuidade ao trabalho pretende-se:

- Concluir sequenciamento do gene do envelope;
- Produzir um anticorpo que seja específico para a proteína recombinante e verificar se este reage contra o vírus da febre amarela selvagem;
- Realizar novos testes com relação à proteína recombinante atualmente expressa através da infecção dos baculovírus recombinantes produzidos neste trabalho (vSynYFE e vAgYFE) em células de inseto;
- A continuidade deste trabalho poderá resultar na produção de um antígeno vira capaz de ser usado em testes de diagnóstico para Febre

Amarela. Além disso, foi importante e para a abertura de uma nova linha de pesquisa em virologia humana no laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, R.W.S.; MARTINS, E.S.; VALICENTE, F.H.; CARNEIRO, N.P.; BATISTA, A.C.; MELATTI, V.M.; MONNERAT, R.G.; RIBEIRO, B.M. A Recombinant truncated Cry1Ca protein is toxic to lepidopteran insects and forms large cuboidal crystals in insect cells. **Current Microbiology** v. 53 p. 287-292, 2006.

ALLEN, G.E. & KNELL, J. D. A nuclear polyhedrosis virus of *Anticarsia gemmatilis*. I. Ultrastructure, replication, and pathogenicity. **Florida Entomologist** v. 60, p. 233-240, 1977.

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

AYRES, M.D.; HOWARD, S.C.; KUZIO, J.; LOPEZ-FERBER, M.; POSSEE, R.D. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Virology** v. 202(2), p. 586-605, 1994.

BARROS, M. C. E. S. ; CHAIB, A. J. M. ; NAGATA, T.; RIBEIRO, B.M. Expression of dengue virus envelope and ns1 proteins in insect cells using a recombinant baculovirus. In: **XVII National Meeting of Virology**, 2006, Campos do Jordão. Virus Reviews & Research. São Paulo : Sociedade Brasileira de Virologia, v. 11, p. 50-51, 2006.

BAURMET, T.F.; ITO, S.; WONG, D.T.; LIANG, T.J. Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. **Journal of Virology**, v.72(5), p.3827–3836, 1998.

BENZ, G.A. Introduction: historical perspective. In: In: GRANADOS, R.R., FREDERICI, B.A. (Eds). **The Biology of Baculovirus**. Boca Raton: CRC Press, p.1-35, 1986.

BIELEFELDT-OHMANN, H.; BEASLEY, D.W.C.; FITZPATRICK, D.R.; AASKOV, J.G. Analysis of a recombinant dengue-2 virus–dengue-3 virus hybrid envelope protein expressed in a secretory baculovirus system. **Journal of General Virology**, v.78, p.2723–2733, 1997.

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

BLISSARD, G.W. & WEINZ, J.R.; Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. **Journal of Virology** v.66, p. 6829-6835, 1992.

BONALDO, M.C.; GARRATT, R.C.; MARCHEVSKY, R.S.; COUTINHO, E.S.F.; JABOR, A.V.; ALMEIDA, L.F.C.; YAMAMURA, A.M.Y.; DUARTE, A.S.; OLIVEIRA, P.J.; LIZEU, J.O.P.; CAMACHO, L.A.B.; FREIRE, GALLER, R. Attenuation of recombinant Yellow Fever 17D viruses expressing foreign protein epitopes at the surface. **Journal of Virology** v. 79(13), p. 8602-8613, 2005.

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.

BRYANT, J.E. & BARRETT, A.D.T. Comparative phylogenies of yellow fever isolates from Peru and Brazil. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** v. 39, p. 103-118, 2003.

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(10), p. 1733-1761, 1999.

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

CHANG, G.J.J.; CROPP, B.C.; KINNEY, R.M.; TRENT, D.W.; GUBLER, D.J. Nucleotide sequence variation of the envelope protein gene identifies two distinct genotypes of yellow fever virus. **Journal of Virology** v. 69(9), p. 5773-5780, 1995.

CHARLIER, N.; MOLENKAMP, R.; LEYSSEN, P.; PAESHUYSE, J.; DROSTEN, C.; PANNING, M.; DE CLERCQ, E.; BREDENBEEK, P.J.; NEYTS, J. Exchanging the yellow fever virus envelope proteins with modoc virus prM and E Proteins Results in a chimeric virus that is neuroinvasive in SCID mice. **Journal of Virology** v. 78(14), p. 7418-7426, 2004.

CORVER, J.; LENCHES, E.; SMITH, K.; ROBISON, R.A.; SANDO, T.; STRAUSS, E.G.; STRAUSS, J.H. Fine mapping of a *cis*-acting sequence element in Yellow Fever virus RNA that is required for RNA replication and cyclization. **Journal of Virology** v. 77(3), p. 2265-2270, 2003.

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

DE PAULA, S.O. & FONSECA, B.A.L. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases** v. 8(6), p. 390-398, 2004.

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

DESPRÈS, P.; GIRARD, M.; BOULOY, M. Characterization of yellow fever virus proteins E and NS1 expressed in Vero and *Spodoptera frugiperda* cells. **Journal of General Virology** v. 72, p. 1331-1342, 1991b.

DROSTEN, C.; KÜMMERER, B.M.; SCHMITZ, H.; GÜNTHER, S. Molecular diagnostics of viral hemorrhagic fevers. **Antiviral Research** v. 57, p. 61-87, 2003.

DWYER, K.G. & GRANADOS, R.R. Mapping *Pieris rapae* granulosis virus transcripts and their in vitro translation products. **Journal of Virology** v. 62, p. 1535-1542, 1988.

FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL, L.A. Virus Taxonomy: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press. 2005.

FEDERICI, B.A. Baculovirus pathogenesis. In: MILLER, L.K. (Eds). **The Baculoviruses**. New York: Plenum Press, p. 33-59, 1997.

FEDERICI, B.A. Biological properties and molecular biology. **The Biology of Baculoviruses**. Boca Raton: CRC Press, v.1, p. 110-127, 1986.

FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; CHANOCK, R.M.; MONATH, T.P.; MELNICK, J.L.; ROIZMAN, B.; SRAUS, S.E. **Field-Virology**. Lippincott Williams & Wilkins, p. 2950, 2001.

FUNK, C.N. & CONSIGLI, R.A. Evidence for zinc binding by two structural proteins *Plodi interpunctella* granulosis virus. **Journal of Virology** v. 66, p. 3168-3171, 1992.

GALLER, R.; FREIRE, M.S.; JABOR, A.V.; MANN, G.F. The yellow fever 17D vaccine virus: molecular basis of viral attenuation and its use as an expression vector. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 30, p. 157-168, 1997.

GOMES, A.C.; BITENCOURT, M.D.; NATAL, D.; PINTO, P.L.S.; MUCCI, L.F.; DE PAULA, M.B.; URBINATTI, P.R.; BARATA, J.M.S. *Aedes albopictus* em área rural do Brasil e implicações na transmissão de febre amarela silvestre. **Revista de Saúde Pública** v. 33(1), p. 95-97, 1999.

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

GROSS, C.H. & SHUMAN, S. Characterization of a baculovirus-encoded RNA 5' triphosphatase. **Journal of Virology** v. 72(9), p. 7057-7063, 1998.

GUARINO, L.A., XU, B., JIN, J., DONG, W. A virus encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells. **Journal of Virology** v. 72(10), p. 7985-7991, 1998.

GUBLER, D.J. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases** v. 27, p. 319-330, 2004.

HALLWASS, M.; CORREA, R.F.T.; RIBEIRO, B.M. Construção de um vetor de expressão baseado no bioinseticida baculovirus *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV). In: **9 Simpósio de Controle Biológico**, 2005, Recife. Anais do 9 Simpósio de Controle Biológico. São Paulo: Sociedade Entomológica do Brasil, v. 1. p. 187-187, 2005.

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. 1860-1868, 1993.

JARVIS, D.L. Baculovirus expression vectors. In L.K. Miller (ed.). **The Baculoviruses**. Plenum Press, New York p. 389-431, 1997.

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.

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.

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.

KITTS, P.A.; AYRES, M.D.; POSSEE, R.D. Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. **Nucleic Acids Research** v. 18, p. 5667-5672, 1990.

KOST, T.A.; CONDREAY, J.P.; JARVIS, D.L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 23(5), p.567-575, 2005.

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

LEE, E.; STOCKS, C.E.; AMBERG, S.M.; RICE, C.M.. LOBIGS, M. Mutagenesis of the signal sequence of Yellow Fever virus prM protein: enhancement of signalase

cleavage in vitro is lethal for virus production. **Journal of Virology** v. 74(1), p. 24-32, 2000.

LIN, C.; CHAMBERS, T.J.; RICE, C.M. Mutagenesis of conserved residues at the yellow fever virus 3/4A and 4B/5 dibasic cleavage sites: effects on cleavage efficiency and polyprotein processing. **Virology** v. 192(2), p. 596-604, 1993.

LU, A. & MILLER, L.K. Regulation of baculoviruses late and very late expression. p. 193-216. In: MILLER, L.K. (Eds). **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, p. 447, 1997.

LUNG, O.; WESTENBERG, M.; VLAK, J.M.; ZUIDEMA, D.; BLISSARD, G.W. Pseudotyping *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV): F proteins from group II NPVs are functionally analogous to AcMNPV gp64. **Journal Of Virology** v. 76 (11), p. 5729-5736, 2002.

MARUNIAK, J.E.; Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Eds.). **The Biology of Baculoviruses**. Boca Raton: CRC Press. v. 1, p. 275, 1986.

MARX, F.; GRITSUN, T.S.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B.; 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.

MCMINN, P.C. The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. **Journal of General Virology** v. 78, p. 2711-2722, 1997.

MILLER, L.K. (Eds). **The Baculoviruses**. New York; Plenum Press. p. 447, 1997.

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

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

MONATH, T.P.; MCCARTHY, K.; BEDFORD, P.; JOHNSON, C.T.; NICHOLS, R.; YOKSAN, S.; MARCHESANI, R.; KNAUBER, M.; WELLS, K.H.; ARROYO, J.; GUIRAKHOO, F. Clinical proof of principle for ChimeriVaxTM: recombinant live, attenuated vaccines against flavivirus infections. **Vaccine** v. 20, p. 1004-1018, 2002.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 257-289, 1999.

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 the International Committee on Taxonomy of Viruses**. New York: Springer-Verlag Wien, p. 104-113, 1995.

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.

NICKELLS, M. & CHAMBERS, T.J. Neuroadapted yellow fever virus 17D: determinants in the envelope protein govern neuroinvasiveness for SCID mice. **Journal of Virology** v. 77(22), p. 12232-12242, 2003.

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

OLIVEIRA, J.V.C.; WOLFF, J.L.C.; GARCIA-MARUNIAK, A.; RIBEIRO, B.M.; CASTRO, M.E.B.; SOUZA, M.L.; MOSCARDI, F.; MARUNIAK, J.E.; ZANOTTO, P.M.A. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology** v. 87, p. 3233-3250, 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.

PASSARELI, A.L. & MILLER, L.K. Identification and characterization of Lef-1, a baculovirus gene involved in late and very late gene expression. **Journal of Virology** v. 67(6), p. 3481-3488, 1993.

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

PELCZAR Jr, M. J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N. R. (Eds) **Microbiologia: conceitos e aplicações**. v. 2 São Paulo: Makron Books, p. 517, 1996.

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

PERELYGINA, L.; PATRUSHEVA, I.; HOMBIAIAH.; ZURKUHLLEN, H.; WILDES, M.J.; PATRUSHEV, N.; HILLIARD, J. Production of herpes B virus recombinant glycoproteins and evaluation of their diagnostic potential. **Journal of Clinical Microbiology** v. 43(2), p. 620–628, 2005.

PINEDO, F.J.R.; MOSCARDI, F.; LUQUE, T.; OLSZEWSKI, J.A.; RIBEIRO, B.M. Inactivation of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (egt) gene of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) improves its virulence towards its insect host. **Biological Control** v. 27, p. 336-344, 2003.

PUGACHEV, K.V.; GUIRAKHOO, F.; OCRAN, S.W.; MITCHELL, F.; PARSONS, M.; PENAL, C.; GIRAKHOO, S.; POUGATCHEVA, S.O.; ARROYO, J.; TRENT, D.W.; MONATH, T.P. High fidelity of Yellow Fever virus RNA polymerase. **Journal of Virology** v. 78(2), p. 1032-1038, 2004.

QUAN, F.S.; HUANG, C.; COMPANS, R.W.; KANG, S.M. Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of influenza virus. **Journal of General Virology** v. 81(7), p. 3514-3524, 2007.

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

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.; GATTI, C.D.C.; COSTA, M.H.; MOSCARDI, F.; MARUNIAK, J.E.; POSSEE, R.D.; ZANOTTO, P.M.A. Construction of a recombinant *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV-2D) harbouring the β -galactosidase gene. **Archives of Virology** v. 146, p. 1355-1367, 2001.

RYMAN, K.D.; LEDGER, T.N.; WEIR, R.C.; SCHLESINGER, J.J.; BARRETT, A.D.T. Yellow fever virus envelope protein has two discrete type-specific neutralizing epitopes. **Journal of General Virology** v. 78, p. 1353-1356, 1997.

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

SCHLEISS, M.R. & JENSEN, N.J. Cloning and expression of the guinea pig cytomegalovirus glycoprotein B (gB) in a recombinant baculovirus: utility for vaccine studies for the prevention of experimental infection. **Journal of Virological Methods** v.108, p. 59- 65, 2003.

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.

SIEBURTH, P. J. & MARUNIAK, J. E. Growth characteristics of a continuous cell line from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). **In Vitro Cellular Developmental Biology** v.24, p. 195-198, 1988.

SMITH, G.E.; SUMMERS, M.D.; FRASER, M.J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. **Molecular and Cellular Biology** v. 3(12), p. 2156-2165, 1983.

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.

STRAUSS, E. Hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 34(1), p. 69-82, 2001.

TANI, H.; LIMN, C.K.; YAP, C.C.; ONISHI, M.; NOZAKI, 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.

THIEM, S.M.; DU, X.; QUENTIN, M.E.; BERNER, M.M. Identification of baculovirus gene that promotes *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus replication in a nonpermissive insect cell line. **Journal of Virology** v. 70(4), p. 2221-2229, 1996.

TODD, J.W., PASSARELLI, A.L., LU, A., MILLER, L.K. Factors regulating baculovirus late and very late gene expression in transient-expression assays. **Journal of Virology** v. 70, p. 2307-2317, 1996.

TUBOI, S.H.; COSTA, Z.G.A.; VASCONCELOS, P.F.C.; HATCH, D. Clinical and epidemiological characteristics of yellow fever in Brazil: analysis of reported cases 1998-2002. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v. 101, p. 169-175, 2007.

VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. Virus taxonomy. **Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Academic Press, 2000.

VASCONCELOS, P.F.C. Febre amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização. **Revista Brasileira de Epidemiologia** v. 5(3), p. 244-258, 2002.

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

VASCONCELOS, P.F.C.; BRYANT, J.E.; DA ROSA, A.P.A.T.; TESH, R.B.; RODRIGUES, S.G.; BARRETT, A.D.T. Genetic Divergence and Dispersal of Yellow Fever Virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases** v. 10(9), p. 1578-1584, 2004.

VASCONCELOS, P.F.C.; LUNA, E.J.; GALLER, R.; SILVA, L.J.; COIMBRA, T.L.; BARROS, V.L.R.S.; MONATH, T.P.; RODRIGUES, S.G.; LAVAL, C.; COSTA, Z.G.; VILELA, M.F.G.; SANTOS, C.L.S.; PAPAORDANOU, C.M.O.; ALVES, V.A.F.; ANDRADE, L.D.; SATO, H.K.; ROSA, E.S.T.; FROGUAS, G.B.; LACAVAL, E.; ALMEIDA, L.M.R.; CRUZ, A.C.R.; ROCCO, I.M.; SANTOS, R.T.M.; OLIVA, O.F.P.; BRAZILIAN YELLOW FEVER VACCINE EVALUATION GROUP. Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases. **The Lancet** v. 358, p. 91-97, 2001.

VASCONCELOS, P.F.C.; ROSA, A.P.A.T.; PINHEIRO, F.P.; RODRIGUES, S.; ROSA, E.S.T. Arboviroses. In: CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B. (Org.). **Medicina Tropical**. São Paulo; Atheneu, v. 1, p. 363-386. 2003.

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

VLAYCHEVA, L.; NICKELLS, M.; DROLL, D.A.; CHAMBERS, T.J. Yellow fever 17D virus: pseudo-revertant suppression of defective virus penetration and spread by mutations in domains II and III of the E protein. **Virology** v. 327, p. 41- 49, 2004.

VOLKMAN, L.E. & HOM, G. *Autographa californica* M 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.; BARRETT, 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.

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. & HAIDER, S. Yellow fever: readily prevented but difficult to treat. **Canadian Medical Association Journal** v. 170(3), p. 1909-1910, 2004.

WELZEL, A. **Baculovirus recombinantes contendo genes de proteases são mais virulentos contra *Spodoptera frugiperda***. Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular – Departamento de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

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

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.

XU, B., YOO, S., GUARINO, L.A. Differential transcription of baculovirus late and very late promoters: fractionation of nuclear extracts by phosphocellulose chromatography. **Journal of Virology** v. 69(5), p. 2912-2917, 1995.

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