

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública

Telissa da Cunha Kassar

**CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE VÍRUS RECOMBINANTE DE FEBRE
AMARELA EXPRESSANDO O GENE REPÓRTER DA GAUSSIA LUCIFERASE**

RECIFE
2013

TELISSA DA CUNHA KASSAR

**CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE VÍRUS RECOMBINANTE DE FEBRE
AMARELA EXPRESSANDO O GENE REPÓRTER DA GAUSSIA LUCIFERASE**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Laura Helena Vega Gonzales Gil, PhD

RECIFE

2013

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

K19c Kassar, Telissa da Cunha.

Construção e caracterização de vírus recombinante de febre amarela expressando o gene repórter da *Gaussia* luciferase. / Telissa da Cunha Kassar. — Recife: T. C. Kassar, 2013.
62 f.: il.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Laura Helena Vega Gonzales Gil.

1. Vírus da febre amarela. 2. Genética reversa. 3. Luciferases. I. Gil, Laura Helena Vega Gonzales. II. Cordeiro, Marli Tenório. Marques Júnior, Ernesto Torres Azevedo. I. Título.

616.93

TELISSA DA CUNHA KASSAR

**CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE VÍRUS RECOMBINANTE DE FEBRE
AMARELA EXPRESSANDO O GENE REPÓRTER DA GAUSSIA LUCIFERASE**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Dr.^a. Laura Helena Vega Gonzales Gil
CPqAM/Fiocruz

Dr. Renato Antonio dos Santos Oliveira
CPqAM/Fiocruz

Dr.^a. Clarice Neuenschwander Lins de Morais
CPqAM/Fiocruz

Dr.^a. Tereza Magalhães
CPqAM/Fiocruz

Dr. Rafael Dhalia
CPqAM/Fiocruz

Dedico este trabalho com muito carinho e amor, à Tatiana e José Carlos, pelo apoio, carinho, incentivo e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio, carinho e afeto. Em especial à minha mãe (Tatiana), ao meu pai (José Carlos), ao meu irmão (João Victor) e minha cunhada (Danda) pela compreensão durante todos esses anos de ausência física.

Ao meu namorado, Jowmmol, pela amizade durante todos esses anos, pelo apoio, carinho, incentivo e por segurar a “peteca” nos momentos mais difíceis durante o mestrado. Obrigada por estar comigo durante esse tempo.

À minha orientadora Laura Gil (chefa), pela orientação, oportunidade e suporte ao meu desenvolvimento profissional.

Aos meus amigos e colegas de bancada pelas ideias, sugestões e todo suporte e cooperação.

A toda equipe do Departamento de Virologia e Terapia Experimental – LaViTE, pelo carinho e acolhimento durante meus dois anos no Aggeu.

A todo pessoal do NESC e, em especial, professora Idê Gurgel, pelas dicas “sabidas”.

À minha turma de mestrado acadêmico pelas horas de trabalho, diversão, filosofia, apresentações e discussões. Em especial à minha fiel escudeira Mayara Marques, pelo carinho, acolhimento, brigas, quintas-feiras em claro para organizar os artigos de VMI, e pela cerveja paga.

Aos meus amigos Duda, Ciso, Larissa, Jully, Áurea, Ciba, Mari Petró, Lisa, Gil, Jeff, Sandrinha, Luciana por todo suporte, amizade, carinho e compreensão, principalmente durante os experimentos durante o final de semana em que precisava desmarcar os compromissos (“Desculpa aê”).

Às amigas Corumbaenses: Marianna Amorim, Regina, Anna Paula, Cristina, Maria Rosa, Stephanie pela amizade e suporte, mesmo distantes.

A toda equipe do Laboratório de Virologia Animal (Lavian) pelo carinho e torcida e por entenderem o quanto esse mestrado foi importante para mim. Em especial à Rita Maia (minha “mãe-científica”), professor Roberto, Serginho, Dani, Cosme e Camilinha. Adoro vocês.

Ao programa de Pós-Graduação em Saúde Pública pela oportunidade.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

KASSAR, Telissa da Cunha. **Construção e caracterização de vírus recombinante de Febre Amarela expressando o gene repórter da *Gaussia* luciferase**. 2013 – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

RESUMO

O vírus da febre amarela (YFV, *Yellow Fever Virus*), um arbovírus da família *Flaviridae*, é o agente causador da febre amarela (FA), uma doença aguda, febril, não contagiosa, hemorrágica e potencialmente fatal. O YFV é endêmico em regiões tropicais da América do Sul e África. Apesar de sua significância como um problema de saúde pública, muitos mecanismos moleculares da biologia do YFV, como replicação do genoma e patogênese viral ainda não foram bem compreendidos. Avanços em genética reversa viral tem permitido a elucidação de mecanismos da biologia e comportamento viral, bem como a construção de vetores vacinais e desenvolvimento de drogas antivirais. No presente trabalho, descrevemos a construção e caracterização de um vírus recombinante de FA expressando o gene repórter da *Gaussia* luciferase (GLuc). Utilizando o sistema de recombinação homóloga em levedura, o gene repórter da Proteína Fluorescente Amarela (YFP, *Yellow Fluorescent Protein*) do vírus recombinante YFV-YFP-DENV1linker, previamente construído em nosso laboratório, foi substituído pelo gene repórter GLuc. A construção foi confirmada por PCR. Os RNAs virais genômicos foram sintetizados *in vitro*, e posteriormente transfectados em células BHK-21. As células transfectadas foram avaliadas por imunofluorescência indireta e mensuração do gene repórter GLuc. Dois clones foram recuperados e caracterizados em cultivo celular. Nós acreditamos que este vírus repórter deverá ser útil na triagem e desenvolvimento de drogas antivirais específicas, estudos de replicação viral e competência vetorial, além da possível utilização como vetor viral vacinal.

Palavras chave: Vírus da febre amarela, genética reversa, luciferases.

KASSAR, Telissa da Cunha. **Construction and characterization of a recombinant vírus of Yellow Fever expressing the repórter gene of Gaussia Luciferase.** 2013 – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

ABSTRACT

The yellow fever virus (YFV), an arbovirus of *Flaviridae* family, is the causative agent of an acute, febrile, non-contagious and potentially fatal hemorrhagic disease. The YFV is endemic in tropical regions of South America and Africa. Despite its significance as a public health problem, many molecular mechanisms of YFV biology, including genome replication and viral pathogenesis have not been well elucidated. Advances in viral reverse genetics have allowed the elucidation of mechanisms of the viral biology and behavior, as well as the construction of vaccine vectors and development of antiviral drugs. In this study, we describe the construction and characterization of a recombinant YFV expressing the reporter gene *Gaussia* luciferase (GLuc). Using the system of homologous recombination in yeast, the reporter gene of *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) of recombinant virus YFV-YFP-DENV1linker, previously constructed in our laboratory, were substituted by the reporter gene GLuc. The construction was confirmed by PCR. The viral genomic RNAs were synthesized *in vitro* and subsequently transfected into BHK-21 cells. The transfected cells were evaluated by immunofluorescence and measurement of reporter gene GLuc. Two clones were recovered and are being characterized in cell culture. We believe that this reporter virus should be useful in the screening and development of specific antiviral drugs, studies of viral replication and vector competence, apart from possible use as a viral vaccine vector.

Key words: Yellow fever virus, reverse genetics, luciferases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Representação esquemática da organização do genoma dos flavivírus.	16
Figura 2 -	Representação da proteína E, a principal glicoproteína da superfície viral.	17
Figura 3 -	Representação do ciclo replicativo de flavivírus.	19
Figura 4 -	Representação esquemática do ciclo de transmissão da Febre Amarela	22
Figura 5 -	Representação esquemática da distribuição das formas clínicas da Febre Amarela.	23
Figura 6 -	Mapa das áreas de risco de Febre Amarela.	26
Figura 7 -	Representação esquemática do sistema de genética reversa para Flavivirus	28
Figura 8 -	Representação esquemática da técnica de recombinação homóloga em levedura	30
Figura 9 -	Fluxograma destacando os principais pontos dos métodos utilizados na construção e caracterização do vírus	35
Figura 10 -	Representação esquemática da construção do vírus YFV-GLuc	37
Quadro 1 -	Oligonucleotídeos utilizados na construção do vírus recombinante.	37
Figura 11 -	Confirmação da construção do vírus YFV-GLuc por recombinação homóloga em levedura.	43
Figura 12 -	Mapa dos plasmídeos	44
Figura 13 -	Representação esquemática da organização genômica do vírus YFV-GLuc e localização dos primers utilizados para a confirmação da construção	44
Quadro 2 -	Oligonucleotídeos utilizados na confirmação da construção do vírus recombinante.	45
Figura 14 -	Amplificação completa do genoma e produção de RNA sintetizados <i>in vitro</i> .	46
Figura 15 -	Mensuração da atividade de Gaussia Luciferase dos quatro clones.	46

Figura 16 - Imunofluorescência indireta (IFI) em células BHK21 infectadas pelo vírus YFV-Gluc clones 3 e 4, na terceira passagem	47
Figura 17 - Caracterização fenotípica dos vírus recombinantes por ensaio de placa.	48
Figura 18 - Mensuração da atividade de <i>Gaussia</i> Luciferase dos vírus recombinantes na passagem três.	48
Figura 19 - Mensuração da atividade de <i>Gaussia</i> Luciferase dos vírus recombinantes na sexta passagem, após 72 horas de infecção.	49
Figura 20 - RT-PCR dos clones 3 e 4, da terceira até a sexta passagem	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
BHK-21	<i>Baby hamster kidney</i> (célula de rim de bebê hamster)
C	Proteína do capsídeo
cDNA	DNA complementar
C-terminal	Carboxi-terminal
DENV	<i>Dengue vírus</i> (Vírus da Dengue)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido deoxiribonucléico)
dNTPs	Deoxinucleotídeos trifosfato
DO	Densidade óptica
E	Proteína do Envelope
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamina tetraacético)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio imunosorvente ligado à enzima)
FA	Febre Amarela
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
FVV	<i>French Viscerotropic virus</i> (Vírus Viscerotropico Francês)
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (Proteína Fluorescente Verde)
GLuc	Gaussia Luciferase
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (Vírus da imunodeficiência humana)
IFA	Imunofluorescência
Ig	Imunoglobulina
JEV	Japanese Encephalitis Virus (Vírus da Encefalite Japonesa)
Kb	Quilobase
LASV	Lassa Virus
LiOAc	Acetato de lítio
MEM	<i>Minimal essential médium</i> (Meio mínimo essencial)
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> (Multiplicidade de infecção)

MTT	<i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i> (Tetrazólio de Brometo Azul de tiazol)
NS	Proteínas não-estruturais
Nt	Nucleotídeos
ORFs	<i>Open reading frames</i> (Matriz de leitura aberta)
PB	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato salino)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PFU	<i>Plaque-forming unit</i> (Unidade formadora de placa)
pH	Potencial hidrogeniônico
RE	Retículo endoplasmático
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucléico)
RPM	Rotação por minuto
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase <i>via</i> transcriptase reversa)
SFB	Soro fetal bovino
ssRNA	<i>Single-stranded RNA</i> (RNA fita simples)
TRP	<i>Tryptofan</i> (Triptofano)
UTR	<i>Untranslated region</i> (Região não traduzida)
VLP	<i>Virus-like particles</i> (Partículas semelhantes a vírus)
WNV	<i>West Nile Virus</i> (Vírus do oeste do Nilo)
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i> (Proteína Fluorescente Amarela)
YFV	<i>Yellow Fever Virus</i> (Vírus da Febre Amarela)
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i> (Base nitrogenada para levedura)
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i> (Levedura peptona- dextrose)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 O vírus da Febre Amarela	15
2.1.1 Estrutura e organização gênica	15
2.1.2 Ciclo replicativo	18
2.2 Aspectos epidemiológicos da Febre Amarela	20
2.2.1 Distribuição geográfica	20
2.2.2 Transmissão	21
2.3 Patogenia e manifestações clínicas	22
2.4 Diagnóstico	24
2.5 Tratamento	24
2.6 Prevenção e controle	25
2.7 Sistema de genética reversa para flavivírus	27
2.7.1 Recombinação homóloga em levedura	29
2.7.2 Utilização de repórteres como marcadores moleculares	30
3 JUSTIFICATIVA	32
4 PERGUNTA CONDUTORA	33
5 OBJETIVOS	34
5.1 Objetivo Geral	34
5.2 Objetivos Específicos	34
6 MATERIAIS E MÉTODOS	35
6.1 Cultivo de células e vírus	35
6.2 Construção do vírus recombinante YFV-GLuc	36
6.2.1 Preparação do vetor	36
6.2.2 Reação de PCR para recombinação	36
6.2.3 Transformação em levedura	38
6.2.4 Extração de DNA plasmidial de levedura e confirmação dos clones	38
6.3 Recuperação da partícula viral recombinante.	39
6.3.1 Amplificação do genoma completo dos vírus recombinantes por PCR e transcrição <i>in vitro</i>	39

6.3.2 Transfecção do RNA viral em células BHK-21 por eletroporação	39
6.3.3 Imunofluorescência indireta	40
6.3.4 Mensuração da atividade da enzima Luciferase	40
6.4 Caracterização fenotípica dos vírus recombinantes em cultivo celular	40
6.4.1 Infecção viral	40
6.4.2 Ensaio de placa	41
6.5 Caracterização genotípica do vírus recombinante YFV-GLuc	41
6.5.1 Extração do RNA viral e sequenciamento	41
7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	42
8 RESULTADOS	43
8.1 Construção e confirmação da construção YFV-GLuc	43
8.2 Recuperação da partícula viral e caracterização fenotípica in vitro do vírus recombinante	45
8.2.1 Recuperação da partícula viral	45
8.2.2 Infecção viral	46
8.2.3 Ensaio de placa	47
8.2.4 Mensuração da atividade da <i>Gaussia</i> luciferase	47
8.3 Caracterização genotípica do vírus recombinante YFV-GLuc	49
9 DISCUSSÃO	51
10 CONCLUSÕES	56
11 PERSPECTIVAS	57
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

A febre amarela (FA) é uma doença viral aguda, causada por um arbovírus da família *Flaviviridae*. Pertencente ao gênero *Flavivirus*, o vírus da febre amarela (YFV, *Yellow Fever Virus*) apresenta capsídeo icosaédrico, envolto por um envelope viral. O genoma viral é composto de RNA de fita simples e polaridade positiva, com cerca de 11 kilobases (CHAMBERS et al., 1990).

Apesar do esforço do Ministério da Saúde no combate a novos focos da FA, através de monitoramento e vacinação em áreas endêmicas, o YFV continua endêmico em diversas regiões do Brasil, e surtos esporádicos têm sido notificados nos últimos anos (BRASIL, 2010).

Mesmo com diversos estudos em relação ao YFV, não há tratamento antiviral específico. Somado a isto, muitos aspectos da biologia viral ainda não são bem compreendidos (BRASIL, 2010).

O aprimoramento de técnicas da biologia molecular, como o sistema de genética reversa tem permitido: a manipulação de vírus de genoma de RNA; a elucidação de diversos aspectos do ciclo de vida viral, a exemplo dos estudos que descrevem o papel das proteínas virais no ciclo replicativo, na disseminação viral no mosquito vetor, na patogenicidade e também no esclarecimento de mecanismos de evasão da resposta imunológica (RUGGLI; RICE, 1999). A genética reversa tem facilitado, ainda, a avaliação e triagem de drogas antivirais e desenvolvimento de estratégias para a construção de vetores virais (NG et al., 2007).

Neste estudo apresentamos a construção e caracterização de um vírus recombinante de FA, expressando o repórter *Gaussia* Luciferase, através da técnica de recombinação homóloga em levedura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O vírus da Febre Amarela

A FA é uma doença viral febril, aguda, não contagiosa, transmitida por mosquitos infectados e de gravidade variável. É causada por um arbovírus da família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus* (BRASIL, 2010).

Três gêneros pertencem à família *Flaviviridae*: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*, que abrigam diversos vírus causadores de doença animal e humana (RIDPATH; FLORES, 2007). O YFV é o protótipo da família, que recebeu esse nome devido a um sintoma observado na FA clássica, a icterícia (do latim “*flavus*” = amarelo) (VASCONCELOS, 2003).

Estudos de análise de sequência de nucleotídeos (nt) sugerem que esse vírus se originou no Leste e na parte Central da África, posteriormente se estendeu à parte Oeste e foi transportado do Oeste da África para América do Sul (BARRET, 2010) .

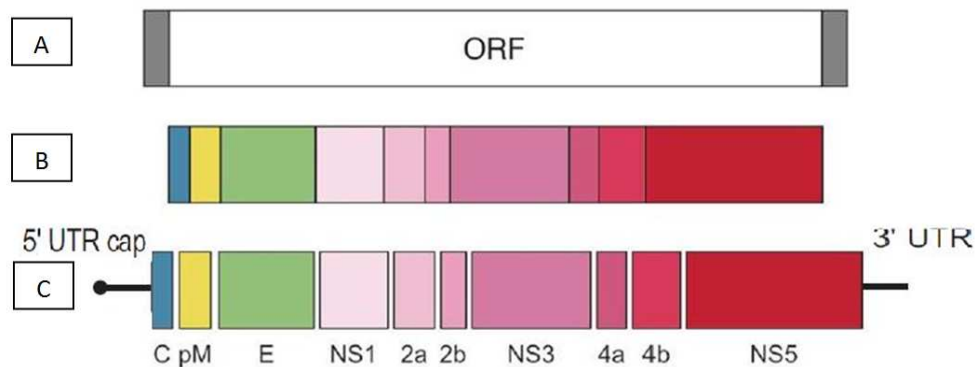
Existem atualmente sete genótipos do YFV circulando no mundo: cinco genótipos em diferentes regiões da África (genótipo I e II do Oeste da África, genótipo do Leste e África Central, genótipo do Leste da África e genótipo Angola) e dois na América do Sul (genótipo I e II da América do Sul). O genótipo I é o mais frequente na América Latina, sendo encontrado no Brasil, Panamá, Venezuela, Trinidad, Colômbia, Equador; o genótipo II está circulando no Peru, Bolívia e em alguns isolados do Brasil e Trinidad (BARRET, 2010).

2.1.1 Estrutura e organização gênica

Os flavivírus são vírus envelopados, com capsídeo icosaédrico, de aproximadamente 25-40 nanômetros (nm). A partícula viral integra mede cerca de 40-50 nm. O YFV apresenta o genoma não-segmentado, constituído de RNA de fita simples e polaridade positiva, medindo cerca de 11kilobases (kb) de comprimento (CHAMBERS et al., 1990).

Aproximadamente 3411 aminoácidos são codificados por 10862 nt. Esta molécula de RNA possui uma fase aberta de leitura (*Open reading frame – ORF*), que codifica uma única e grande poliproteína, que é processada por proteases virais e celulares em três proteínas estruturais (C, prM, E) e sete não estruturais (NS – NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (GLUBER; KUNO; MARKOFF, 2007). O genoma viral contém ainda, duas regiões não traduzidas (untranslated region – UTR) nas extremidades 5' e 3' do genoma (Figura 1). Na extremidade 5'UTR existe uma estrutura Cap tipo I (7-metil-guanosina) e na 3'-UTR existe uma sequência conservada de alguns nucleotídeos que dão origem a uma estrutura de *stem-loop* (SL). Esta estrutura SL confere estabilidade ao genoma e também fornece sinais para iniciação da tradução e síntese de RNA (CHAMBERS et al., 1990; GARDNER; RYMAN, 2010).

Figura 1 - Representação esquemática da organização do genoma dos flavivírus.



Fonte: Modificado de Rothman (2004).

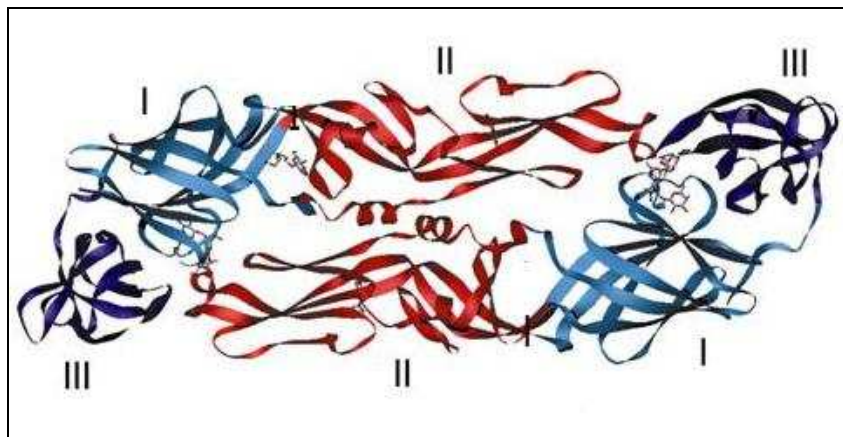
Nota: o genoma do YFV apresenta apenas uma fase aberta de leitura (ORF) (A) que é transcrita em uma poliproteína precursora (B), e é processada por proteases celulares e virais gerando dez proteínas virais: três proteínas estruturais e sete não estruturais.

A proteína C interage com o RNA viral dando origem à estrutura do nucleocapsídeo e também com a proteína estrutural do envelope, sendo essencial para formação da partícula viral. A região C-terminal apresenta um domínio hidrofóbico importante para a translocação da proteína precursora prM para o retículo endoplasmático (RE) na célula hospedeira, atuando como sequência sinal para o deslocamento da proteína (CHAMBERS et al., 1990; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

A proteína prM codifica o precursor da proteína da membrana (M), produzida no complexo de Golgi, durante a maturação viral. As proteínas prM e M são encontradas nos vírions intracelulares e extracelulares, respectivamente (CHAMBERS et al., 1990).

A proteína E é a principal glicoproteína da superfície viral e, por isso é alvo da resposta imune protetora e induz a formação de anticorpos (Ac) neutralizantes (GLUBER, KUNO, MARKOFF, 2007). É responsável pela ligação ao receptor celular, penetração e também hemaglutinação. A proteína E é formada por três domínios (Figura 2): domínio I (central - DI), domínio II (domínio da protusão lateral - DII) que contém um peptídeo requerido para a fusão do vírion com o endossomo e o domínio III (DIII) que é um domínio de extensão do DI, que liga o vírus ao receptor celular (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; MESSER et al., 2012).

Figura 2 – Representação da proteína E, a principal glicoproteína da superfície viral.



Fonte: Adaptado de Mukhopadhyay, Kuhn, Rossmann (2005).

Nota: a proteína em sua estrutura homodimérica. Os domínios I, II e III estão representados em azul claro, vermelho e azul escuro, respectivamente.

A proteína NS1 é uma glicoproteína que pode ser encontrada na superfície celular, extracelular e na matriz celular interna (CHAMBERS et al., 1990). Estimula a formação de Ac que tem atividade de fixação de complemento (CHANG, 1997).

As proteínas NS2A, NS2B, NS4A E NS4B são pequenas proteínas hidrofóbicas. A NS2A tem sido implicada como responsável pelo correto processamento de NS1. NS2B atua como cofator para a proteína NS3. A proteína NS3 é bastante conservada entre os flavivírus e

tem atividade de protease e também nucleotídeo trifosfase/helicase. As proteínas NS4A e NS4B estão envolvidas na replicação viral (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

A proteína NS5 também é bastante conservada nos flavivírus e está envolvida na replicação viral, estimula atividade NTPase, RTPase da proteína NS3 (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). Tem sido implicada de participar de mecanismos de evasão da resposta imune e pode atuar como antagonista da via de sinalização de *interferon* (IFN) do tipo I (LAURENT-ROLLE et al., 2010; LINO et al., 2006).

2.1.2 Ciclo replicativo

Diferentes linhagens celulares são permissivas à infecção *in vivo e in vitro* aos flavivírus (CHAMBERS et al., 1990). A replicação do genoma e produção da progênie viral ocorre completamente no citoplasma de células hospedeiras (figura 3) (RIDPATH; FLORES, 2007).

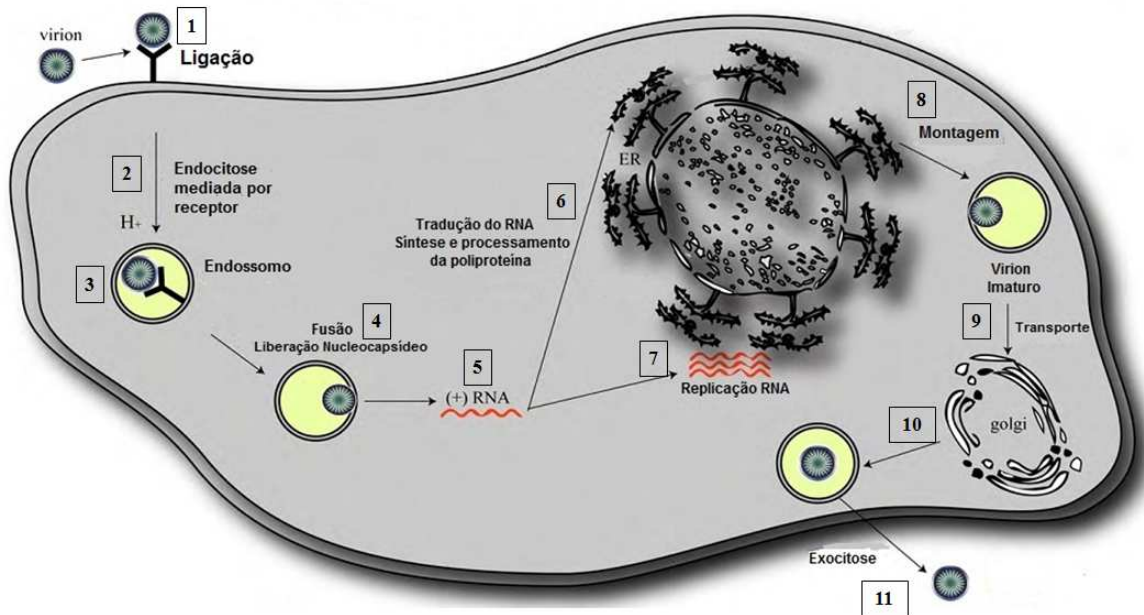
Partículas virais extracelulares se ligam às células através de receptores celulares de superfície e penetram na célula hospedeira por endocitose mediada por um receptor específico para a proteína E do envelope viral. Ocorre, então um rearranjo conformacional na glicoproteína E, devido ao baixo pH no endossomo, o que facilita a fusão do envelope lipídico viral com a membrana endossomal e liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular (PASTORINO et al., 2010).

Após a liberação do nucleocapsídeo, ocorre a tradução imediata do genoma. A tradução da ORF é cap-dependente, e é iniciada no primeiro códon UAG perto da região 5' do genoma viral, utilizando fatores de iniciação do hospedeiro, como componentes do complexo eIF4F ligado à membrana ribossomal, bem como outras proteínas. O processamento da poliproteína produzida em proteínas maduras envolve clivagens sequenciais mediadas por proteases virais e da célula hospedeira (GARDNER; RYMAN, 2010).

Após a tradução, inicia-se o processo de replicação do genoma viral. As proteínas não estruturais recém sintetizadas se associam para formar o complexo replicase. O complexo reconhece estruturas secundárias na extremidade da região 3' do genoma viral, e a proteína NS5 sintetiza cópias de fitas de RNA de sentido antígenômico (polaridade negativa). Essas

fitas de RNA sintetizadas são rapidamente transcritas para produzir novas fitas de RNA positivas. A replicação de RNA é assimétrica, produzindo fitas positivas mais eficientemente que a produção de negativas (GARDNER; RYMAN, 2010).

Figura 3 – Representação do ciclo replicativo de flavivírus.



Fonte: Pastorino et al. (2010).

Nota: 1- Partículas virais se ligam a receptores para proteína E; 2- Vírus penetra por endocitose mediada por receptor; 3- No endossomo ocorre rearranjo da proteína E; 4- Fusão do envelope lipídico com membrana endossomal; 5- Liberação do genoma; 6- Tradução imediata do genoma (é Cap-dependente, iniciada no 1º códon UAG); 7- Replicação do genoma viral (NS formam o complexo replicase e NS5 sintetiza cópias de RNA -); 8- no RE, proteína C se complexa com RNA genômico e são empacotados pela membrana do RE (heterodímeros de E e M); 9- Víron imaturo vai ser transportado ao complexo de Golgi; 10- em Golgi ocorre clivagem de prM em M por furinas celulares, rearranjo da proteína E (maturação viral); 11- Os vírions maduros vai ser liberados por exocitose.

A formação de partículas virais imaturas ocorre no RE, onde a proteína C é complexada ao RNA genômico. Estes são empacotados pela membrana do RE, contendo heterodímeros das proteínas E e M. Durante a montagem e transporte das partículas virais imaturas, ocorre a maturação viral no complexo de Golgi, onde há a clivagem de prM em M por furinas celulares (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007), e rearranjo da proteína E, com consequente liberação das partículas virais maduras por exocitose (RIDPATH; FLORES, 2007).

2.2 Aspectos epidemiológicos da febre amarela no Brasil

A FA é uma doença sazonal, ocorrendo no Brasil com maior frequência nos meses de janeiro a abril, que é período com maior índice pluviométrico (BRASIL, 2011), acomete principalmente os seres humanos do sexo masculino, com maior incidência a partir dos 15 anos, onde há maior exposição profissional. Está relacionada à penetração em zonas silvestres de área endêmica e em pessoas não vacinadas que residem próximas à ambientes selvagens, onde circula o vírus, além de turistas (principalmente os que praticam ecoturismo) (GONÇALVES et al., 2010; VASCONCELOS, 2003).

2.2.1 Distribuição geográfica

O YFV é endêmico em áreas tropicais da África e América Latina, correspondente a uma população de aproximadamente 900 milhões de pessoas em risco de infecção, em 45 países (32 na África e 13 na América Latina). Embora o YFV não tenha sido relatado na Ásia, a região está sob risco de infecção porque contém as condições requeridas para a transmissão do vírus, como a exposição ao mosquito transmissor da FA urbana (*Aedes aegypti*), não imunização de pessoas, grande contato com pessoas que vivem em áreas endêmicas (COURA, 2008; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012).

Estima-se que ocorram anualmente 200.000 casos novos, com 30.000 mortes em todo o mundo. Um pequeno número de infecções ocorre em países livres devido à importação de casos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012).

Em 2008, dois estados (Goiás e Mato Grosso do Sul) e o Distrito Federal foram responsáveis pelo registro de 23 casos (confirmados laboratorialmente) de FA, com 13 mortes. Esses casos tiveram origem de um surto de epizootia em macacos que teve início em abril de 2007 e se espalhou para mais de 80 municípios no Brasil. Dos 23 casos em seres humanos confirmados, 21 pessoas não haviam sido vacinadas e duas haviam sido há mais de 20 anos. Para que houvesse aumento da cobertura vacinal da população em risco através de uma campanha de vacinação de emergência, o Ministério da Saúde do Brasil suspendeu a exportação da vacina fabricada no Brasil e submeteu um pedido de mais de quatro milhões de

doses da vacina do estoque emergencial global (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012).

No período de 1990 a 2010 (período de vinte anos), ocorreram 587 casos com 259 óbitos. O maior número de registros foi em Minas Gerais, seguido do Maranhão, Goiás, Pará, e Amazonas. No entanto, outros estados também registraram casos de FA: Acre, Amapá, Roraima, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantis, Distrito Federal, São Paulo, Bahia, Paraná e Rio Grande do Sul (BRASIL, 2012).

2.2.2 Transmissão

O YFV tem o mosquito como principal vetor, que carrega o patógeno entre hospedeiros, principalmente entre macacos e seres humanos. As principais espécies de mosquitos transmissores de FA são: *Aedes*, *Haemagogus* e *Sabethes* (COURA, 2008). Esses culicídeos se reproduzem tanto em torno das casas (urbanos), selva (selvagens) ou em ambiente peri-domésticos (semi-domésticos) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012). No Brasil, os principais vetores são: *Haemagogus janthinomys* (selvagens) e *Aedes aegypti* (urbanos) (BRASIL, 2005).

Os hospedeiros naturais são os primatas não-humanos (como macaco), e os hospedeiros acidentais são os seres humanos não imunizados (BRASIL, 2010).

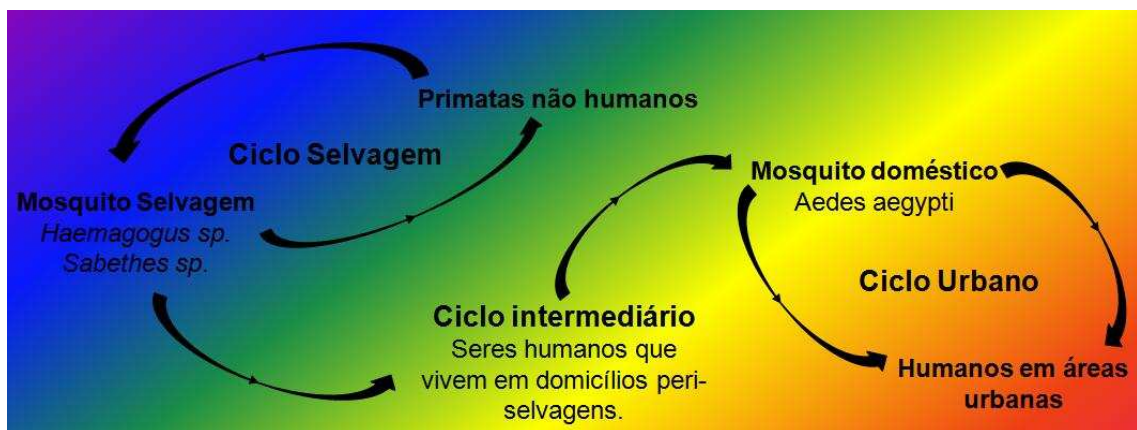
Existem dois tipos de ciclos de transmissão que são definidos através do tipo de hospedeiro, localização geográfica e espécie vetorial: ciclo selvagem e o ciclo urbano (GONÇALVES, 2010; VASCONCELOS, 2003). O ciclo selvagem da FA ocorre em macacos de florestas tropicais que são infectados por mosquitos selvagens; os macacos infectados disseminam o vírus para outros mosquitos que se alimentam deles (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012).

O ciclo urbano ocorre quando uma pessoa infectada introduz o vírus em áreas de população densa com grande número de pessoas não imunizadas e com alto índice de mosquitos do gênero *Aedes sp*; os mosquitos que são infectados durante o repasto sanguíneo, transmitem o vírus entre pessoas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012).

Na África, existe um terceiro ciclo de transmissão que não foi descrito na América Latina: ciclo intermediário. Esse ciclo acontece em áreas úmidas ou semi-úmidas da África é o tipo mais comum de surto na África. A transmissão ocorre quando há um aumento de contato entre pessoas, mosquitos semi-domésticos e macacos. Aldeias diferentes localizadas em uma mesma área podem sofrer casos simultâneos. Um surto pode se tornar epidemia mais grave quando a infecção é realizada em zona povoada por mosquitos domésticos e pessoas não vacinadas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012) (Figura 4).

O período de transmissibilidade corresponde à fase de viremia do paciente. Geralmente o sangue do hospedeiro é infectante de 24 a 48 horas antes do aparecimento dos sintomas e até 3 a 5 dias após a infecção. Embora a FA não seja transmitida de pessoa a pessoa, pacientes virêmicos devem ser isolados com mosquiteiros em áreas onde há o vetor potencial, até que se confirme o caso (GARDNER; RYMAN, 2010).

Figura 4 – Representação esquemática do ciclo de transmissão da Febre Amarela.



Fonte: Adaptado de Gardner e Ryman (2010).

Nota: os três ciclos de transmissão da febre amarela, mostrando os vetores virais e hospedeiros em cada ciclo.

2.3 Patogenia e manifestações clínicas da Febre Amarela

O período de incubação é de três a seis dias, seguido de infecção e o quadro clínico pode se dar em duas fases (bifásico). A primeira é a fase aguda, que também pode ser conhecida como período de infecção, que geralmente causa febre alta, mialgias, cefaleia, calafrios, prostração, náusea ou vômito, pulso lento em relação à temperatura alta (sinal de *Faget*). A maioria dos pacientes melhora e os sintomas desaparecem depois de três a quatro

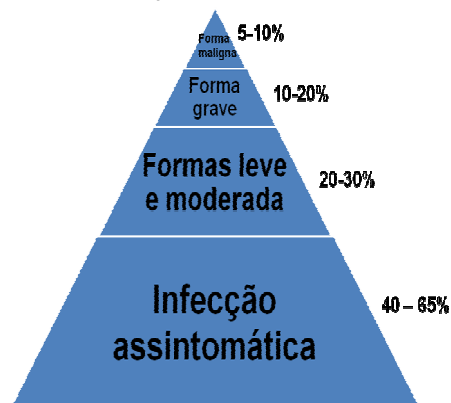
dias, no entanto, aproximadamente 15% dos pacientes entram na segunda fase da infecção (COURA, 2008; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012; VASCONCELOS, 2003).

A segunda fase é mais tóxica (fase de intoxicação), e ocorre dentro de 24 horas após a remissão inicial, causando febre alta, diarreia e comprometimento de diversos sistemas corporais. O paciente desenvolve icterícia rapidamente, dor abdominal, vômitos, manifestações hemorrágicas (hematêmese, melena, epistaxe, hematúria, sangramento vestibular da cavidade oral) prostração intensa, insuficiência hepática e renal, podendo levar ao coma e morte. Cerca de 50% dos pacientes morrem dentro de 10 a 14 dias, e o restante se recupera sem danos significativos (BRASIL, 2010; COURA, 2008).

Após a picada do mosquito fêmea infectado, o vírus é internalizado por endocitose mediada por receptor, os vírus atingem os nódulos linfáticos regionais onde iniciam sua replicação nos linfócitos e macrófagos; após a replicação, os vírus caem na corrente sanguínea (provocando viremia) e vão para o órgão alvo (fígado). No fígado, os vírus penetram nos hepatócitos e células de Kupffer. O vírus, então, lisa hepatócitos, causando necrose; há ainda intensa capilarite, corroborando com fenômenos hemorrágicos (COURA, 2008).

A resposta à infecção é ampla e variável. A FA pode produzir infecções assintomáticas ou sub-clínicas, formas leves (oligossomáticas), formas graves e até formas fulminantes. Acredita-se que 90% dos casos de FA sejam classificados como leve e assintomáticas, e que são raramente diagnosticadas, como ilustrado na figura 5 (VASCONCELOS, 2003).

Figura 5 – Representação esquemática da distribuição das formas clínicas da Febre Amarela.



Fonte: Adaptado de Vasconcelos (2003).

Nota: distribuição das formas clínicas de FA, que pode ser descrito como “iceberg” da enfermidade. Maioria dos casos de FA é assintomático, correspondendo a 40 e 65% dos casos da FA. As formas leve e moderada correspondem entre 20 e 30% dos casos. Já os casos fatais são mais raros, constituindo a ponta do iceberg, respondendo por 5 a 10% dos casos da doença.

2.4 Diagnóstico

Diagnóstico pode ser clínico, epidemiológico e laboratorial (COURA, 2008). Durante os estágios iniciais da doença, o diagnóstico é difícil e pode ser confundido com outras viroses; necessitam ainda da história epidemiológica do paciente para sua identificação. Em pacientes mais graves, a FA pode ser confundida com malária grave, febre hemorrágica do dengue, leptospirose, hepatites virais (principalmente B e D), febre do Nilo Ocidental, envenenamento e septicemia (COURA, 2008; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012; VASCONCELOS 2003).

O diagnóstico laboratorial pode ser feito através do isolamento viral de amostras de sangue ou tecido hepático, pela detecção de antígenos em tecido (imunofluorescência, imunoperoxidase, PCR e hibridização *in situ*), sorológico (ELISA de captura de IgM, inibição de hemaglutinação, fixação de complemento e soroneutralização). Ensaio bioquímicos podem detectar aumento em aminotransferases (AST/TGO e ALT/TGP) e de bilirrubina (BRASIL, 2010, COURA, 2008).

2.5 Tratamento

Não há terapia antiviral específica para FA, sendo necessário um tratamento de suporte com o objetivo de diminuir os sintomas e fornecer conforto ao paciente (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012). Cuidados de suporte podem melhorar os resultados em pacientes graves, no entanto, raramente está disponível para áreas pobres. Pacientes graves, quando possível devem ser tratados em unidades de terapia intensiva (UTI), com o objetivo de reduzir as complicações de letalidade (VASCONCELOS, 2003).

Vários compostos com atividade antivirais *in vitro* têm sido descritos, como a ribavirina e o interferon- α e β . Contudo, os resultados de ensaio utilizando ribavirina em macacos infectados experimentalmente foram conflitantes. Estudos utilizando interferon- γ em macacos infectados, resultaram em atraso no início da viremia, mas não se teve efeito sobre a sobrevivência desses animais (GARDNER; RYMAN, 2010).

2.6 Prevenção e controle

A vacinação é a medida preventiva mais importante contra FA. A vacina é segura, eficaz e acessível, proporcionando imunidade efetiva dentro de uma semana para 95% de pessoas vacinadas. Os efeitos secundários graves são raros, mas têm sido relatadas raramente em áreas endêmicas e em viajantes vacinados no Brasil, Austrália, Estados Unidos, Peru e Togo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012).

A vacinação preventiva pode ser oferecida através da imunização infantil ou em campanhas de vacinação em massa o que garante o aumento da cobertura vacinal em países de risco, bem como para quem viaja para área endêmica (GONÇALVES et al., 2010; VASCONCELOS, 2003) (figura 6). Para a população que viaja de áreas livres para áreas endêmicas, recomenda-se que a vacinação seja feita dez dias antes da entrada nessas áreas endêmicas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012).

Duas vacinas foram desenvolvidas na década de 30, no entanto a atenuação foi realizada por métodos diferentes: A) A vacina FVV, derivada de 128 passagens do vírus selvagem viscerotrópico Francês (French viscerotropic vírus – FVV) em cérebro de camundongo, isolado em 1927 no Senegal; B) A vacina 17D, derivada de 176 passagens de cultura de tecidos de embrião de murinos e pintos a partir da cepa selvagem Asibi. Em 1961, a vacina FVV foi retirada do mercado, porque sua administração era associada à alta incidência de encefalite em crianças (GARDNER; RYMAN, 2010).

Atualmente a vacina é produzida com vírus vivo atenuado com a amostra 17D. Existem duas subcepas de YFV utilizadas para a vacinação: A) 17DD, cuja tecnologia é a usada para a fabricação de vacinas no Brasil pela Fundação Oswaldo Cruz (Biomanguinhos); B) 17D-204, utilizada no restante do mundo (GONÇALVES et al., 2010; VASCONCELOS, 2003). Entre as duas subcepas, não há diferença na imunogenicidade, apesar destas apresentarem pequenas diferenças a nível de genoma (MONATH et al., 2002).

Como a vacina é produzida a partir de ovos embrionados e é feita através na atenuação de vírus vivo, sofre algumas restrições. Não podem ser imunizadas crianças com menos de nove meses para vacinação de rotina, ou menos de seis meses em casos de epidemias; mulheres grávidas, exceto em caso de surto, quando o risco é alto; pessoas com alergia grave

2.7 Sistema de genética reversa para flavivírus.

O sistema de genética reversa é uma importante ferramenta que permite a manipulação de vírus de genoma de RNA polaridade positiva, a partir de seu DNA complementar (cDNA) clonado (PU et al., 2011). A transcrição *in vitro* a partir deste cDNA clonado, irá produzir RNA transcrito que são réplicas de RNA genômico, e a introdução destes transcritos em cultura de células susceptíveis poderá resultar em infecção viral produtiva (POLO et al., 1997) (Figura 7).

O primeiro sistema de genética reversa descrito para flavivírus tem mais de 20 anos, e foi desenvolvido para a construção de um clone infeccioso de febre amarela (RICE et al., 1989). Desde então essa ferramenta vem sendo utilizada para a construção de outros flavivírus: dengue vírus sorotipo 2 (DENV2) (POLO et al., 1997), dengue vírus sorotipo 4 (DENV4) (LAI et al., 1991), vírus do Oeste do Nilo (WNV) (YAMSHCHIKOV, 2001), vírus da encefalite Japonesa (JEV) (YUN et al., 2003; ZHAO et al., 2005).

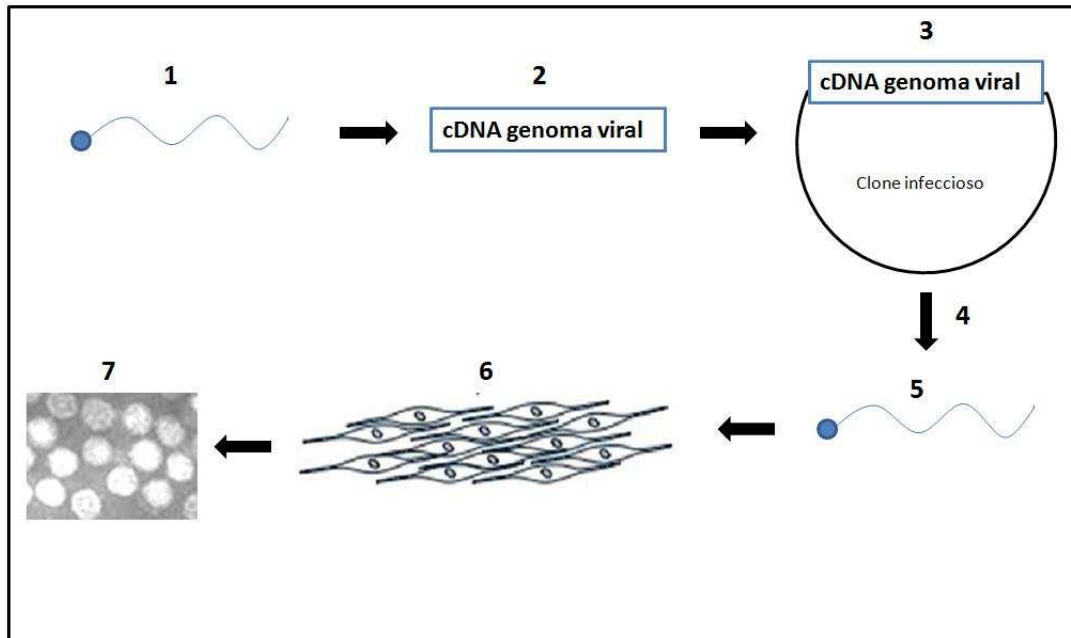
Os sistemas de genética reversa para flavivírus são importantes para estudos de replicação e patogênese viral, desenvolvimento de vacinas e triagem de drogas antivirais (LI; AASKOV; LOTT, 2011). Mutações podem ser introduzidas em diversas regiões do genoma e o efeito no fenótipo do vírus pode ser analisado, para estudo do impacto desta variação genética induzida (POLO et al., 1997; TIERNEY; LAMOUR, 2005).

No entanto, a manipulação destes clones infecciosos de flavivírus não é fácil, por causa da aparente instabilidade das sequências de cDNA clonados em sistemas procariotos (POLO et al., 1997). Para superar essa dificuldade, clones de cDNA de flavivírus têm sido desenvolvidos em plasmídeos de baixo número de cópias, cromossomos artificiais de bactéria, sistema de dois plasmídeos e em plasmídeos de levedura (LI; AASKOV; LOTT, 2011).

Sistemas de genética reversa baseados na construção de replicons subgenômicos têm sido utilizados para estudo de flavivírus. Replicons ou RNA auto-replicativos são partículas virais não-infecciosas que possuem os elementos genéticos necessários para a replicação do seu genoma na célula, mas deficiente de genes estruturais necessários para a produção de partículas virais infecciosas (JONES; PATKAR; KUHN, 2005). A vantagem do replicon em

relação ao clone infeccioso é que a replicação do genoma pode ser isolada da morfogênese viral, permitindo o mapeamento das proteínas e domínios que participam da replicação viral.

Figura 7 – Representação esquemática do sistema de genética reversa para Flavivirus



Fonte: Elaborada pela autora

Nota: 1- O RNA genômico fita positiva será utilizado como molde para a produção do cDNA viral; 2- O cDNA viral produzido será clonado em um vetor, como mostrado em 3; 4- A partir do cDNA clonado, vai ser realizada a transcrição *in vitro*; 5- O RNA sintetizado *in vitro* é semelhante ao RNA genômico; 6- Esses RNAs serão então, transfectados em células permissivas; 7- A transfecção em células permissivas produzirá partículas virais infecciosas.

A construção de replicons já foi descrita para diversos flavivírus como YFV (JONES; PATKAR; KUHN, 2005), DENV2 (NG et al., 2007), vírus dengue sorotipo 3 (DENV3) (MOSIMANN et al., 2010), DENV4 (ALCARAZ-ESTRADA et al., 2010). Estes replicons têm sido empregados para estudo do papel das proteínas não-estruturais no ciclo de vida viral (JONES; PATKAR; KUHN, 2005), estudos da replicação viral (ALCARAZ-ESTRADA et al., 2010); além disso, representam um sistema bastante interessante e promissor para desenvolvimento e triagem de antivirais (NG et al., 2007; ZOU et al., 2011).

Outra ferramenta que têm sido empregada em estudos de virologia molecular é a construção de vírus recombinantes contendo em seu cDNA genes repórteres clonados. Esses repórteres são genes com fenótipos facilmente mensuráveis, fornecendo assim, meios valiosos para o acompanhamento de diferentes processos biológicos, os quais vêm ajudando a elucidar

aspectos da patogenia, ciclo viral, desenvolvimento de vacinas e triagem de drogas. (NG et al., 2007; PATKAR; KUHN, 2008).

Para o YFV, os sistemas de genética reversa tem permitido a manipulação do genoma viral para a construção de replicons e desenvolvimento de novas vacinas humanas. Isso se deve ao fato de que a vacina de vírus atenuado tem sido usada há mais de 70 anos com segurança e eficácia devido a algumas propriedades da vacina como a replicação viral no hospedeiro limitada, mas com significativa expansão e disseminação viral, produzindo resposta imune robusta e de longa duração. Assim, o vírus atenuado tem se tornado muito atrativo como vetor de expressão para o desenvolvimento de novas vacinas vivas atenuadas (BONALDO et al., 2007).

O desenvolvimento da tecnologia de clone infeccioso tem permitido a manipulação do genoma do YFV-17D para a expressão de genes heterólogos. Bonaldo et al. (2007) estabeleceram um método para construção de um vírus recombinante viável, para a geração de flavivírus contendo inserção de genes inteiros entre os genes das proteínas E e NS1, para permitir o correto processamento da poliproteína precursora. O gene heterólogo inserido foi da proteína fluorescente verde (GFP, *Green Fluorescent Protein*) e o vírus foi estável até a décima passagem.

Utilizando a mesma ferramenta, Bredenbeek et al. (2006) construíram a quimera YFV-17D/LASV-GPC. O vírus vacinal YFV-17D foi utilizado como vetor para o precursor da glicoproteína do Arenavirus Lassa (Lassa virus – LASV). A proteína GPC foi inserida na região intergênica E/NS1. A quimera se replicou pouco em porquinhos da Índia, mas induziu a formação de anticorpos neutralizantes contra os antígenos do LASV e YFV-17D.

Portanto, esta ferramenta descrita por Bonaldo et al. (2007) e Bredenbeek et al. (2006) poderá ser útil para o desenvolvimento de vacinas de vírus vivo atenuado para outras doenças humanas, bem como de processos celulares relacionadas às infecções virais.

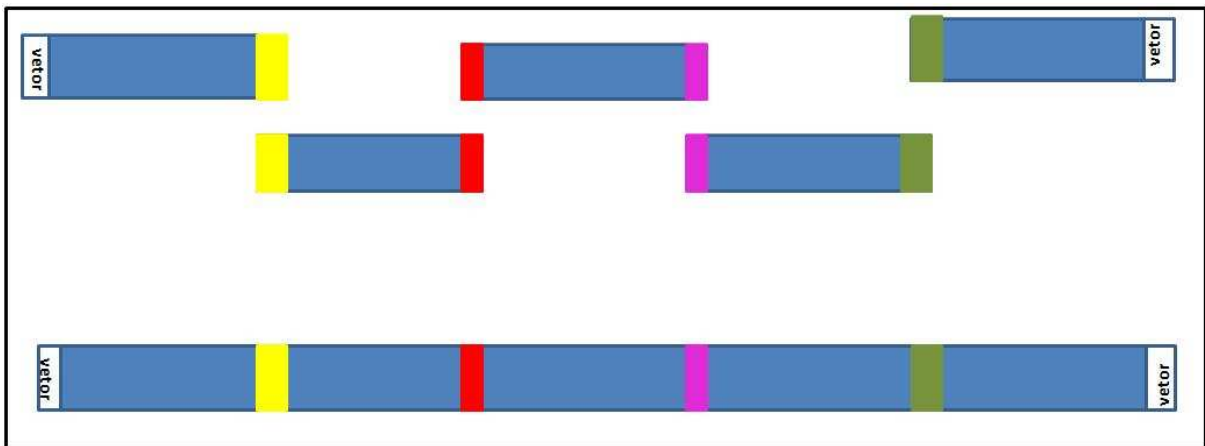
2.7.1 Recombinação homóloga em levedura

Sequências de cDNA que são instáveis em sistemas procariotos, frequentemente são estáveis em sistemas eucariotos. Leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são muito utilizadas com o propósito de diminuir a instabilidade do genoma (POLO et al., 1997). Fragmentos

lineares de DNA tem a capacidade de estimular a recombinação nestas leveduras, e isto tem sido utilizado no desenvolvimento de estratégias de clonagem (OLDENBRURG et al., 1997).

Uma das metodologias mais amplamente empregadas é a clonagem baseada na técnica de recombinação homóloga em levedura (SHANKS et al., 2009). Nesta estratégia, um fragmento qualquer de DNA, contendo sequências homólogas ao vetor nas suas extremidades, pode ser diretamente clonado por recombinação *in vivo* neste vetor linearizado. Múltiplos fragmentos de DNA podem ser recombinados, desde que tenham sequências homólogas nas extremidades do fragmento (GIBSON, 2009) (Figura 8). A vantagem desta técnica é que ela não é limitada a presença de sítios de restrição, como os sistemas procariotos convencionais, é eficiente, simples e robusta (SHANKS et al., 2009).

Figura 8 – Representação esquemática da técnica de recombinação homóloga em levedura



Fonte: Elaborada pela autora

Nota: Fragmentos lineares de DNA (em azul) contendo sequências terminais homólogas (amarelo, vermelho, lilás e verde) às sequências terminais de um vetor linearizado e/ou de outro fragmento linear, pode ser diretamente clonado por recombinação *in vivo*.

2.7.2 Utilização de genes repórteres como marcadores moleculares

A busca pelo aprimoramento dos sistemas de genética reversa para estudo da biologia de diversos vírus tem levado a utilização de marcadores moleculares clonados em genomas virais recombinantes, com o objetivo de facilitar o acompanhamento dos diferentes processos biológicos viral. Diversos genes repórteres têm sido utilizados como marcadores moleculares e tem contribuído para o avanço nas pesquisas para flavivírus. Dentre eles podemos destacar as luciferases (como a *Renilla*, *Firefly* e *Gaussia*), que são enzimas que catalisam reações

químicas que produzem luz em organismos vivos, utilizando oxigênio molecular para oxidar seus substratos, emitindo fótons (TANNOUS et al., 2005).

As luciferases são repórteres luminescentes que têm sido empregadas em virologia para estudo da replicação, patogênese viral, análises proteômicas, desenvolvimento e triagem de drogas e também para a produção e caracterização de vetores virais vacinais. A *Gaussia* luciferase (GLuc) é a menor luciferase conhecida e apresenta algumas vantagens em relação *Firefly* e *Renilla* luciferase, tais como: ser naturalmente secretada, e por isso pode ser quantificada sem a necessidade de lise celular deixando as células intactas e disponíveis para outras análises; a GLuc expressa uma proteína luminescente com rendimentos quânticos mais elevados que as outras luciferases; e é resistente as diversas condições de pH e temperatura (TANNOUS, 2009). Além disso, devido ao seu pequeno tamanho, representa uma ferramenta importante no desenvolvimento de vetores virais, que apresentam capacidade limitada para terapia gênica (TANNOUS et al., 2005).

Nos últimos anos, tem sido ainda descritos flavivírus repórteres para JEV (YUN et al., 2003), WNV (DEAS et al., 2005) e DENV2 (LEARDKAMOLKARN; SIRIGULPANIT, 2012; ZOU et al., 2011;). Esses vírus repórteres têm sido construídos e caracterizados para estudo de replicação e patogênese viral, triagem de drogas antivirais, desenvolvimento de vetores virais vacinais.

3 JUSTIFICATIVA

A FA é uma doença viral aguda transmitida por mosquitos infectados. Estima-se que anualmente ocorram 200.000 novos casos, com cerca de 30.000 mortes em todo o mundo. O YFV é endêmico em áreas tropicais da África e América do Sul, sendo considerado um problema de saúde pública devido à proporção de pessoas que estão em risco.

Diversas abordagens têm sido empregadas para suportar estudos de patogênese e replicação viral. Uma das abordagens mais importantes é a utilização de sistemas de genética reversa, para a manipulação de vírus de RNA de fita simples de polaridade positiva. Esta abordagem é fundamental para estudos do YFV, pois permite a elucidação do papel de proteínas virais no ciclo replicativo, patogênese da infecção, estudos de competência vetorial, e também na triagem de compostos antivirais.

Com o objetivo de aprimorar ferramentas de pesquisa para o YFV, nós propomos a construção e caracterização de um vírus recombinante de FA, expressando o repórter *Gaussia* luciferase (GLuc), através da técnica de recombinação homóloga em levedura.

Acredita-se que esta construção será de grande importância para triagem de antivirais, através da mensuração da atividade enzimática da GLuc em cultivo celular; e estudos de capacidade vetorial, através da mensuração da atividade de GLuc em mosquitos infectados com este vírus recombinante. Este vírus representa ainda, uma importante ferramenta que poderá ser utilizada como vetor viral vacinal, através da expressão de genes heterólogos de proteínas virais de interesse.

4 PERGUNTA CONDUTORA

É possível construir um vírus recombinante estável de febre amarela expressando o gene repórter *Gaussia* luciferase?

5 OBJETIVOS

5.1 *Objetivo Geral*

Construir e caracterizar um vírus recombinante da febre amarela, expressando o gene repórter da *Gaussia* luciferase.

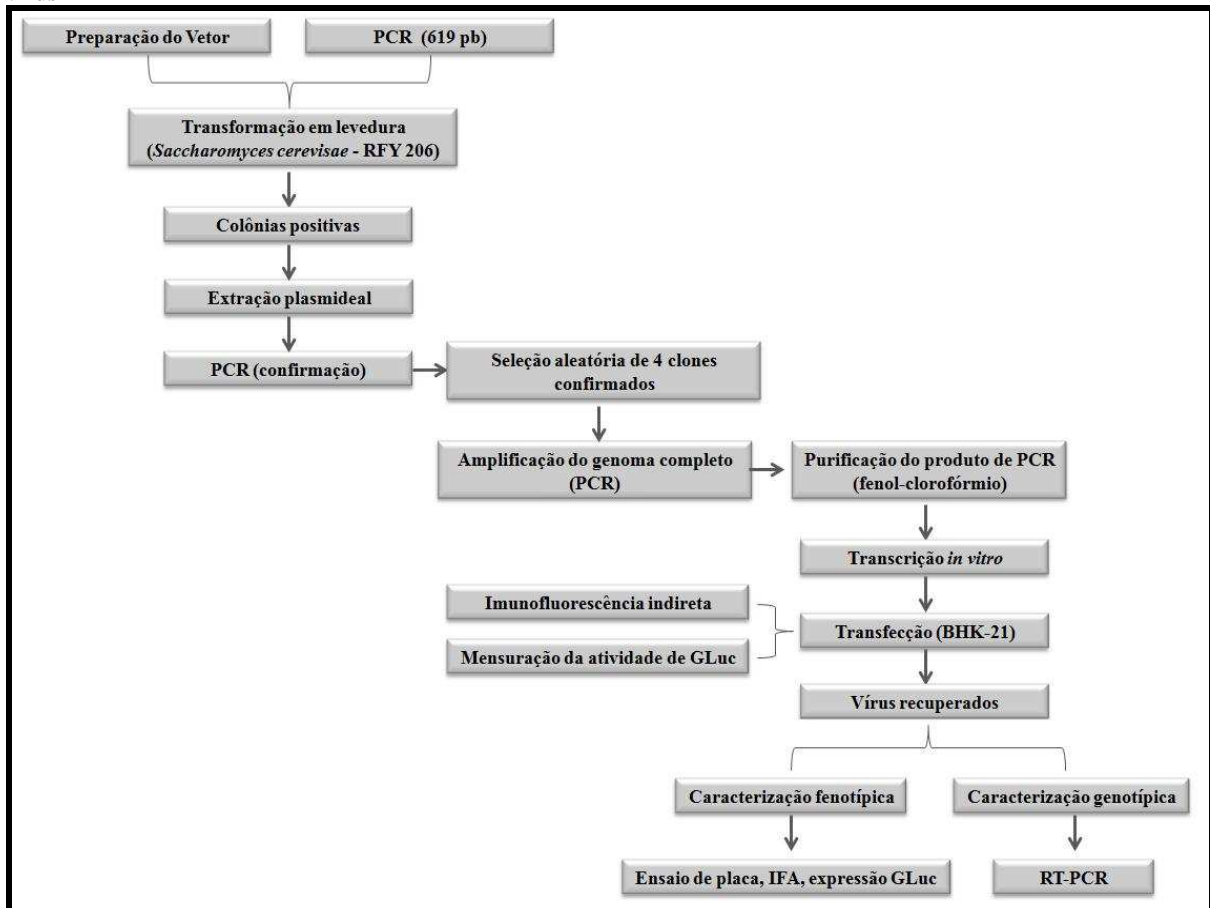
5.2 *Objetivos Específicos*

- a) Clonar o gene da proteína repórter da *Gaussia* luciferase no clone infeccioso de febre amarela;
- b) Recuperar partículas virais recombinantes expressando a proteína *Gaussia luciferase*;
- c) Caracterizar em cultivo celular o vírus recombinante construído.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

A figura 9 resume de forma esquemática os métodos empregados para a construção e caracterização do vírus YFV-GLuc

Figura 9 – Fluxograma destacando os principais pontos dos métodos utilizados na construção e caracterização do vírus



Fonte: Elaborada pela autora

Nota: Representação através de fluxograma das principais etapas utilizadas na construção e caracterização do YFV-GLuc.

6.1 Cultivo de células e vírus

As células BHK21 (*baby hamster kidney*) foram mantidas em meio MEM (*Minimal Essential Medium* – SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, EUA), suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina), em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. O vírus YFV-17D foi amplificado e titulado em células BHK21 por ensaio de

placas, para ser utilizado como controle positivo nos experimentos. Todo o estoque de células e vírus foram mantidos -80°C.

6.2 Construção do vírus recombinante YFV-Gluc

A partir do YFV, que expressa o gene repórter *yellow fluorescent protein (YFP)* (YFV-YFP-DENV1linker #3), desenvolvido previamente em nosso laboratório, foi construído o vírus recombinante de FA, expressando o gene repórter da *Gaussia* luciferase (GLuc).

A técnica de recombinação homóloga em levedura foi utilizada para manipulação do plasmídeo pBSC-YFV-YFP-DENV1linker #3, que contém o vírus recombinante expressando YFP. O sítio de restrição para a enzima *NarI* foi utilizado para digestão e liberação do fragmento do gene repórter YFP. Portanto, o plasmídeo foi digerido com a enzima *NarI*, e posteriormente ligado por recombinação homóloga em levedura por um fragmento amplificado por PCR. Esse fragmento de PCR correspondente ao gene repórter da GLuc tem, em suas extremidades, sequências homólogas ao vetor (figura 10).

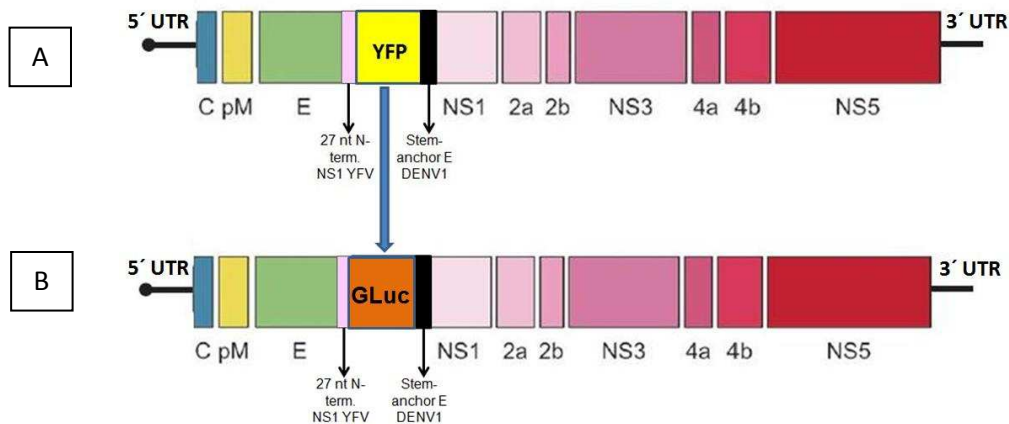
6.2.1 Preparação do vetor

O plasmídeo pBSC-YFV-YFP-DENV1linker #3 foi digerido com a enzima *NarI* (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts) por seis horas a 37°C, seguido de desfosforilação com 5U da enzima *Antarctic Phosphatase* (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts) durante 30 minutos a 37°C.

6.2.2 Reação de PCR para recombinação

A construção do vírus YFV-GLuc foi realizada por recombinação homóloga em levedura com um produto de PCR contendo extremidades homólogas ao vetor pBSC-YFV-YFP-DENV1linker linearizado pela enzima *NarI* (NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich - Massachusetts). Este fragmento (619 pb) foi amplificado com os *primers* YFV-GLuc-F e YFV-GLuc-R, e contém a sequência do gene do repórter. Os *primers* utilizados nas reações de PCR são apresentados no Quadro 1.

Figura 10 – Representação esquemática da construção do vírus YFV-GLuc



Fonte: Elaborada pela autora

Nota: em A, o vírus previamente construído em nosso laboratório YFV-YFP-DENV1Linker; em B o vírus recombinante expressando *Gaussia* luciferase.

Quadro 1. Oligonucleotídeos utilizados na construção do vírus recombinante.

Nome do Primer	Sequência
YFV-GLuc-F	<u>GACCAGGGCTGTGCAATTAATTCGGGGGCGCCATGGGA</u> GTCAAAGTTCTGTTTG
YFV-GLuc-R	<u>CTCGGGCGGTTGCTTCGAACATTTTGGCGCCGTCACCACC</u> GGCCCCCTTG

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: As sequências homólogas para recombinação em levedura estão sublinhadas. Em negrito, são os sítios específicos para a enzima NarI.

Para 20 μ L da reação de PCR foram utilizados: 1x do tampão de PCR (10xPCR buffer, 5mM de cada dNTP, 25 mM $MgCl_2$), 2,5U de Taq Platinum (INVITROGEN, Carlsbad, CA, EUA), 15 pmol de primers específicos e 50 ng do DNA molde. As condições de ciclagem foram: cinco minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguidos de 32 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 95°C, 30 segundos de anelamento a 56°C, um minuto de extensão para cada 1000 pares de bases a 68°C; e 20 minutos finais de extensão a 68°C. O produto de PCR foi visualizado em gel de agarose a 1% com brometo de etídio, e a banda específica do amplicon foi posteriormente excisada do gel e purificada com a utilização do kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, Hilden, Germany) segundo instruções do fabricante.

6.2.3 Transformação em levedura

O fragmento de PCR e vetor digerido foram introduzidos em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem RFY-206, pela transformação com acetato de lítio (LiOAc) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Uma colônia da linhagem da levedura foi amplificada em 20 mL de meio YPD (*Yeast Peptone Dextrose* – 20 g peptona, 10 g extrato de levedura, 20 g glucose, H₂O q.s.p 1 L), a 30°C por 12-16 horas. No dia seguinte, foi preparado um inóculo em uma densidade ótica (DO) de 0,1, e posteriormente incubado a 30°C, até alcançar uma DO de 0,55. Em seguida, as leveduras foram concentradas por centrifugação, lavadas e transformadas com acetato de lítio (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Após a transformação, as leveduras foram plaqueadas em placas de YNB (*Yeast Nitrogen Base* – 6,7 g *Yeast nitrogen base w/o amino acids, w/ ammonium sulfate* – SIGMAALDRICH, St Louis, MO, EUA - 20g glucose, 1:10 V/V solução de aminoácidos 10X – *Yeast synthetic drop-out medium without tryptophan* – SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, EUA) sólido na ausência do aminoácido triptofano [-trp] e mantidas a 30°C por três dias.

6.2.4 Extração de DNA plasmidial de levedura e confirmação dos clones

As colônias positivas foram selecionadas e ampliadas em 20 mL de meio YNB[-trp] líquido, por 16 horas à 30°C sob agitação constante de 130 rpm. Após o período de incubação, as células foram concentradas por centrifugação e lavadas uma vez com ddH₂O. O pellet foi ressuspenso em tampão SCE (1M Sorbitol, 100mM NaAc e 60mM EDTA) e em seguida foi adicionado 50 µL de zimolase (200mg/mL) e 30 µL β-mercaptoetanol e então, as células foram incubadas por uma hora a 37°C.

Posteriormente, as células foram concentradas por centrifugação e foi realizada a extração plasmidial, utilizando o kit comercial *Plasmid Midi Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany), seguindo recomendações do fabricante. A construção foi confirmada por PCR com par de *primers* específico para amplificar um produto contendo parte do vetor e dos produtos recombinados.

6.3 Recuperação da partícula viral recombinante.

Para a recuperação do vírus construído, RNA sintetizados *in vitro* de cada clone da construção foram introduzidos em células eucarióticas por eletroporação. A replicação viral e a expressão das proteínas virais foram avaliadas por imunofluorescência e expressão do gene repórter.

6.3.1 Amplificação do genoma completo do vírus recombinante por PCR e transcrição *in vitro*

A amplificação completa do genoma do vírus construído de aproximadamente 11,7 kb, foi realizada em uma reação de 50 µL utilizando a enzima KlenTaq-LA polimerase (CLONTECH, Mountain View, CA). A reação foi composta de: 100 ng de DNA plasmideal de levedura, 1X do tampão KlenTaq-LA (CLONTECH, Mountain View, CA), 1,3% Dimetil-sulfóxido (DMSO – *Dimethyl sulfoxide*, SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, EUA), 0,4 M betaína (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, EUA), 200 µM de cada dNTP, 1U KlenTaq-LA *polymerase* e 20 pmol de *primers* específicos. As condições de amplificação foram: quatro minutos a 95°C para desnaturação inicial, seguido de 32 ciclos de um minuto de desnaturação a 93°C, um minuto de anelamento a 56°C, 13 minutos de extensão a 72°C com acréscimos de dez segundos a cada ciclo e 20 minutos finais de extensão a 72°C.

O produto de PCR, contendo a sequência completa do vírus recombinante, foi utilizado para transcrição *in vitro*. Para garantir uma ótima qualidade do DNA, foi realizada a purificação com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol. Os produtos de PCR, que têm na região 5' terminal a sequência para o promotor bacteriófago T7, foram transcritos *in vitro* utilizando-se o kit T7 MEGAscript (AMBION, Foster City, CA, USA), com a adição do análogo 7-metil-guanina (cap), seguindo as recomendações do fabricante.

6.3.2 Transfecção do RNA viral em células BHK21 por eletroporação

Para a eletroporação de células BHK21 foram utilizados: 10 µg do RNA transcrito *in vitro* e 2 x 10⁶ células BHK21 em 100 µl de cytomix (ANSARI et al., 2004). A eletroporação foi realizada em cuvetas de 2 mm, seguindo as seguintes condições: 1200V, 99 mili segundos, dois pulsos, um segundo de intervalo entre os pulsos (eletroporador ECM-830, BTX). Após a

eletroporação, as células foram mantidas em repouso à temperatura ambiente por aproximadamente cinco minutos, antes de serem ressuspensas em meio MEM completo e distribuídas em frascos de cultura de 25 cm².

6.3.3 Imunofluorescência indireta

As células eletroporadas com o RNA do vírus foram acompanhadas nos dias um a quatro após eletroporação, através da técnica de imunofluorescência indireta. Foram utilizados anticorpos policlonais específicos para flavivírus produzidos em camundongos (fluido ascítico hiperimune anti-flavivírus grupo B - Instituto Evando Chagas, Belém; diluição 1:100 em PBS pH 7,2) e anticorpos secundários anti-camundongo IgG conjugados com isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate* – FiTC) (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, EUA; diluição 1:100 em PBS pH 7,2). A microscopia imunofluorescência foi realizada utilizando-se o microscópio Leica DMI 4000B.

6.3.4 Mensuração da atividade da enzima Luciferase

A expressão do gene repórter GLuc foi mensurada nas células transfectadas com o RNA viral. O sobrenadante de células foi coletado e a avaliação da expressão do gene repórter foi mensurada com o kit comercial *BioLux® Gaussia Luciferase Assay Kit* (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts), conforme as recomendações do fabricante e para leitura da luminescência utilizou-se o luminômetro *Mithras LB 940* (Berthold).

6.4 Caracterização fenotípica dos vírus recombinantes em cultivo celular

6.4.1 Infecção viral

Células BHK-21 foram infectadas com cada vírus recuperado à partir de cada clone do vírus recombinante a uma MOI (Multiplicity Of Infection) de 1-3, em meio MEM contendo 5% de soro fetal bovino, até a sexta passagem. Após um período de adsorção de 1 hora, o inóculo foi removido e substituído com meio fresco. Após o aparecimento de efeito citopático os vírus foram coletados, aliquotados e congelados a -80°C.

6.4.2. Ensaio de placa.

Células BHK-21 semeadas em placas de 6 poços 24 horas antes do ensaio, foram infectadas com diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-5}) de cada vírus em teste. O YFV-17D, crescido em células BHK-21, foi usado como controle positivo. Após 1 hora de adsorção a 37°C , o inoculam foi removido, e as células foram cobertas com meio MEM contendo 1% de agarose e 2% de soro fetal bovino. As células foram incubadas a 37°C , durante sete dias. Após o período de incubação, as placas foram reveladas através da coloração com MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*), a uma solução de 5mg/mL de MTT em PBS.

6.5 Caracterização genotípica do vírus recombinante YFV-GLuc

6.5.1 Extração de RNA viral e sequenciamento

O RNA total de células infectadas com os vírus recuperados foi extraído através da utilização do kit RNAeasy (QIAGEN, Hilden, Germany), seguido de uma reação de RT-PCR utilizando-se o kit one-step RT-PCR (QIAGEN).

Os cDNAs produzidos foram então purificados através do kit QIAquick PCR purification (QIAGEN). As reações de sequenciamento foram realizadas através da utilização do kit ABI BigDye terminator cycle sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA), e posteriormente os produtos desta reação foram resolvidos em um sequenciador ABI 3100 Genética Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). As análises das sequências de DNA foram feitas através do programa SeqMan (DNAStar Inc.).

7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

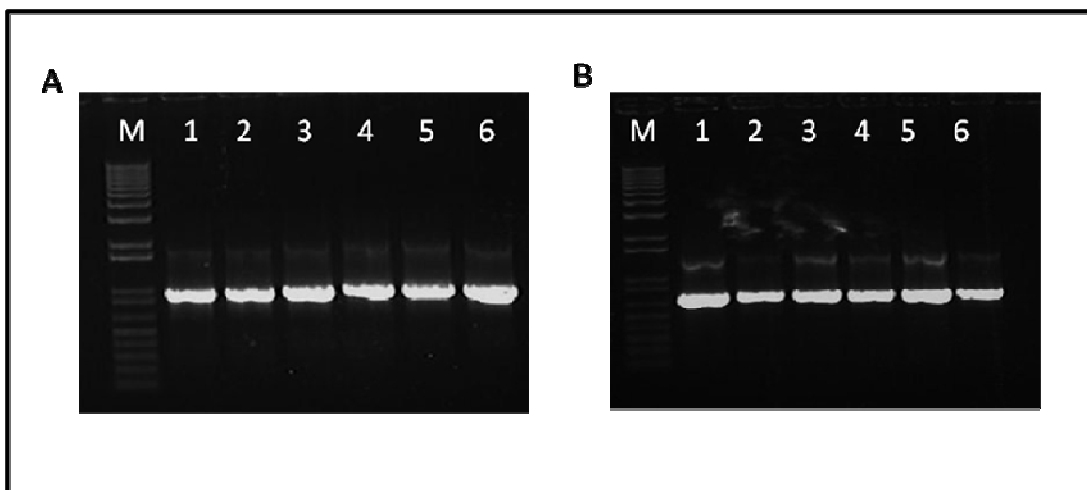
O presente estudo não possui implicações éticas porque não envolve pesquisas em seres humanos ou animais.

8 RESULTADOS

8.1 Construção e confirmação da construção YFV-GLuc

Seis clones de *S. cerevisiae* RFY206 YFV-GLuc foram testados após a recombinação homóloga e, confirmados como recombinantes pela amplificação de produtos de PCR com o padrão esperado. Após a extração do DNA plasmideal de levedura foram realizados dois PCRs por clone (figura 11), que confirmaram a inclusão do inserto (Gluc) (figura 12).

Figura 11 - Confirmação da construção do vírus YFV-GLuc por recombinação homóloga em levedura.

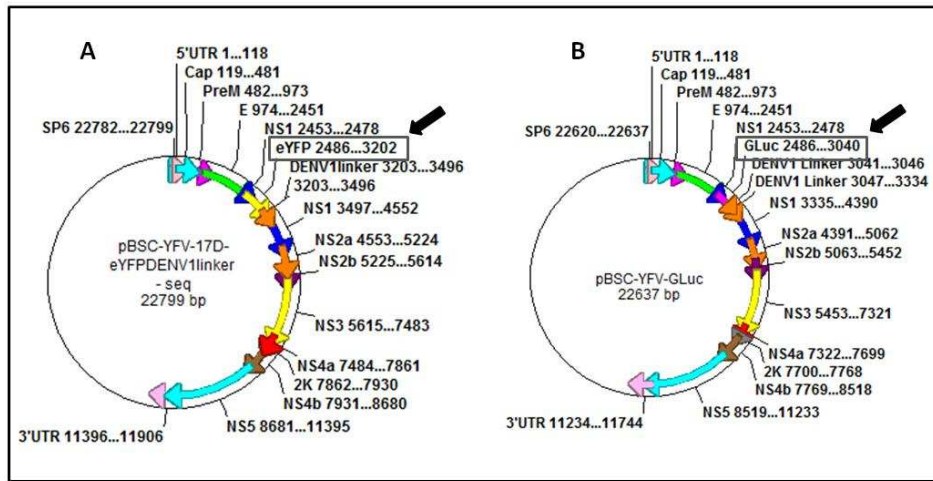


Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR. Os números indicam os clones de YFV-GLuc (1 ao 6). Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder. A – Produtos de PCR de aproximadamente 900 pb; B - Produtos de PCR de aproximadamente 600 pb.

A escolha dos dois pares de primers (1: YFV-GLuc-F e YFV-NS1-2502-R/ 2: YFV-2375-F e YFV-GLuc) (quadro 2) para amplificar os produtos de PCR contendo a sequência do inserto (GLuc), e do vírus assegurou uma maior confiabilidade na confirmação da recombinação homóloga e, assim, da construção, como esquematizado na figura 13.

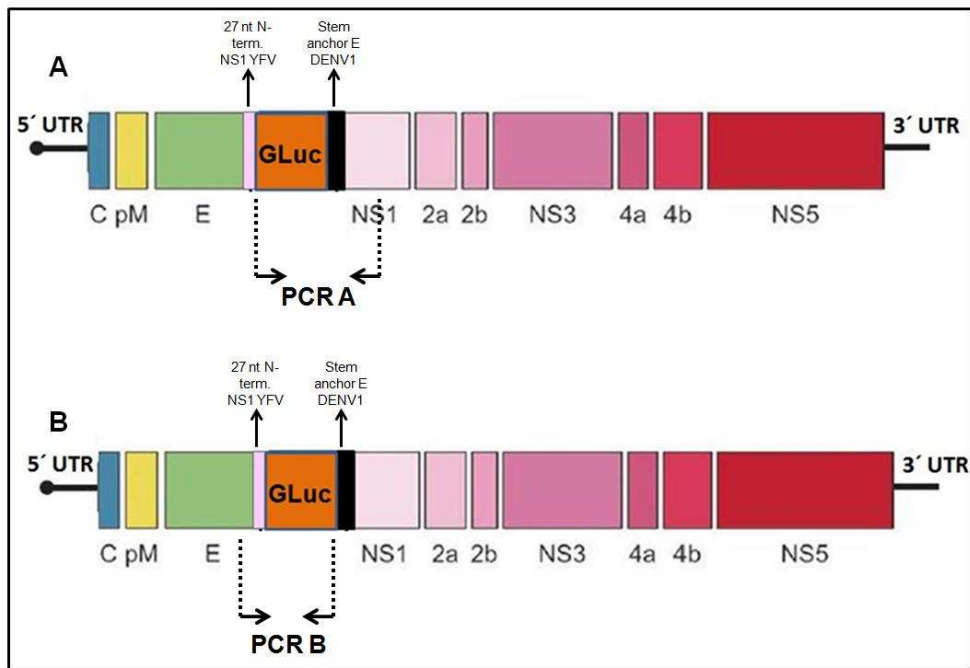
Figura 12 – Mapa dos plasmídeos



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: na imagem A – mapa do plasmídeo pBSC-YFV-17D-YFP-Denv1Linker. A seta destaca o fragmento do repórter YFP que foi liberado para a construção do novo vírus. Na imagem B – plasmídeo pBSC-YFV-GLuc-Denv1Linker que foi construído; a seta ressalta o fragmento GLuc inserido.

Figura 13 – Representação esquemática da organização genômica do vírus YFV-GLuc e localização dos primers utilizados para a confirmação da construção



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: A – Representação da localização dos primers para amplificação do produto do PCR A, de aproximadamente 900 pb. B – Representação da localização dos primers para amplificação do produto do PCR B, de aproximadamente 600 pb.

Quadro 2. Oligonucleotídeos utilizados na confirmação da construção do vírus recombinante.

Nome do <i>Primer</i>	Sequência
YFV-GLuc-F ^a	GACCAGGGCTGTGCAATTAATTTTCGGGGGCGCCATGGGAG TCAAAGTTCTGTTG
YFV-NS1-2502-R ^a	TCTCCGCACTTGAGCTCTC
YFV-2375-F ^b	ACAAGAAACATGACAATGTCC
YFV-GLuc-R ^b	CTCGGGCGGTTGCTTCGAACATTTTGGCGCCGTCACCACCG GCCCCCTTG

Fonte: Elaborada pela autora

Nota: ^a: oligonucleotídeos utilizados na PCR A; ^b: oligonucleotídeos utilizados na PCR B.

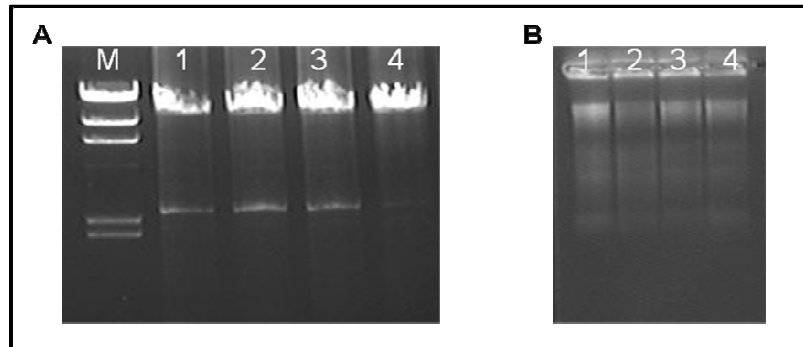
8.2 Recuperação da partícula viral e caracterização fenotípica in vitro do vírus recombinante

8.2.1 Recuperação da partícula viral

Uma vez confirmada a construção do vírus recombinante, quatro clones recombinantes (1, 2, 3 e 4) foram selecionados aleatoriamente para a transfecção celular e recuperação da partícula viral. Para isso, foi realizada a amplificação do genoma completo destes clones por PCR (Figura 14 A), seguida por transcrição *in vitro* (figura 14 B) e eletroporação de células BHK-21, como descrito anteriormente na seção de Materiais e Métodos.

Dos quatro clones, cujos RNA sintetizados *in vitro* foram usados para transfecção de células BHK-21, apenas os dois clones (#3 e #4) geraram partículas infecciosas, sendo observado o efeito citopático em células transfectadas (dados não mostrados) e aumento da bioluminescência de GLuc, como mostrado na figura 15.

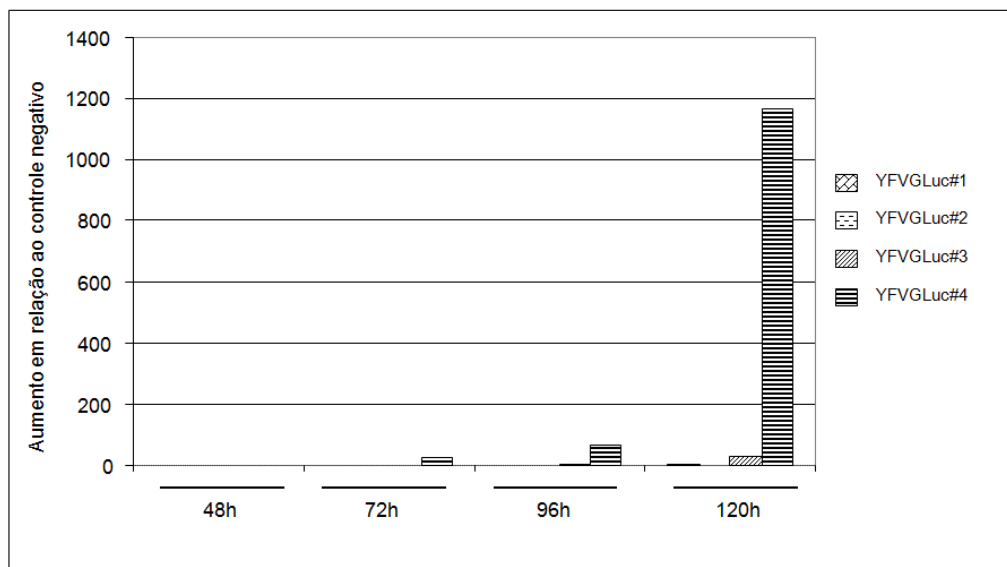
Figura 14 – Amplificação completa do genoma e produção de RNA sintetizados *in vitro*



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: A – Amplificação do genoma completo dos quatro clones. M indica marcador de peso molecular Lambda DNA – hind III; e os números indicam os clones 1, 2, 3, 4. B – RNA transcritos *in vitro* dos vírus YFV-GLuc; os números indicam os clones.

Figura 15 – Mensuração da atividade de *Gaussia* Luciferase dos quatro clones.



Fonte: Elaborada pela autora.

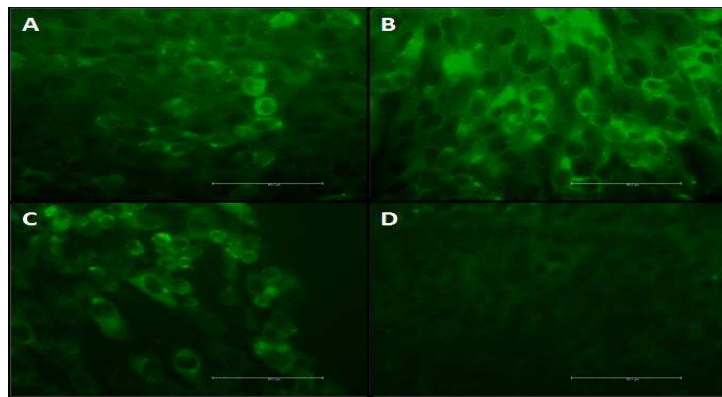
Nota: avaliação da expressão do gene repórter da *Gaussia* Luciferase dos vírus recombinantes YFV-Gluc clone 1, 2, 3 e 4, em relação ao controle negativo (células BHK-21 não infectadas), mensurada uma vez em 48, 72, 96 e 120 horas pós infecção.

8.2.2 Infecção viral

Após o aparecimento de efeito citopático dos #3 e #4 nas células BHK-21 transfectadas, o sobrenadante clarificado da cultura foi utilizado como inoculo para infectar novas células. Após três sucessivas passagens desses vírus, foi realizado o ensaio de

imunofluorescência indireta (IFA) para observação da capacidade de infecção desses vírus (figura 16), sendo observado fluorescência positiva nos clones 3 e 4, e no controle positivo (YFV-17D).

Figura 16 - Imunofluorescência indireta (IFI) em células BHK21 infectadas pelo vírus YFV-Gluc clones 3 e 4, na terceira passagem



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Ensaio de imunofluorescência indireta realizada com os anticorpos primários de fluido ascítico hiperimune anti-*Flavivirus* grupo B e anticorpos secundários anti-camundongo IgG conjugados com FITC. A – YFV-Gluc #3; B- YFV-Gluc #4; C – Controle positivo (vírus YFV-17D); D – Controle negativo (células BHK-21).

8.2.3 Ensaio de placa

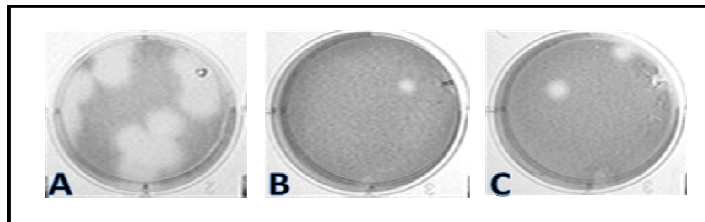
A avaliação da morfologia das placas formadas pelo efeito citopático dos clones 3 e 4 dos vírus recombinantes repórteres em relação ao vírus vacinal (YFV-17D), mostrou semelhança no formato das placas, no entanto, o tamanho das placas formadas pelos vírus recombinantes, foi menor que o vacinal, como esperado. (Figura 17). O YFV-17D apresentou tamanho de 9 mm, já os clones 3 e 4 apresentaram 5 e 6 mm, respectivamente.

8.2.4 Mensuração da atividade de *Gaussia* Luciferase

Durante a terceira passagem do vírus em células, foi mensurada a expressão do gene repórter *Gaussia* luciferase, e comparada ao controle negativo (células não-infectadas), como observado na figura 18. Após 48 horas de infecção os clones 3 e 4 demonstraram um aumento de 493,5 e 882,2 vezes da bioluminescência em relação ao controle negativo, respectivamente. Em 72 horas, o clone 4 apresentou níveis bastante elevados de expressão,

que diminuíram após 96 horas pós-infecção, provavelmente devido à morte das células infectadas. Já o clone 3, apresentou maior expressão após 96 horas de infecção, que pode ser decorrente de um título viral menor que o clone 4.

Figura 17 – Caracterização fenotípica dos vírus recombinantes por ensaio de placa.

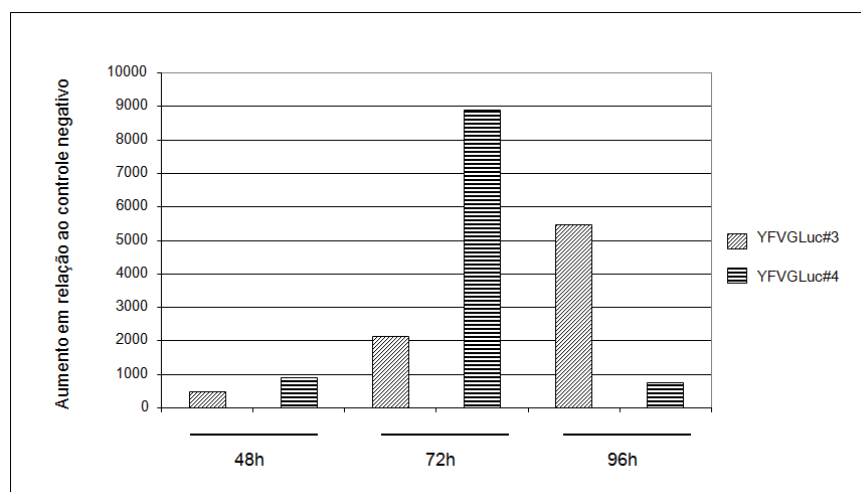


Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: A) Ensaio de placa do YFV-17D (controle positivo) à diluição de 10^5 , medindo aproximadamente 9mm; B) Ensaio de placa do YFV-Gluc #3 à diluição de 10^4 , medindo aproximadamente 5mm; C) Ensaio de placa do YFV-Gluc #4 à diluição de 10^4 , medindo aproximadamente 6mm.

Na sexta passagem, a expressão do repórter foi mensurada com o objetivo de avaliar se o repórter continuava sendo expresso nessa passagem, após 72 horas de infecção. Para os dois clones, o repórter continuava sendo expresso na sexta passagem (Figura 19).

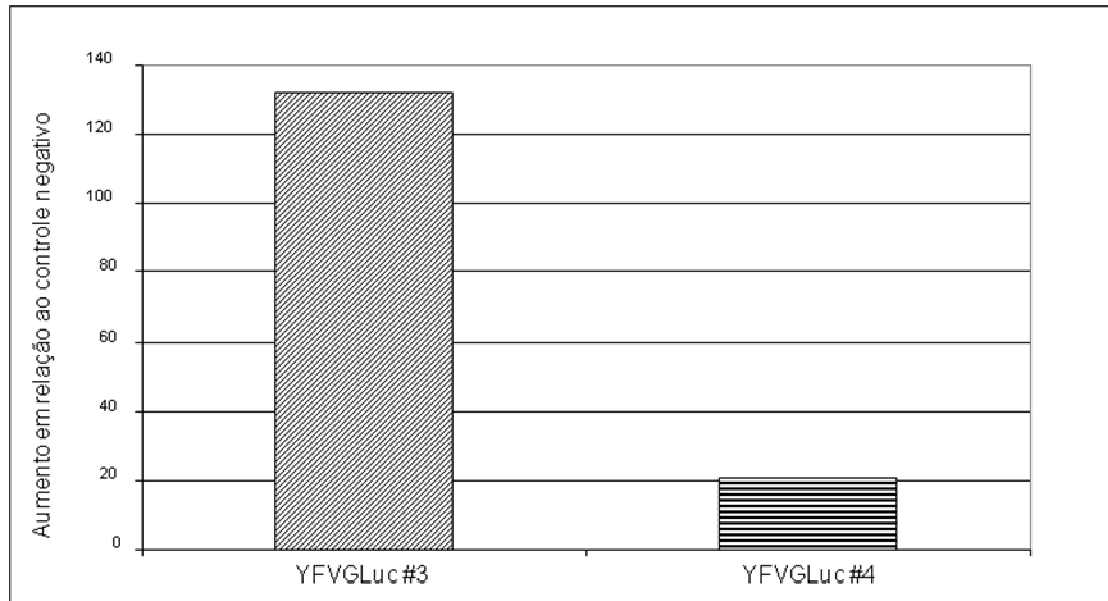
Figura 18 – Mensuração da atividade de *Gaussia* Luciferase dos vírus recombinantes na passagem três.



Fonte: Elaborada pela autora

Nota: avaliação da expressão do gene repórter da *Gaussia* Luciferase do vírus recombinantes YFV-Gluc clone 3 e 4, em relação ao controle negativo (células BHK-21 não infectadas), mensurada uma vez em 48, 72 e 96 horas pós infecção.

Figura 19 – Mensuração da atividade de *Gaussia* Luciferase dos vírus recombinantes na sexta passagem, após 72 horas de infecção.



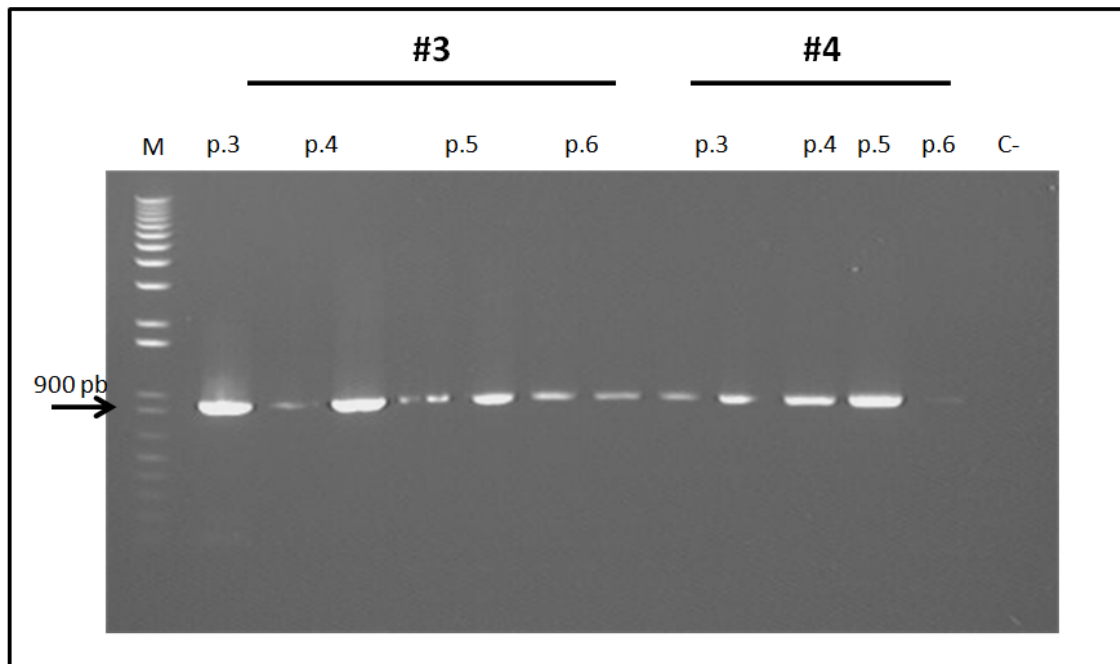
Fonte: Elaborada pela autora

Nota: avaliação da expressão do gene repórter da *Gaussia* Luciferase do vírus recombinantes YFV-Gluc clone 3 e 4, na sexta passagem, após 72 horas de infecção. Dados apresentados em relação à média dos valores de duas leituras em relação ao controle negativo (células BHK-21 não infectadas).

8.3 Caracterização genotípica do vírus recombinante YFV-GLuc

Para analisar a estabilidade dos vírus recombinantes construídos, pela manutenção do gene repórter GLuc, foi realizada RT-PCR dos clones 3 e 4 da terceira, quarta, quinta e sexta passagem, utilizando o par de primers YFV-GLuc-F e YFV-NS1-2502-R, previamente utilizado na confirmação da construção, o qual amplifica um fragmento de 900 pb. Como demonstrado na imagem 20, os clones 3 e 4 mantiveram inserido em seu genoma o gene repórter até a passagem seis.

Figura 20 – RT-PCR dos clones 3 e 4, durante a terceira, quarta, quinta e sexta passagem



Fonte: Elaborada pela autora

Nota: eletroforese em gel de agarose a 1%. Os clones 3 e 4 apresentaram amplicons do tamanho esperado de aproximadamente 900p b (seta)

9 DISCUSSÃO

A genética reversa viral é uma ferramenta poderosa para estudo de replicação viral em vírus RNA polaridade positiva, como os flavivírus. O uso desse sistema tem facilitado o entendimento da biologia molecular dos flavivírus, como de replicação e patogênese e também o desenvolvimento de vacinas atenuadas e antivirais (PU et al., 2011). Por isso, nos apropriamos desta técnica para a manipulação genética do vírus da febre amarela.

Neste trabalho foi descrita a construção de caracterização de um vírus recombinante repórter de FA (YFV-Gluc), baseada na estratégia proposta por Bonaldo et al. (2007). Através deste método, fomos capazes de expressar uma proteína repórter bioluminescente, inserindo-a na região entre os genes das proteínas E e NS1.

A principal dificuldade na manipulação do genoma de flavivírus é a instabilidade gerada pela clonagem em sistemas procariotos, os quais podem resultar em muitas mutações indesejáveis (POLO et al., 1997). Apesar disso, muitas construções de vírus repórteres são realizadas utilizando a técnica de digestão e ligação *in vitro* para a clonagem, como as descritas para DENV2 (ZOU et al., 2011), WNV (DEAS et al., 2005) e YFV-GFP (BONALDO et al., 2007), YFV-LASV (BREDENBEEK et al., 2006). Para evitar uma possível instabilidade do genoma, utilizamos na construção do YFV-Gluc a técnica de recombinação homóloga em levedura, que consiste na clonagem de fragmentos de DNA lineares que contém sequências homólogas em suas extremidades, em sistema de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem RFY-206. Através da recombinação homóloga conseguimos substituir o gene repórter YFP pelo da GLuc. Essa construção foi confirmada através de duas PCRs que amplificaram fragmentos para confirmar o inserto (figura 10). A escolha de oligonucleotídeos foi importante para aumentar a confiança na confirmação da construção, e observação da inclusão do inserto.

As principais vantagens da técnica de recombinação homóloga em relação à técnica de digestão e ligação *in vitro* é que a primeira permite recombinar múltiplos fragmentos de DNA sem a necessidade de múltiplas reações de amplificação e ligação, diminuindo assim o tempo gasto nessas reações. A recombinação não dependente de sítios de restrição e ligação, como sítios específicos para determinadas enzimas; além disso, é um método robusto, eficiente e simples de se executar e, apesar de necessitar tempo mais longo devido à baixa taxa de

crescimento da levedura, o tempo requerido para a manipulação é mínimo (SHANKS et al., 2009). Estas vantagens já foram reconhecidas por outros autores, que se apropriaram da técnica de recombinação homóloga em levedura para construir clones infecciosos com sucesso (GIBSON, 2009; POLO et al., 1997; QUEIROZ, 2011; SANTOS, 2010).

A inserção de genes repórteres tem contribuído para os avanços nas diversas áreas da biotecnologia (TANNOUS et al., 2005), já que estes repórteres são genes com fenótipos facilmente mensuráveis e geralmente são selecionados com base na sensibilidade, a dinâmica e confiança do ensaio (ALAM; COOK, 1990).

A introdução de um gene repórter é um passo importante para o desenvolvimento de vetores para terapia gênica, porque esses genes podem ser substituídos por outros genes de interesse, na triagem de drogas e também para relatar atividades de replicação viral em curto período de tempo (TANNOUS et al., 2005). Um gene repórter ideal não deve ser endogenamente expresso na célula de interesse, deve ser passível de ensaios sensíveis, quantitativos, rápidos, fáceis, reprodutíveis e seguros. Portanto, esses repórteres têm sido largamente empregados em construções de clones infecciosos (BONALDO et al., 2007; QUEIROZ, 2011; YUN et al, 2003; ZOU et al, 2011) e replicons (ALCARAZ-ESTRADA et al., 2010; JONES; PATKAR; KUHN, 2005; MOSIMANN et al., 2010; NG et al., 2007; OLIVEIRA, 2011), com o objetivo de facilitar a compreensão de virais e desenvolvimento de tecnologias para prevenção e tratamento de diversas doenças.

A escolha da GLuc para a construção deste vírus recombinante se deve às vantagens que ela tem em relação às outras luciferases, como a *Renilla* utilizada na construção dos clones infecciosos de DENV2 (ZOU et al., 2011) e de WNV (DEAS et al., 2005), e no replicon de DENV4 (ALCARAZ-ESTRADA et al., 2010), bem como a *Firefly* luciferase, utilizada na construções de replicon do YFV (OLIVEIRA, 2011). As principais vantagens são: é a menor luciferase conhecida, melhorando assim, a estabilidade dos vírus construídos; (TANNOUS et al., 2005), é uma proteína naturalmente secretada e assim, sua detecção é feita por um simples ensaio com o sobrenadante de cultivo celular, sem a necessidade de lise celular, além disso, apresenta a maior sensibilidade dentre as luciferases, chegando a ser 1000 vezes mais sensível (TANNOUS, 2009). Em comparação às proteínas repórteres fluorescentes utilizadas nas construções de clones infecciosos, como YFP (QUEIROZ, 2011) e GFP (BONALDO et al.,2007), as proteínas bioluminescentes como as luciferases são preferidas

porque apresentam elevada sensibilidade, a análise pode ser feita rapidamente e a quantificação é exata (PROMEGA, 2011), diferindo da subjetividade apresentada nas leituras das proteínas fluorescentes.

A estratégia proposta por Bonaldo et al. (2007) utilizada neste trabalho, considera a presença de regiões funcionais entre os genes das proteínas E e NS1, para o correto processamento da poliproteína precursora, além da conservação de aa que flanqueiam essa região intergênia. Essa estratégia tem como objetivo o processamento adequado, tanto nas proteínas virais, quanto nas proteínas heterólogas, resultando em uma melhor viabilidade na recuperação de partículas recombinantes infecciosas, mesmo após a inserção de sequências exógenas. Por isso, foi construído o vírus recombinante de FA expressando o gene repórter da GLuc (YFV-GLuc), a partir do vírus recombinante anteriormente desenvolvido em nosso laboratório que também foi construído a partir da técnica proposta pelo autor.

Durante a terceira passagem do vírus em cultivo celular foi feita IFA, ensaio de placa e sequenciamento. No sequenciamento, o inserto estava presente nesta passagem, indicando que ambos os clones mantinham o gene repórter. Na IFA, os clones 3 e 4 apresentaram fluorescência positiva, quando comparada à fluorescência do YFV-17D, mostrando que o vírus repórter permanecia estável e que continuava infectando novas células, ou seja, que a inserção não prejudicou a infecção viral.

Na estratégia proposta por Bonaldo et al. (2007), que também foi utilizada por Queiroz (2011), a inserção de genes heterólogos na ORF do vírus, possibilitou a geração de vírus estáveis até longas passagens, o que não pode ser observado nas construções do WNV (DEAS et al., 2005) e do JEV (YUN et al., 2003), que utilizavam como sequência sinal para tradução do repórter o IRES (Internal Ribosomal Entry Site, sítio interno de entrada ribossomal), que foi clonado 3'UTR do genoma viral, os quais os vírus repórteres não foram estáveis e os genes repórteres foram deletados após uma ou duas passagens em cultivo celular (DEAS et al., 2005). Já na estratégia proposta por Zou et al. (2011), o gene repórter da *Renilla* luciferase foi inserido na ORF viral, e o vírus foi estável até a quinta passagem.

Ainda em relação à caracterização fenotípica, foi realizado ensaio de placa na terceira passagem do vírus em células BHK-21. As placas dos vírus recombinantes se apresentaram menores que o vírus parental (figura 17), indicando uma atenuação em relação ao vírus YFV-

17D utilizado como controle, possivelmente devido à inserção do gene heterólogo (QUEIROZ, 2011; ZOU et al., 2011).

A caracterização através da mensuração da atividade luciferase foi realizada na terceira (figura 18) e na sexta passagem (figura 19). Além da mensuração da GLuc, foi realizada RT-PCR das passagens três, quatro, cinco e seis (figura 20). Os resultados obtidos na mensuração da bioluminescência da GLuc, e a amplificação de todos os fragmentos no tamanho esperado, mostram que os dois clones continuam com os genes repórteres inseridos em seu genoma até a sexta passagem, e que este continua sendo expresso na sexta passagem. Isso demonstra que o vírus permanece viável e estável até a passagem viral analisada.

Segundo Franco et al. (2010), a estabilidade do VFA recombinante avaliada *in vitro* pode ser correlacionada à estabilidade *in vivo*. Para fins vacinais, a avaliação da infecção dos vírus construídos até a décima passagem em cultivo celular, aparentemente é suficiente para assegurar a estabilidade genética de construções recombinantes do YFV e segurança destes construídos para utilização como vetores virais (GUY et al., 2010). No vírus construído por Bonaldo et al. (2007) que apresentava o repórter GFP, a estabilidade permaneceu até décima passagem, e o vírus YFV-YFP-DENV1Linker, construído por Queiroz (2011), o vírus permaneceu estável até a 15^o passagem. Já na construção de um vírus DENV2 utilizado para triagem de antivirais, a estabilidade foi avaliada até a quinta passagem e o vírus permaneceu estável e com repórter inserido até a passagem analisada (ZOU et al., 2011).

Concernente à aplicabilidade do trabalho desenvolvido, esta construção deverá ser útil para estudos de biologia viral, triagem de drogas antivirais e de estudos de competência vetorial *in vivo*. Para triagem de drogas antivirais, existem alguns ensaios descritos, como os tradicionais que se baseiam na capacidade de inibição da replicação viral, podendo ser observado na inibição do efeito citopático em cultivo celular quantificado por ensaios de placas, ou pela avaliação da replicação por RT-PCR (NOBLE et al., 2010); construção de partículas semelhantes a vírus (VLP, *virus like particle*) (QING et al., 2010), e replicons (NG et al., 2007).

Em estudos com replicon, células são transfectadas com RNA subgenômico, ausente das proteínas estruturais. Em estudos com VLPs, as células são co-transfectadas com replicons (com as proteínas estruturais deletadas), e um vetor de expressão de proteínas

estruturais. As principais desvantagens dos estudos tradicionais que são demorados, laboriosos, e não quantificam a replicação de forma direta (NOBLE et al., 2010). Em relação ao replicon, a técnica é limitada para triagem de antivirais que inibem a replicação do vírus, porque como as proteínas estruturais são deletadas, o vírus não forma partícula infecciosa, atrapalhando a triagem de compostos que inibem a entrada, montagem e liberação viral (NOBLE et al., 2010; ZOU et al., 2011). Já em relação aos VLPs, a técnica consegue identificar antivirais com atividade inibidora da entrada e replicação viral (ZOU et al., 2011).

Diante do exposto, a construção será importante para estudos de triagem de antivirais, porque como é um vírus sem deleção de nenhuma proteína, é capaz de identificar compostos com atividades de inibição de qualquer fase do ciclo de vida viral; para estudos de biologia viral, porque todo ciclo de viral pode ser analisado, e de estudos de competência vetorial, porque contém inserido em seu genoma um gene repórter facilmente mensurável, resistente, com alta sensibilidade, que será útil para a mensuração da replicação viral.

10 CONCLUSÃO

No presente estudo descrevemos a construção e caracterização do vírus recombinante YFV-GLuc, que expressa o gene repórter da GLuc, utilizando a técnica de recombinação homóloga em levedura. Esse sistema teve como base a substituição do repórter YFP de um vírus repórter previamente construído em nosso laboratório, pelo gene repórter de interesse.

Na estratégia utilizada, o gene GLuc foi inserido entre os genes das proteínas E e NS1 do genoma do YFV, gerando dois de vírus recombinantes (YFV-GLuc #3 e YFV-GLuc #4) que permaneceram estáveis até a sexta passagem em cultivo celular. Esses vírus recuperados foram capazes de formar efeito citopático em cultivo celular e, em ensaio de placa, os vírus construídos apresentaram morfologia semelhante ao parental, porém, suas placas apresentaram tamanhos menores, quando comparado ao vírus YFV-17D, mostrando uma possível atenuação em relação ao vírus parental, como esperado.

11 PERSPECTIVAS

Baseado nos resultados obtidos será importante avaliar a estabilidade desses vírus recombinantes até longas passagens em cultivo celular, e também caracterizá-los fenotipicamente por ensaio de placa nessas passagens mais altas. Posteriormente, determinar a curva de crescimento desses vírus, a qual irá fornecer importantes dados na caracterização destes vírus recuperados, e avaliação da possibilidade de utilizá-los como vetor viral para desenvolvimento de vacinas.

A construção destes vírus também será importante para estudos de desenvolvimento e triagem de drogas antivirais, e de competência vetorial.

REFERÊNCIAS

- ALAM, J.; COOK, J.L. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 188, n. 2, p. 245-254, 1990.
- ALCARAZ-ESTRADA, S. L. Construction of a dengue virus type 4 reporter replicon and analysis of temperature-sensitive mutations in non-structural proteins 3 and 5. **Journal of General Virology**, London, v. 91, p. 2713–2718, 2010.
- ANSARI, I. H. et al. Involvement of a bovine viral diarrhea virus NS5b locus in virion assembly. **Journal of Virology**, Washington, v.78, n.18, p.9612-9623, 2004.
- BARRETT, A. D. T. Molecular epidemiology of yellow fever virus. **Vaccine**, Guilford, v. 21, n. 3, p. 213-220, 2010.
- BONALDO, M. C. et al. Construction and characterization of recombinant flaviviruses bearing insertions between E and NS1 genes. **Journal of Virology**, Washington, v.4, p.115, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância de epizootias em primatas não-humanos**. Brasília, DF, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Febre amarela**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1552>. Acesso em: 23 maio 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8. ed. Brasília, DF, 2010.
- BREDENBEEK, P. J. et al. A recombinant yellow fever 17D vaccine expressing lassa virus glycoproteins. **Virology**, New York, v.345, n.2, p.299-304, 2006.
- CHAMBERS, T.J., et al. Flavivirus: genome organization, expression, and replication. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 44, p. 649-688, 1990.
- CHANG, G. J. Molecular biology of dengue viruses. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed.). **Dengue and Dengue and Hemorrhagic Fever**. New York: CAB International, 1997. p. 175-198.
- CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of Virology**, Washington, v. 80, n. 23, p. 11418-11431, 2006.
- _____. Febre Amarela. In: COURA, J. R. **Síntese das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 238-239.

DEAS, T. S.; et al. Inhibition of Flavivirus Infections by Antisense Oligomers Specifically Suppressing Viral Translation and RNA Replication. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 8, p. 4599-4609, 2005.

FRANCO, D. et al. Evaluation of yellow fever virus 17D strain as a new vector for HIV-1 vaccine development. **Vaccine**, Guildford, v.28, n.35, p.5676-5685, 2010.

GARDNER, C. L.; RYMAN, K. D. Yellow fever: A reemerging threat. **Clinics in Laboratory Medicine**, Philadelphia, v.30, n.1, p.237-260, 2010.

GIBSON, D. G. Synthesis of DNA fragment in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.37, n.20, p.6984-6990, 2009.

GONÇALVES, A. D. et al. Febre Amarela. **NewsLab**, São Paulo, v. 102, n. 162-170, 2010.

GUBLER, D. J.; KUNO, G.; MARKOFF, L. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M.; HPWLEY, P. M. (Ed.) **Fields Virology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2007. v. 1, p.1154-1252.

GUY, B. et al. Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese Encephalitis viruses. **Vaccine**, Guildford, v.28, n.3, p.632-649, 2010.

JONES, C. T.; PATKAR, C. G.; KUHN, R. J. Construction and applications of yellow fever virus replicons. **Virology**, New York, v.331, n.2, p.247-259, 2005.

LAI, C. J.; et al. Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, Washington, v. 88, p. 5139-5143, 1991.

LAURENT-ROLLE, M. et al. The NS5 protein of the virulent West Nile virus NY99 strain is a potent antagonist of type I interferon-mediated JAK-STAT signaling. **Journal of Virology**, Washington, v.84, n.7, p.3503-3515, 2010.

LEARDKAMOLKARN, V.; SIRIGULPANIT, W. Establishment of a stable cell line coexpressing dengue virus-2 and green fluorescent protein for screening of antiviral compounds. **Journal of Biomolecular Screening**, Thousand Oaks, n.17, v.3. p.283-292, 2012.

LI, D.; AASKOV, J.; LOTT, W.B. Identification of a cryptic prokaryotic Promoter within the cDNA encoding the 5' end of dengue virus RNA genome. **PLoS ONE**. San Francisco, v.6, n.3, 2011.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H. J.; RICE, C. M. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. In: KNIPE, D. M.; HPWLEY, P. M. (Ed.) **FIELDS' Virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1101-1152.

LINO, R. J. et al. Blocking of interferon-induced Jak-STAT signaling by Japanese Encephalitis virus NS5 through a protein tyrosine phosphatase-mediated mechanism. **Journal of Virology**, Washington, v.80, n.12, p.5908-5918, 2006.

MESSER, W. B. et al. Development and characterization of a reverse genetic system for studying dengue virus serotype 3 strain variation and neutralization. **Plos Negl. Tropical Disease**, v. 6, n.2, 2012.

MOSIMANN, A. L. et al. Construction and characterization of a stable subgenomic replicon system of a Brazilian dengue virus type 3 strain (BR DEN3 290-02). **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.163, n.1, p.147-152, 2010.

MONATH, T. P. et al. Clinical proof of principle for Chimerivax: recombinant live, attenuated vaccines against flavivirus infections. **Vaccine**, Guildford, v.20, n.7-8, p.1004-1018, 2002.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.3, n.1, p.13-22, 2005.
 NG, Y. C. *et al.* Construction and characterization of a stable subgenomic dengue virus type 2 replicon system for antiviral compound and siRNA testing. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 76, n. 3, p. 222-231, 2007.

OLDENBURG, K. R. et al. Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction *in vivo* in yeast. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, n.2, p.451-452, 1997.

OLIVEIRA, A. G. **Desenvolvimento e aplicação biotecnológica de replicon repórteres para a triagem de drogas antivirais contra o vírus da febre amarela**. 2011. Dissertação (Mestrado em Genética) – Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Yellow fever**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>>. Acesso em: 21 maio 2012.

PASTORINO, B. et al. Role of host factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 87, p.281-294, 2010.

PATKAR, C. G.; KUHN, R. J. Yellow Fever virus NS3 plays an essential role in virus assembly independent of its known enzymatic functions. **Journal of Virology**, Washington, v. 82, n. 7, p. 3342-3352, 2008.

POLO, S. et al. Infectious RNA transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast. **Journal of Virology**, Washington, v.71, n.7, p.5366-5374, 1997.

PROMEGA. **Protocols & Applications Guide: bioluminescent reporters**. [S.l.], 2011. Disponível em: <<http://www.promega.com.br/~media/files/resources/paguide/a4/chap8a4.pdf?la=pt-BR>>. Acesso em: 16 jan 2013.

PU, S. Y. et al. Successful propagation of flavivirus infectious cDNAs by a novel method to reduce the cryptic bacterial promoter activity of virus genomes. **Journal of virology**, v. 85, n. 6, p. 2927-2941, mar. 2011.

QUEIROZ, S. R. A. **Estratégias moleculares para utilização do vírus da febre amarela como vetor vacinal**. 2011. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

RICE, C. M. *et al.* Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. **The New Biologist**, Philadelphia, v. 1, n. 3, p.285-296, 1989.

RIDPATH, J. F., FLORES, E. F. *Flaviviridae*. In: FLORES, E.F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2007. p.565-590.

ROTHMAN, A. L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 113, n. 7, 2004.

RUGGLI, N.; RICE, C. M. Functional cDNA clones of the Flaviviridae: strategies and applications. **Advances in Virus Research**, New York, v. 53, p. 183-207, 1999.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. New York: Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, J. J. S. **Desenvolvimento de um sistema de genética reversa para o vírus dengue tipo 3, isolado em Recife**. 2010. Dissertação (Mestrado em Genética) – Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

SHANKS, R. M. Q. et al. New yeast recombineering tools for bacteria. **Plasmid**, v. 62, n. 2, p. 88-97, set 2009.

TANNOUS, B. A. Gaussia luciferase reporter assay for monitoring of biological processes in culture and in vivo. **Nat Protoc**, 4(4): 582–591, 2009.

TANNOUS, B. A. et al. Codon-Optimized Gaussia Luciferase cDNA for Mammalian Gene Expression in Culture and in Vivo. **Molecular Therapy**, v. 11, n. 3, 2005.

TIERNEY, M. B.; LAMOUR, K. H. An introduction to reverse genetic tools for investigating gene function. **The American Phytopathological Society**. [S.l.], 2005. Disponível em: <<https://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/Pages/ReverseGeneticTools.aspx>>. Acesso em: 23 maio 2012.

VASCONCELOS, P. F. Yellow fever. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.36, n.2, p.275-293, 2003.

YAMSHCHIKOV, V. *et al.* An infectious clone of the West Nile flavivirus. **Virology**, New York, v. 281, p. 294-304, 2001.

YUN, S. *et al.* Development and application of a reverse genetics system for Japanese encephalitis virus. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 77, n. 11, p. 6450-6465, 2003.

ZHAO, Z.*et al.* Characterization of the E-138 (Glu/Lys) mutation in Japanese encephalitis virus by using a stable, full-length, infectious cDNA clone. **Journal of General Virology**, London, v.86, p. 2209-2220, 2005.

ZOU, G.; *et al.* Development and characterization of a stable luciferase dengue virus for high-throughput screening. **Antiviral Research**, v. 91, p. 11-19, 2011.