

**MUDANÇAS ESTRUTURAIS DO VÍRUS DA FEBRE  
AMARELA (YFV) INDUZIDAS POR ALTA PRESSÃO  
HIDROSTÁTICA**

***Obtenção de Partículas Inativadas***



Orientação: Andréa Cheble de Oliveira  
Co-orientação: Jerson Lima Silva

*Tese submetida ao corpo docente do Instituto de Bioquímica Médica da  
Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências (Química Biológica)*

***Ygara da Silva Mendes***

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Bioquímica Médica  
Laboratório de Termodinâmica de Proteínas e Estruturas Virais  
Gregorio Weber

**Rio de Janeiro**

**\*2005\***

**“MUDANÇAS ESTRUTURAIS DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA (YFV)  
INDUZIDAS POR ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA:  
*Obtenção de Partículas Inativadas*”**

***YGARA DA SILVA MENDES***

Tese submetida ao Corpo Docente do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Júlio Alberto Mignaco

---

Prof. Robson de Queiroz Monteiro

---

Prof. Moacyr Alcoforado Rebello

---

Prof<sup>ª</sup>. Débora Foguel  
(revisora)

---

Prof. Luis Maurício Trambaioli da Rocha e Lima  
(suplente)

---

Prof<sup>ª</sup>. Andréa Cheble de Oliveira  
(orientadora)

---

Prof. Jerson Lima Silva  
(co-orientador)

## FICHA CATALOGRÁFICA

---

**MENDES, YGARA DA SILVA**

“Mudanças Estruturais do Vírus da Febre Amarela (YFV) Induzidas por Alta Pressão Hidrostática: *Obtenção de Partículas Inativadas*”. Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ, Rio de Janeiro, 2005.

xiv, 101 folhas

Tese: Mestrado em Ciências (Química Biológica)

1. Vírus da Febre Amarela
2. Pressão Hidrostática
3. Inativação
4. Vacina
5. Fluorescência

- I. Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ
  - II. Título
-

---

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Termodinâmica de Proteínas e Estruturas Virais Gregorio Weber**, Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, e em colaboração com o Laboratório de Tecnologia Viroológica, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos de Bio-Manguinhos, Fiocruz, sob orientação da Professora **Andréa Cheble de Oliveira** e co-orientação do Professor **Jerson Lima Silva**. Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (**FAPERJ**), Fundação Universitária José Bonifácio (**FUJB**).

---

*"Se eu pudesse deixar algum presente a você,  
deixaria aceso o sentimento de amor à vida dos seres humanos.  
A consciência de aprender tudo o que nos foi ensinado pelo tempo afora.  
Lembraria os erros que foram cometidos, como sinais  
para que não mais se repetissem.  
A capacidade de escolher novos rumos.  
Deixaria para você, se pudesse, o respeito aquilo que é indispensável:  
além do pão, o trabalho e a ação.  
E, quando tudo mais faltasse, para você eu deixaria, se pudesse, um segredo. O de buscar  
no interior de si mesmo a resposta para encontrar a saída." - Mahatma Ghandi*

*Aos meus pais, Vanda e Jamil*

*À minha irmã, Yramaia*

*Ao meu amor, Ivan*

*A todos os meus fiéis amigos*

## **Agradecimentos**

*A Deus, que sempre me diz quando é hora de voltar ao início e recomeçar...*

*"Quando alguém encontra seu caminho, precisa ter coragem suficiente para dar passos errados. As decepções, as derrotas, o desânimo são ferramentas que Deus utiliza para mostrar a estrada." - Brida*

*Aos meus pais, que desde sempre lutam pela minha felicidade e sustentam os meus sonhos.*

*"O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto." (Thomas Huxley)*

*À minha irmã, que depois de tanta torcida parece percorrer o caminho que tanto sonhou.*

*"Sonhos são como deuses. Se não se acredita nele, eles deixam de existir." Torço pela sua felicidade.*

*A você, que já faz parte de mim e me faz enxergar que o que importa não é o que eu tenho na vida, mas quem eu tenho na vida. Com você eu aprendi que duas pessoas podem olhar exatamente a mesma coisa e podem ver algo completamente diferente... Mas que isso não impede que sejamos felizes.*

*"Quando se ama, não é preciso entender o que acontece lá fora, porque tudo passa a acontecer dentro de nós." - O Alquimista*

*À minha querida amiga e orientadora Andréa, que mesmo tão longe se faz presente em todos os momentos. Que ensina seus alunos como se educasse um filho. Que inspira e tranqüiliza a todos como se fosse um anjo. E mesmo quando erra está apenas tentando acertar... Esta é Andréa Cheble...*

*"A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso carinhoso, nem mesmo a delícia da companhia.*

*É a inspiração espiritual que vem quando você descobre que alguém acredita e confia em você." - Ralph Waldo Emerson*

*Ao Rafa e a Wal. Não há como separar vocês, que sempre se dispõem juntos a me ajudar.*

*Obrigada por tentarem suprir as necessidades da falta física de um orientador. Obrigada também pelas horas de descontração. Que a vida reserve um destino maravilhoso pra vocês!*

*"Sede como os pássaros que, ao pousarem um instante sobre ramos muito leves, sentem-nos ceder, mas cantam! Eles sabem que possuem asas."*

*Ao Jerson, que me deu a oportunidade de fazer parte do seu grupo e desenvolver este trabalho. E apesar do pouco tempo que dispõe a cada um de seus alunos, saiba que este pouco tempo é muito precioso para nós!!!*

*À Nathália, que vem me ajudando incessantemente com a finalização deste trabalho. Que sempre tenta tomar a frente quando minha cabeça já não funciona mais. Que mesmo não sabendo, me incentiva a cada dia. E me faz realmente acreditar que é ensinando que se aprende.*

*Ao Andre, pelo seu brilhantismo de idéias. Que me faz imaginar que se existe vida após a morte, na próxima quero ter uma mente brilhante como a sua.*

*A Luciane, que com seu otimismo e perseverança, foi quem me ajudou bastante na obtenção dos nossos resultados.*

*A todos do LATEV que sempre se dispuseram a me ajudar, principalmente ao Dr. Marcos Freire e ao Luiz Fernando.*

*À Profa. Débora Foguel, pela qual tenho uma profunda admiração, pois sempre que pode está com uma pipeta numa mão e um eppendorf na outra. Obrigada por aceitar revisar esta tese.*

*À minha amiga Eli, com a qual aprendo que verdadeiras amizades continuam crescendo, mesmo a longas distâncias.*

*A todos vocês, que puderam acompanhar mais de perto as dificuldades e as vitórias deste trabalho: Sheilinha, Cristiane, Mônica, Théo, Daniel, Ana Paula, Ana Cristina, Karinne, Shana, Ana Carol e Carlos.*

*Ao Emerson, que sem sua eficiência tudo seria muito mais difícil e demorado.*

*À Silvia, que tenta manter nosso laboratório organizado e limpo.*



*A todos os amigos do LTPV/LAPA, que de alguma forma contribuíram para o andamento desta tese.*

*Aos Professores Júlio Alberto Mignaco, Robson de Queiroz Monteiro, Luis Maurício Trambaioli da Rocha e Lima, que gentilmente aceitaram fazer parte da banca desta tese.*

## Resumo

A febre amarela é uma doença aguda causada por um flavivírus transmitido por mosquitos, principalmente em áreas tropicais como na América do Sul e na África sub-Saariana. Os humanos e os primatas são os principais animais infectados pelo vetor. O Vírus da Febre Amarela (YFV) é membro da família *Flaviviridae*, que compreende vírus envelopados de 40-60 nm de diâmetro com um capsídeo icosaédrico que contém uma fita simples de ARN como genoma. Seu ARN codifica três proteínas estruturais, a proteína capsídica C, uma pequena proteína de membrana M e uma grande proteína de envelope E, além de sete proteínas não estruturais. Acredita-se que a entrada do YFV na célula ocorra por endocitose mediada por receptor e uma subsequente fusão do vírus induzida pelo baixo pH, através do ectodomínio da proteína E, com a membrana endossomal. Neste trabalho, nós buscamos a inativação por pressão do YFV e estudamos sua estabilidade e a dinâmica das partículas sob alta pressão hidrostática a fim de verificar as alterações estruturais promovidas por este processo. Com este objetivo, nós inicialmente verificamos a condição ideal de pressão e tempo que levaria à completa inativação das partículas virais, já que a alta pressão tem sido utilizada para inativar diversos vírus. Para entender como estas partículas são inativadas, nós primeiramente promovemos perturbações na estrutura utilizando agentes desnaturantes químicos, como a uréia, e agentes físicos, como a alta temperatura. O processo de perturbação do YFV foi monitorado principalmente por medidas de espectroscopia de fluorescência, e os resultados mostraram que quando o vírus é submetido a pressões acima de 3.0 kbar, ocorria alterações significativas no centro de massa do espectro do triptofano, condizente com os ensaios de infecciosidade, e este se mostrou ser um processo reversível. Ao contrário, os valores de espalhamento de luz se mantiveram constantes ao longo do tempo de inativação. Esta reversibilidade foi confirmada por gel filtração em HPLC, onde as partículas pressurizadas e inativadas se mantiveram tão íntegras como as partículas nativas. Estes resultados sugerem que a estrutura viral provavelmente adquiriu uma conformação diferente da nativa, mas ainda manteve sua integridade. Experimentos de ligação de sondas fluorescentes como bis-ANS e LAURDAN nos confirmam a reversibilidade deste processo, indicando que a alteração conformacional provavelmente estaria ocorrendo a nível de glicoproteína E, responsável pela interação vírus-célula, e não por alteração na estrutura do envelope lipídico. Estes resultados podem abrir novos caminhos para o desenvolvimento de vacinas contra diversos flavivírus que vêm causando surtos epidêmicos em todo mundo.

## Abstract

Yellow fever is an acute febrile illness caused by a mosquito-borne flavivirus transmitted mainly in tropical South America and sub-Saharan Africa. Humans and primates are the principal animals infected by the vector, the biting mosquito. Yellow Fever Virus (YFV) is the prototypic member of *Flaviviridae*, a family of enveloped viruses of 40-60 nm in diameter with an icosahedral capsid that contains a single positive stranded RNA as genome. Its RNA encodes three structural proteins, the capsid protein C, the small membrane protein M, and the large envelope protein E, and seven nonstructural proteins. YFV is believed to enter cells by receptor-mediated endocytosis and subsequent acid-induced fusion of the viral, through ectodomain of protein E, and endosomal membranes. In the present work, we have aimed the viral inactivation by pressure of YFV and studied the stability and particles dynamics under high hydrostatic pressure in order to verify alterations on viral structure promoted by this process. With this aim, we initially verified the ideal condition of pressure and time that promote the complete inactivation of virus particles, since high pressure has been used to inactivate several viruses. To understand how these particles are inactivated, we first promoted disturbances on the viral particles by using chemical denaturing agents, such as urea, and physical agents, such as high temperature. The perturbation processes of YFV have been monitored mainly by fluorescence spectroscopy measurements and the results shown that when the virus is submitted to pressures up to 3.0 kbar, there were significant changes in the spectral center of mass of tryptophan, what was confirmed by infectivity assays, and showed to be a reversible process. On the other hand, the values of light scattering remained constant during the inactivation process. This reversibility was confirmed by gel filtration in HPLC, where the pressurized and inactivated particles maintain the size and elution profile as the native ones. These results suggest that the viral structure probably has acquired a different conformation when compared with the native one, however still keeping certain integrity. Experiments of bis-ANS and LAURDAN binding confirm the reversibility of the process, indicating that conformational changes probably occur on glycoprotein E, responsible for the virus-cell interaction, and not for changes on the structure of lipidic envelope. These results together could open gates to development of vaccines against some flaviviruses that have causing outbreaks all around the world.

## Abreviaturas

- 17D – cepa vacinal da febre amarela distribuída no mundo (exceto no Brasil)
- 17D-204 – cepa vacinal da febre amarela distribuída no mundo (exceto no Brasil)
- 17DD – cepa vacinal da febre amarela distribuída no Brasil
- 3X – eixo de rotação 3X (120°)
- A – base nitrogenada adenina
- ADN – ácido desoxirribonucléico
- ARN – ácido ribonucléico
- Asibi – cepa original da vacina contra febre amarela
- bis- ANS - bis 8-anilinoftaleno-1-sulfonato
- C – proteína capsídica
- C – base nitrogenada citosina
- Cap – região iniciadora do genoma
- CMC – carboxi-metil celulose
- CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono
- Coiled coil – estrutura espiral espiralada
- CSFV – Vírus da Febre Suína Clássica
- C-terminal – carboxi-terminal
- DNV – Vírus da Dengue
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- E – proteína de envelope E de flavivírus
- E1 – proteína de envelope E1 de flavivírus
- EDTA – ácido etileno-diamino tetracético
- FP – peptídeo de fusão
- G – base nitrogenada guanina
- GAGs - glicosaminoglicanos
- GP – polarização generalizada
- GPC 1000 – coluna de gel filtração
- Hepes – ácido hidroxietil piperazino-amina etano-sulfônico
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
- HMNE – tampão Hepes, MES, NaCl e EDTA
- HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Resolução
- HS – Heparan Sulfato

I – Intensidade de Fluorescência  
JEV – Vírus da Encefalite Japonesa  
LATEV – Laboratório de Tecnologia Viroológica de Bio Manguinhos (Fiocruz)  
LAURDAN - 2-dimethyl-amino-6-lauroylnaphthalene  
M – proteína de membrana M de flavivírus  
MES – ácido morfolino etano-sulfônico  
NS – proteínas não estruturais de flavivírus  
NSP – genes que codificam as proteínas não estruturais de flavivírus  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
ORF – região codificante do genoma  
PE2 – proteína de envelope E2 de alfavírus  
pH – potencial hidrogeniônico  
prM – proteína de membrana precursora de flavivírus  
RE – retículo endoplasmático  
RPR 12.2 – rotor de centrífuga  
RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase por Transcriptase Reversa  
SFV – Vírus da Floresta de Semliki  
SP – genes que codificam as proteínas estruturais de flavivírus  
SW 40Ti – rotor de ultracentrífuga  
T – base nitrogenada timina  
TBEV – Vírus da Encefalite por Picada de Carrapato  
TNE – tampão Tris, NaCl e EDTA  
Tris – Tris (hidroximetil) amino-metano  
 $U_{1/2}$  – concentração de uréia necessária para promover metade do processo de desnaturação  
U – base nitrogenada uracil(a)  
UFP – unidades formadoras de placas  
Vero – fibroblastos de rim de macaco verde  
VSV – Vírus da Estomatite Vesicular  
WNV – Vírus do Oeste do Nilo  
YFV – Vírus da Febre Amarela

# ÍNDICE

	Pág
<b>1- INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
1.1 - Os Flavivírus	1
1.2 - Estrutura e Biossíntese dos Flavivírus	3
<i>A Estrutura do Virion</i>	3
<i>Replicação do ARN e Síntese de Proteínas Virais</i>	5
<i>Montagem e Liberação das Partículas Virais</i>	8
1.3 -Entrada dos Flavivírus na Célula Hospedeira	11
<i>Interação com o Receptor</i>	11
<i>Endocitose Mediada por Receptor</i>	12
1.4 -Atividade de fusão de Membrana dos Flavivírus	14
<i>O Processo de Fusão</i>	14
<i>Fusão de Membrana dos Flavivírus</i>	17
1.5 - A Febre Amarela	20
<i>Histórico</i>	20
<i>As Características da Doença</i>	21
<i>A Vacinação</i>	23
<i>Vacinas Atenuadas e Inativadas e o Problema Atual da Vacina</i>	26
<i>contra Febre Amarela</i>	26
1.6 – Efeito da Alta Pressão Hidrostática	29
<b>2 – OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>3 – METODOLOGIA</b>	<b>34</b>
3.1 – Reagentes	34
3.2 – Cultura de Células Vero	34
3.3 – Propagação e Purificação do YFV	34
3.4 – Ensaio de Infeciosidade	35
3.5 – Pressão Hidrostática e Termodinâmica	36
3.6 – Medidas Espectroscópicas	38
<i>Espectroscopia de Fluorescência</i>	38
<i>Fluorescência da Sonda Hidrofóbica bis-ANS</i>	40
<i>Fluorescência da Sonda LAURDAN</i>	41
3.7 – Espalhamento de Luz	43
3.8 – Cromatografia Líquida de Alta Resolução	44
<b>4 – RESULTADOS</b>	<b>45</b>
<b>5 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES</b>	<b>73</b>
<b>6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>84</b>

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1) Os Flavivírus

Os Flavivírus (*flavus*=amarelo, devido à icterícia provocada pela febre amarela), pertencentes à família *Flaviviridae*, compreendem um grande gênero de importância médica com cerca de 70 diferentes vírus transmitidos por artrópodes para hospedeiros vertebrados. Vários destes arbovírus são importantes patógenos humanos, incluindo os vírus da febre amarela (YFV), da dengue (DENV), da encefalite japonesa (JEV), do oeste do Nilo (WNV) e da encefalite do carrapato (TBEV) (Burke & Monath, 2001; Lindenbach & Rice, 2001). Assim, os flavivírus podem ser subdivididos dentro daqueles transmitidos por carrapatos, mosquitos e aqueles que aparentemente não possuem vetor artrópode (Kuno e cols., 1998).

A transmissão dos flavivírus geralmente ocorre através dos mosquitos. Uma vez o artrópode infectado, ele se torna cronicamente infectado pelo flavivírus, sem mostrar patologia significativa (DeFoliart e cols., 1987). Os mosquitos são um elemento essencial do ciclo artrópode-vertebrado em que os flavivírus são mantidos.

A epidemiologia da encefalite causada por flavivírus é governada por uma complexa interação de fatores climáticos, entomológicos, de comportamento humano, viral e dos hospedeiros, que não são completamente entendidos (Solomon e cols., 2003). Durante os verões de 2002 e 2003, a América do Norte foi afetada por sua maior epidemia de encefalites arbovirais. O vírus do oeste do Nilo causou 2942 casos de meningite ou encefalite em 2002, com 276 mortes, e 2866 casos em 2003, com 246 mortes (Petersen e cols., 2002; CDC, 2004). Em termos de número, o mais importante membro do grupo é o vírus da encefalite japonesa, que causa

cerca de 30.000 a 50.000 casos de encefalite e uma média de 10.000 mortes na Ásia todos os anos (Solomon e cols., 2000). O gênero Flavivírus inclui também os vírus da febre amarela e da dengue que podem causar febre hemorrágica e eventualmente encefalite.

O vírus da Dengue é um dos mais significativos patógenos virais humanos transmitidos por mosquitos e causa mais de 50 milhões de casos de infecção no mundo a cada ano, resultando em cerca de 24.000 mortes (WHO, 1998). A infecção é geralmente caracterizada por febre e severa dor nas articulações, porém as mais sérias síndromes, a febre hemorrágica e a síndrome de choque, ocorrem algumas vezes após a infecção por dengue. A febre hemorrágica causada pela dengue foi mais confinada ao sudeste da Ásia até a década de 60, quando também se tornou endêmica na América Central e, mais recentemente, na América do Sul (Burke & Monath, 2001).

As vacinas disponíveis foram criadas a partir de YFV atenuado e JEV e TBEV inativados. Contudo, as doenças resultantes destes vírus ainda são destaque no mundo inteiro (Lindenbach & Rice, 2001). A Organização Mundial de Saúde estima que a cada ano ocorram 200.000 casos de febre amarela, com aproximadamente 30.000 mortes em todo o mundo (WHO, 2001).

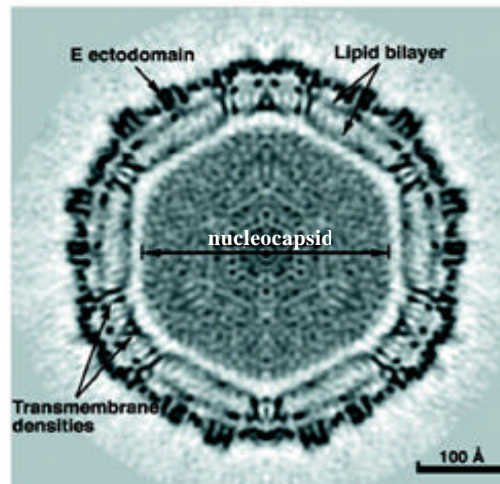


## 1.2) Estrutura e Biossíntese dos Flavivírus

### ***A estrutura do virion***

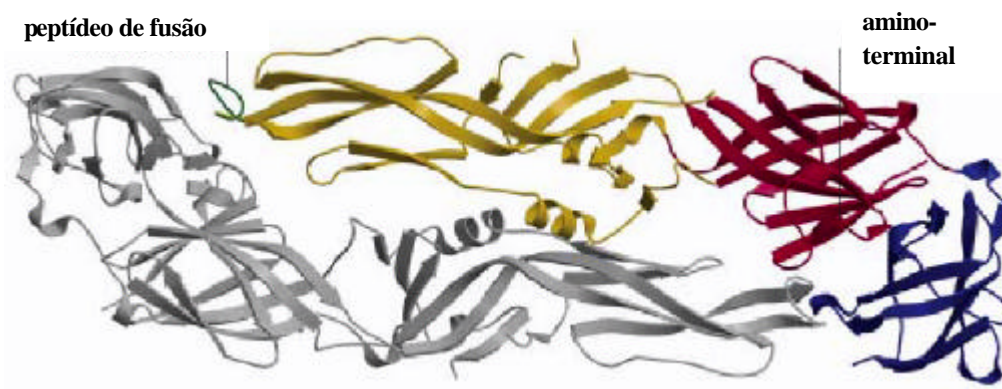
Os flavivírus são vírus envelopados esféricos, com 40-60 nm de diâmetro, que apresentam um capsídeo icosaédrico contendo uma molécula de ARN fita simples positiva, e composto por múltiplas cópias de somente três diferentes proteínas estruturais, denominadas C (capsídeo), E (envelope), e prM/M (precursor da proteína de membrana e proteína de membrana, respectivamente). O ARN é empacotado pela proteína capsídica viral, formando o nucleocapsídeo, que é envolvido por uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira, onde estão inseridas 180 cópias das duas glicoproteínas E e prM (Lindenbach & Rice, 2001).

A reconstrução de imagem tridimensional do vírus da Dengue mostra que o virion tem uma capa protéica externa bem organizada, uma bicamada lipídica oriunda da célula hospedeira e um nucleocapsídeo (Kuhn e cols., 2002; Zhang e cols., 2003a; Figura 1). O arcabouço icosaédrico consiste de 90 dímeros da proteína E, com três monômeros em cada unidade assimétrica, possuindo um ambiente de quasiequivalência  $T=3$  (Caspar & Klug, 1962). A organização das glicoproteínas sugere um mecanismo de fusão comum para alfavírus e flavivírus, baseado na inserção de uma estrutura tipo barril- $\beta$  na membrana da célula hospedeira (Kuhn e cols., 2002).



**Figura 1. A estrutura do Vírus da Dengue.** Um corte central mostra a forma poligonal da membrana e os componentes virais: a bicamada lipídica e o ectodomínio da proteína E. Extraído de Zhang e cols., 2003a.

Vários estudos têm mostrado que a proteína E dos flavivírus parece ter um papel crucial em mediar a interação dos receptores celulares ao vírus (Heinz e cols., 1994; Helenius, 1995; Rey e cols., 1995; Crill & Roehrig, 2001; Thullier e cols., 2001). Baseado nos dados de cristalografia da proteína E do TBEV, cada monômero de proteína E é enovelado em três domínios estruturais distintos. O domínio estrutural central I é o domínio antigênico que carrega o sítio de glicosilação. O domínio II da proteína E parece ser responsável pela fusão, dependente de pH, dos vírus às vesículas endocíticas. E o domínio estrutural III é importante para a ligação dos flavivírus às células hospedeiras. O domínio III contém um típico enovelamento de um domínio constante em imunoglobulinas, que forma o sítio de ligação ao receptor para as partículas virais (Rey e cols., 1995; Figura 2).



**Figura 2. Estrutura de um homodímero da proteína E.** Conformação de pré-fusão da proteína E do vírus da Dengue-2. Em um monômero, os domínios I, II e III estão representados em vermelho, amarelo e azul, respectivamente. O peptídeo de fusão é mostrado em verde. O outro monômero está em cinza. Adaptado de Mukhopadhyay e cols., 2005.

### ***Replicação do ARN e síntese de proteínas virais***

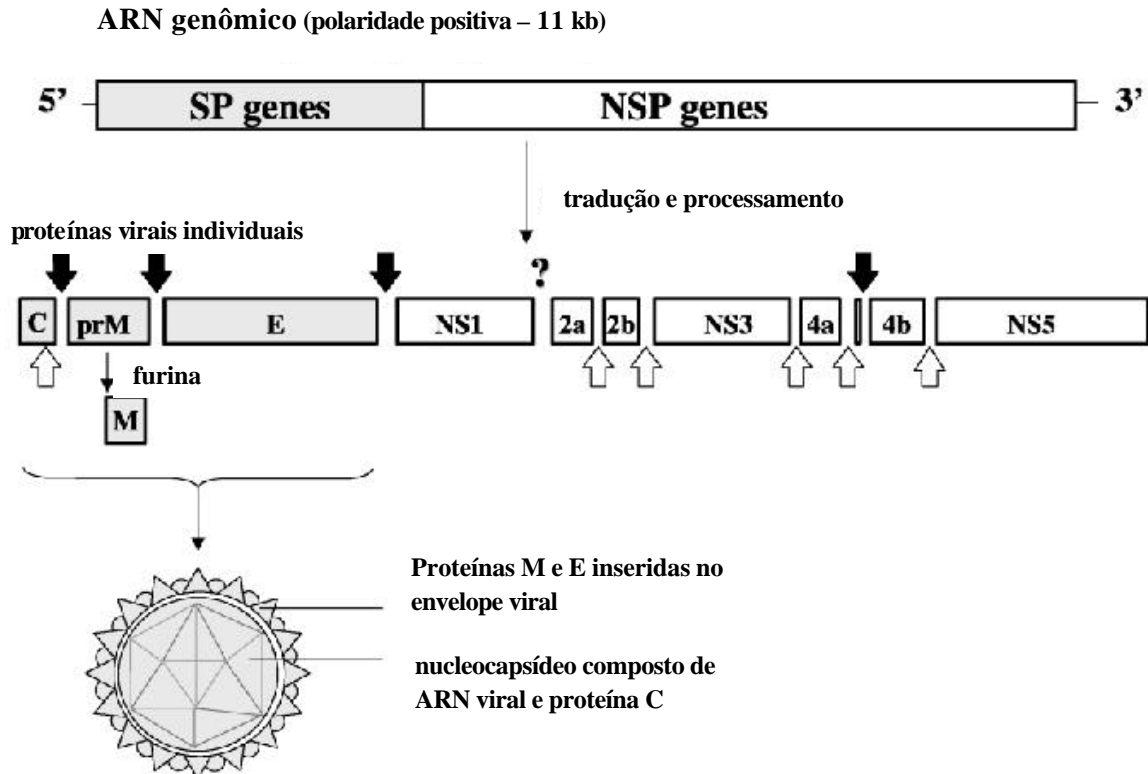
Com o desenvolvimento da tecnologia do ADN recombinante, novas abordagens para o entendimento da estrutura e expressão do genoma de vírus de ARN foram possíveis. Para os flavivírus, os primeiros estudos foram publicados na década de 80 incluindo as sequências genômicas completas dos vírus YFV (Rice e cols., 1985) e WNV (Wengler e cols., 1985). Os resultados das sequências de nucleotídeos e proteínas foram subsequentemente obtidos e eles formam a base do conhecimento atual da estrutura e expressão genômica.

A composição básica do ARN do vírus da febre amarela é de 27,3% de A, 23% de U, 28,4% de G e 21,3% de C (Rice e cols., 1985). As sequências terminais do ARN do WNV e do YFV são idênticas: 5' capAGUA...CU<sub>OH</sub>3' (Rice e cols., 1985; Wengler & Wengler, 1981). A estrutura secundária estável no 3' do ARN do YFV parece assegurar que os últimos quatro ou cinco nucleotídeos formem pontes de hidrogênio (Rice e cols., 1985; Grange e cols., 1985) e conseqüentemente protege esta região de modificações enzimáticas (Wengler & Wengler, 1981).

O genoma do YFV consiste de 10.862 nucleotídeos que codificam 3.411 aminoácidos (Rice e cols., 1985) com pequenas regiões 5' (118 nucleotídeos) e 3' (511 nucleotídeos) não transcritas, uma estrutura cap 5', e um final 3' não poliadenilado. As sequências conservadas e as estruturas secundárias do ARN que podem ser importantes para a replicação e/ou empacotamento dos flavivírus têm sido identificadas (Chambers e cols., 1990a; Cahour e cols., 1995).

Esta molécula de ARN simples é também o mensageiro viral e sua transcrição em células infectadas resulta na síntese de uma poliproteína precursora que sofre processamento proteolítico pós- e, possivelmente, co-transcricional para gerar 10 polipeptídeos específicos destes vírus. A partir do 5', a ordem das proteínas codificadas é a seguinte: C, prM/M, E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (Rice e cols., 1985; Figura 3).

As primeiras três proteínas constituem as proteínas estruturais, que juntas e com o empacotamento da molécula de ARN viral constituem o vírus, que apresenta um nucleocapsídeo, formado pela proteína C (11-14 kDa) envolvido por uma membrana lipoprotéica, composta pelas proteínas de membrana prM/M (18-22 kDa) e de envelope E (52-54 kDa), todas codificadas no primeiro quarto do genoma. O restante do genoma codifica as proteínas não estruturais (NS) numeradas de 1 a 5 na ordem de síntese (Figura 3). Três grandes proteínas não estruturais possuem sequências altamente conservadas entre os flavivírus, NS1 (38-41 kDa), NS3 (68-70 kDa) e NS5 (100-103 kDa).



**Figura 3. Organização genômica dos flavivírus.** O ARN viral possui uma única região codificante (ORF), com cerca de 10.233 nucleotídeos, que transcreve uma poliproteína precursora e codifica várias proteínas virais. As proteínas virais são geradas pela sinalase celular (setas grossas pretas) ou pela protease viral NS2B/NS3 (setas brancas). Uma clivagem adicional pela protease viral próxima ao C-terminal da proteína C produz uma forma menor de C. A proteína prM (precursor de M) intracelular é clivada pela furina antes da liberação dos vírus. As partículas virais contêm nucleocapsídeos compostos por uma fita de ARN genômico e proteínas C. Este nucleocapsídeo é envolto por um envelope contendo as glicoproteínas M e E. SP genes = codificam proteínas virais estruturais; NSP genes = codificam proteínas virais não-estruturais. Adaptado de Pugachev e cols., 2003.

Nenhum papel ainda foi mostrado para NS1, mas NS3 parece ser bifuncional, com uma atividade proteásica necessária para o processamento da poliproteína em sítios onde proteases celulares não clivam (Chambers e cols., 1990b; Preugschat e cols., 1990; Falgout e cols., 1991; Yamshchikov & Compans, 1995) e uma atividade nucleotídica trifosfatase/helicase (Gorbalenya e cols., 1989; Wengler & Wengler, 1993), sendo portanto também associada com a replicação viral. NS5, a maior proteína e mais conservada, contém várias sequências motivos comuns a ARN-polimerases virais (Chambers e cols., 1990a).

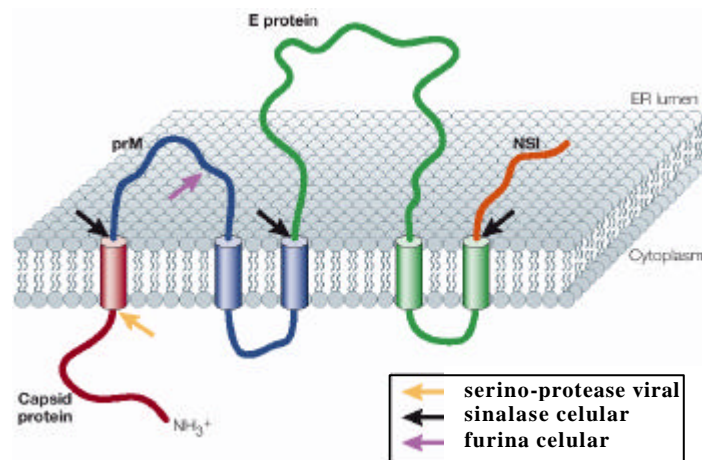
As quatro outras pequenas proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são pouco conservadas em suas sequências de aminoácidos, mas não em seu perfil de múltiplas regiões hidrofóbicas. NS2A mostrou-se necessária para o próprio processamento de NS1 (Falgout e cols., 1989), enquanto NS2B parece estar associada à atividade proteásica de NS3 para clivar ela mesma de NS3 e para produzir NS4B (Falgout e cols., 1991; Preugschat & Strauss, 1991; Jan e cols., 1995). Uma vez que a síntese de ARN viral ocorre no citosol em associação com membranas do retículo endoplasmático, foi postulado que estas proteínas hidrofóbicas poderiam estar inseridas na membrana e, através de interações proteína-proteína, participar nos complexos de replicação viral junto com NS3 e NS5 (Rice e cols., 1985).

### ***Montagem e liberação das partículas virais***

A montagem intracelular dos flavivírus não é precisamente entendida, mas acredita-se que isto ocorra no retículo endoplasmático (RE), já que em células infectadas as partículas virais se tornam primeiramente visíveis por microscopia eletrônica neste compartimento (Ko e cols., 1979; Deubel e cols., 1981). A poliproteína é processada sobre a membrana do retículo endoplasmático através de proteases virais e celulares (Figura 4) e as proteínas já clivadas são montadas, junto com o ARN, em partículas imaturas e não infecciosas (Mackenzie & Westaway, 2001; Figura 5A).

As sequências sinais internas e os sítios de clivagem de peptidase garantem a correta topologia da poliproteína e seus produtos clivados na membrana do RE. O uso das poliproteínas para a geração de proteínas estruturais e não-estruturais é

ditado em parte pelas estratégias de replicação viral, que não permitem a geração de múltiplas fitas de ARNs mensageiros, e pelo tamanho limitado do genoma.

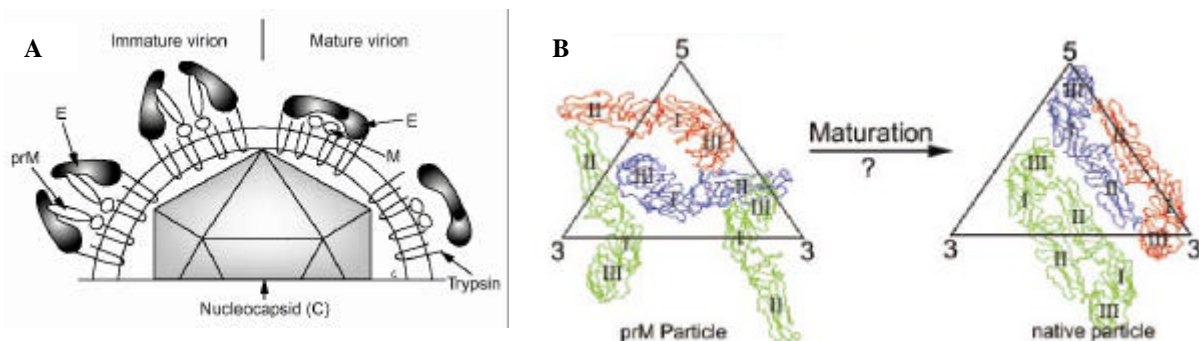


**Figura 4. Topologia das proteínas dos flavivírus sobre a membrana do RE.** A orientação predita das proteínas estruturais em torno da membrana do retículo endoplasmático (RE) é mostrada. As hélices transmembranares são indicadas por cilindros, as setas indicam os sítios de clivagem pós-traducionais e os sítios de clivagens de enzimas específicas estão indicados por cores diferentes. Adaptado de Mukhopadhyay e cols., 2005.

A proteína de membrana M é sintetizada como uma proteína precursora, prM, que forma um heterodímero com a proteína E intracelularmente (Figura 5A). Dessa forma, o pré-peptídeo (prM) provavelmente funciona evitando que a proteína E sofra alterações conformacionais prematuramente pelo baixo pH, durante o transporte através dos compartimentos e vesículas ácidas da rede de trans-Golgi (Guirakhoo e cols., 1991; Heinz e cols., 1994), como é o caso da PE2 em alfavírus (Strauss & Strauss, 1994).

Pouco antes da partícula ser liberada da célula por exocitose, prM é clivada, aparentemente pela protease celular furina, permitindo a formação de homodímeros de proteína E e produzindo virions maduros, agora sim infecciosos (Stadler e cols., 1997; Figura 5A). Uma vez que a maioria dos flavivírus brota do lúmen do RE, as glicoproteínas de envelope são transportadas através do complexo de Golgi para a

membrana plasmática como parte das partículas virais imaturas (Lindenbach & Rice, 2001).



**Figura 5. Diagrama esquemático da composição de flavivírus imaturo e maduro e organização da proteína E proposta durante a maturação.** **A.** A maturação dos flavivírus ocorre após a clivagem da proteína precursora de membrana, que deixa de formar um heterodímero com a proteína E, permitindo que esta se organize em homodímeros (Heinz & Allison, 2001). **B.** Rearranjo mais provável necessário para as partículas imaturas se tornarem virions maduros e infecciosos. Três moléculas de E independentes por unidade assimétrica icosaédrica são mostradas em vermelho, azul e verde. Os três domínios em cada monômero estão identificados como I, central; II, de dimerização; III, imunoglobulina (Zhang e cols., 2003b).

A maturação das proteínas de envelope dos flavivírus (Figura 5B) é coordenada, e as interações iniciais entre elas são necessárias para o completo enovelamento de E, mas não para prM, sugerindo que prM também sirva como chaperone para o perfeito enovelamento e montagem de E (Lorenz e cols., 2002).



### 1.3) Entrada dos Flavivírus na Célula Hospedeira

#### ***Interação com o receptor***

Em vírus que contêm membrana, as proteínas estruturais externas funcionam para se ligar aos receptores celulares e interagir com a membrana da célula hospedeira para a fusão, e conseqüentemente a entrada na célula, bem como para direcionar a via de montagem e brotamento viral. Além disso, as proteínas de superfície normalmente possuem determinantes antigênicos que favorecem a ligação de anticorpos neutralizantes. Estas funções são geralmente distribuídas entre diferentes proteínas virais, mas nos flavivírus, a glicoproteína de envelope E participa de todas estas funções (Heinz & Mandl, 1993).

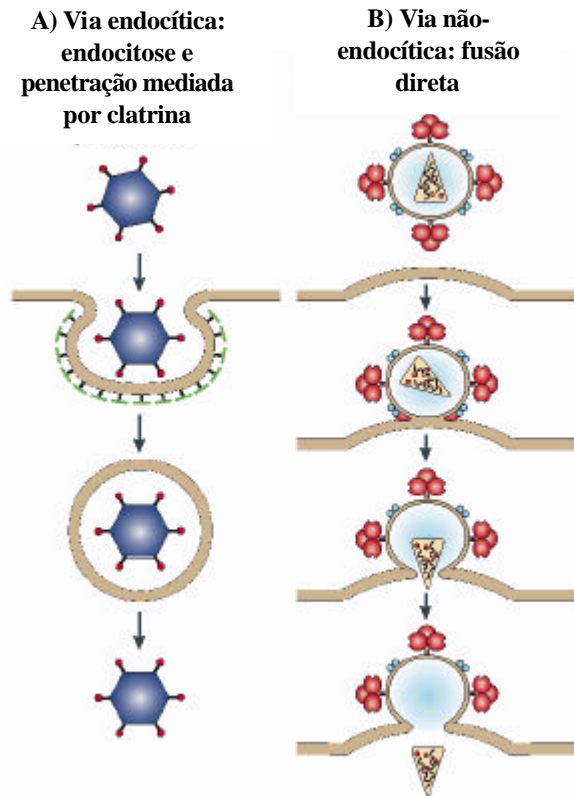
A ligação de um vírus ao seu receptor específico é o maior fator de tropismo celular e um determinante crítico da patogênese. Embora alguns trabalhos tenham sido realizados sobre a ligação do vírus Dengue a diferentes tipos de receptores (Ramos-Castaneda e cols., 1997; Munoz e cols., 1998; Hung e cols., 1999), os eventos iniciais da infecção dos flavivírus ainda não foram descritos em detalhes, e pouco se sabe a respeito da base molecular da ligação dos flavivírus às suas células hospedeiras. O heparan sulfato (HS), membro mais ubiquitinado das moléculas da família dos glicosaminoglicanos (GAGs), é usado por muitos vírus para ligar às células hospedeiras, como é o caso dos vírus da herpes simplex (Shukla e cols., 1999), da imunodeficiência humana (Patel e cols., 1993), da febre aftosa (Fry e cols., 1999), vaccínia (Lin e cols., 2000), sindbis (Byrnes & Griffin, 1998) e papiloma (Joyce e cols., 1999).

O HS pode atuar diretamente como um receptor, ou ajudar a concentrar estes vírus sobre a superfície da célula para facilitar a interação com receptores específicos de alta afinidade. Recentemente foi mostrado que a glicoproteína de superfície do vírus da dengue solúvel ligava a GAGs altamente sulfatados sobre a superfície de células, e que a infecção destas células era bloqueada por heparina e por HS (Chen e cols., 1997). Já foi mostrado que o YFV também se liga a HS sobre a superfície de células, e que esta ligação é um pré-requisito para a infecção ocorrer. Além disso, foi visto que a heparina pode inibir a infecção do YFV em cerca de 97% (Germi e cols., 2002).

### ***Endocitose mediada por receptor***

Os eventos iniciais da infecção viral geralmente envolvem a ligação do vírus a moléculas sobre a membrana plasmática da célula hospedeira, os receptores celulares. Isto é seguido pela internalização, desmontagem e subsequente transcrição e/ou tradução gênica em localizações específicas na célula. Vários estudos têm demonstrado claramente que os vírus animais podem utilizar diferentes vias de internalização e tráfego (Chu & Ng, 2002).

Para os vírus envelopados, o processo de entrada pode ocorrer ou pela via de fusão das glicoproteínas de envelope à membrana plasmática em um pH neutro, para promover a internalização do nucleocapsídeo viral, ou as partículas virais podem sofrer endocitose antes de fundir com a membrana endocítica (Figura 6). Neste último caso, a alteração conformacional da proteína de fusão para expor o peptídeo de fusão hidrofóbico é induzida por baixo pH para ocorrer a liberação do nucleocapsídeo dentro do citoplasma celular (Chazal & Gerlier, 2003).



**Figura 6. As duas principais vias de entrada dos vírus. A.** Endocitose mediada por clatrina, como é o caso dos adenovírus. **B.** Fusão direta com a membrana celular, por exemplo o HIV. A fusão pode ocorrer de dentro de um endossoma, como ocorre com o vírus Influenza. Adaptado de Dimitrov, 2004.

Estudos recentes têm tentado detalhar a via de entrada dos flavivírus durante os eventos iniciais da infecção. O processo de entrada inicia-se com a ligação das partículas virais à célula hospedeira, seguido pela via endocítica mediada por clatrina para internalização das partículas. Os vírus trafegam então ao longo das vias endocíticas endossomal e lisossomal, com o envolvimento da rede de microtúbulos e, subseqüentemente, um mecanismo de fusão dependente de pH expulsa o nucleocapsídeo viral para dentro do citoplasma nas proximidades do retículo endoplasmático (Chu & Ng, 2004).

## 1.4) Atividade de Fusão de Membrana dos Flavivírus

### ***O processo de fusão***

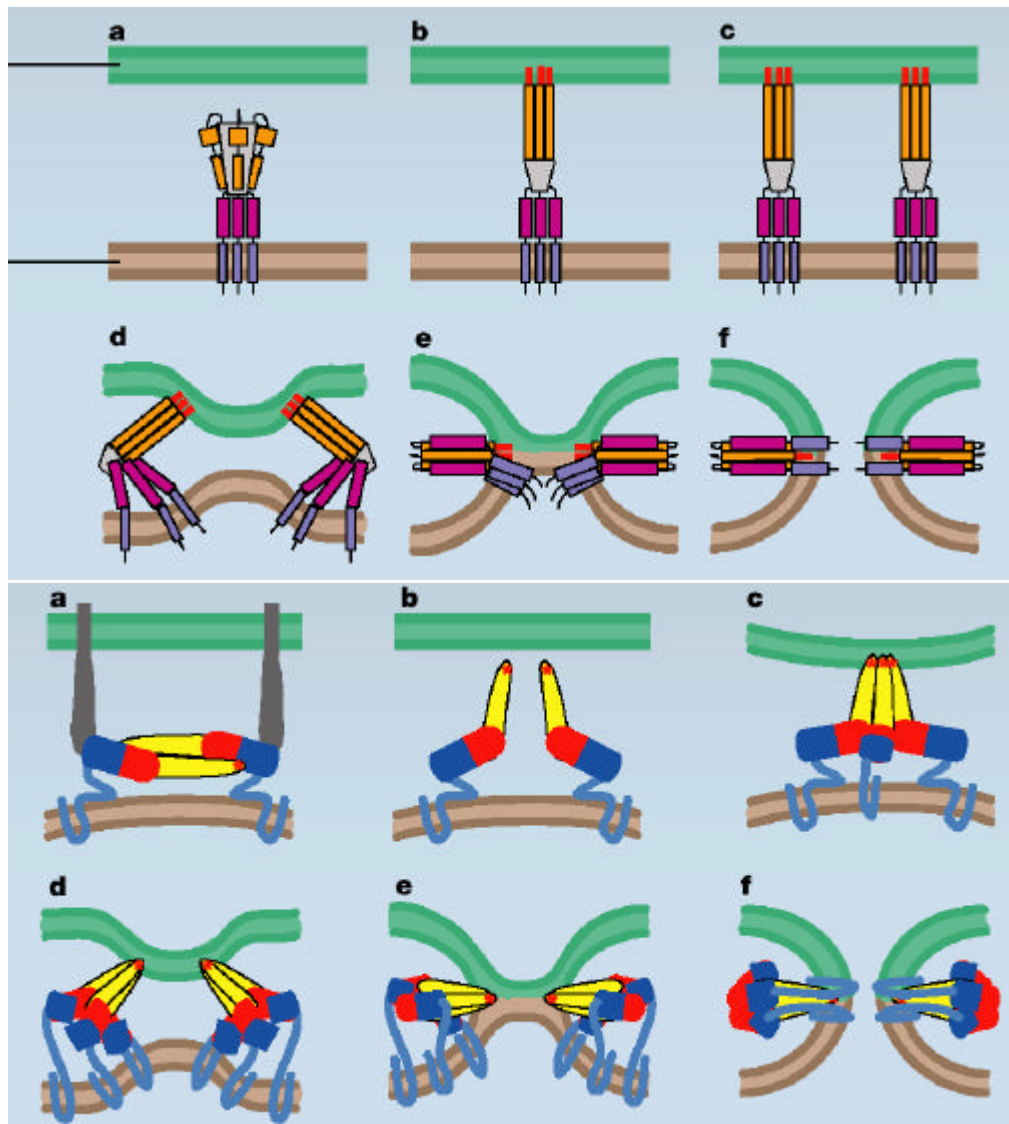
Os vírus envelopados têm se desenvolvido diferentemente, mas conceitualmente se assemelham nos mecanismos para fundir suas membranas com as membranas celulares durante a entrada nas células. O processo é controlado por glicoproteínas de superfície viral que sofrem eventuais alterações conformacionais necessárias para mediar a fusão (Hernandez e cols., 1996; Weissenhorn e cols., 1999).

Desta forma, vários vírus de diferentes famílias são agora conhecidos por apresentar proteínas de fusão com marcantes características estruturais similares, tais como a orientação perpendicular à membrana (como nas espículas), a presença de peptídeos de fusão amino-terminal ou amino-proximal (pequenos trechos de aminoácidos que interagem diretamente com a membrana alvo), e a formação de uma estrutura característica de pós-fusão em forma de grampo (Skehel & Wiley, 1998; Weissenhorn e cols., 1999).

Pelo menos duas diferentes classes de proteínas de fusão viral podem ser distinguidas (Lescar e cols., 2001). A classe I é representada pelos ortomixovírus, retrovírus, paramixovírus e filovírus. Suas proteínas de fusão maturam por clivagens proteolíticas de uma proteína precursora, produzindo uma subunidade ancorada à membrana com um peptídeo de fusão amino-terminal ou amino-proximal (Figura 7A). O processo de fusão, seja por ligação ao receptor e/ou redução de pH, resulta na formação de uma estrutura trimérica característica de pós-fusão, com uma espiral

espiralada (“coiled coil”) tripla ancorada (Chan & Kim, 1998; Skehel & Wiley, 1998; Weissenhorn e cols., 1999).

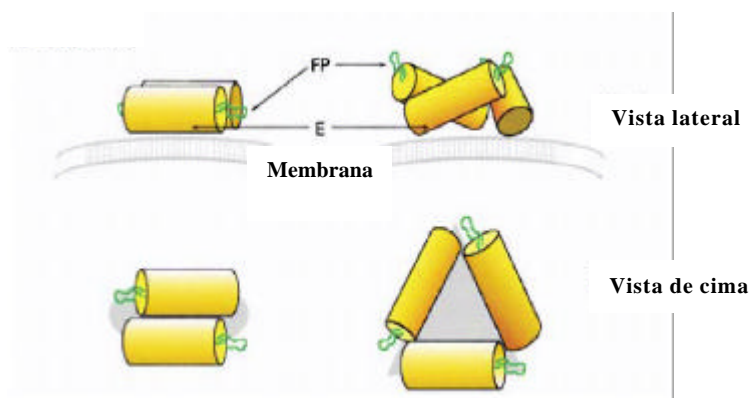
As proteínas de fusão da classe II não são proteoliticamente clivadas e apresentam os peptídeos de fusão internos preferencialmente na região amino-terminal (Figura 7B). Estes são sintetizados como um complexo com uma segunda glicoproteína de membrana, e a ativação do potencial fusogênico envolve a clivagem desta proteína acessória (Heinz & Allison, 2000; 2001; Kielian e cols., 2000). Estudos de cristalografia de raio-X de duas proteínas de fusão da classe II, a proteína E do flavivírus TBEV (Rey e cols., 1995) e a proteína E1 do alfavírus da Floresta de Semliki (SFV) (Lescar e cols., 2001), revelaram um enovelamento comum para estas proteínas, que são estruturalmente não-relacionadas às proteínas de fusão da classe I, para a qual a hemaglutinina do vírus Influenza é o protótipo (Wilson e cols., 1981; Bullough e cols., 1994).



**Figura 7. Mecanismos propostos para a fusão de membrana das proteínas classes I e II.** *Painel Superior:* **a**, conformação metastável de uma proteína de fusão trimérica da classe I, com o domínio A em laranja, B em rosa e o domínio transmembrana em roxo; **b**, após a ligação a um receptor sobre a membrana celular, ou sob exposição ao baixo pH (no endossoma), as proteínas adotam uma conformação estendida, e o peptídeo de fusão hidrofóbico (vermelho) se insere na membrana alvo; **c**, vários trímeros estão envolvidos nesta condição; **d**, as proteínas começam a se reenovelar, ocasionando a curvatura da membrana em direção à outra; **e**, a formação de um talo de hemifusão permite a mistura de lipídeos das membranas; **f**, o reenovelamento da proteína se completa, formando uma proteína de fusão mais estável. *Painel Inferior:* **a**, a proteína E dimérica se liga ao receptor celular (cinza) e o vírus é internalizado no endossoma. O domínio I está em vermelho, II em amarelo e III em azul claro e escuro; **b**, o baixo pH no endossoma causa um giro do domínio II para cima, permitindo aos monômeros se rearranjarem lateralmente; **c**, a alça de fusão (ponto vermelho) se insere no folheto externo da membrana celular, permitindo a formação do trímero; **d**, o domínio III muda e rotaciona para criar contatos, curvando a membrana; **e**, a formação de mais um contato leva à hemifusão; **f**, a forma final mais estável da proteína. Membrana celular em verde e membrana viral em marrom. Extraído de Jardetzky & Lamb, 2004.

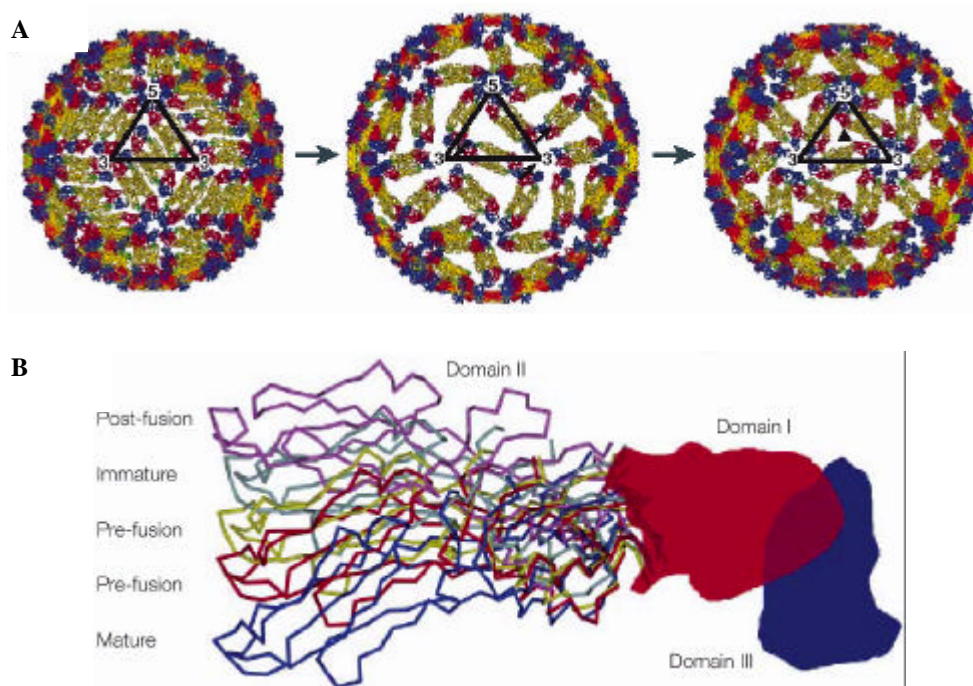
## **Fusão de membrana dos Flavivírus**

A entrada dos flavivírus na célula pela via endocítica e a fusão da membrana viral com a membrana endossomal é induzida pelo pH baixo no endossoma (Heinz & Allison, 2000). A proteína E do vírus TBE forma homodímeros achatados cabeça-cauda (Rey e cols., 1995) que estão ancorados e orientados paralelamente à membrana viral e formam uma grade icosaédrica regular através de interações laterais específicas (Rey e cols., 1995; Ferlenghi e cols., 2001), outra característica que os flavivírus têm em comum com os alfavírus (Lescar e cols., 2001; Pletnev e cols., 2001). Em um ambiente de pH baixo, onde a fusão de membrana ocorre, a superfície do virion sofre um rearranjo combinado, envolvendo uma dissociação dos homodímeros de E nativos e uma subsequente reorganização irreversível para um estado homotrimérico (Figura 8) (Allison e cols., 1995; Stiasny e cols., 1996; 2001; Modis e cols., 2004; Bressanelli e cols., 2004).



**Figura 8. Configuração da glicoproteína E de flavivírus sobre a superfície dos virions em um pH neutro e a configuração proposta para um pH ácido.** Sob exposição ao baixo pH, os dímeros da proteína E nativa se dissociam reversivelmente em monômeros, mas são subsequentemente convertidos em um estado irreversível de homotrimeros. As glicoproteínas E estão mostradas em cilindros amarelos com o peptídeo de fusão em verde (FP). A membrana é mostrada em cinza. Adaptado de Kunh e cols., 2002.

Acredita-se que este rearranjo inicia o processo de fusão por expor o peptídeo de fusão interno (Figuras 8 e 9) e ligar à membrana alvo (Allison e cols., 2001). O processo de fusão necessita de redução de pH e não requer a presença de proteínas específicas e, ao contrário dos alfavírus, não tem uma necessidade absoluta para lipídeos específicos na membrana alvo (Corver e cols., 2000).



**Figura 9. Rearranjo e estrutura da proteína E propostos durante a fusão. A.** Os dímeros da proteína E de vírus maduros (esquerda) sofrem um rearranjo para formar uma estrutura fusogênica predita T=3 (direita) com a possível formação de um intermediário (centro). O triângulo sólido na partícula da direita indica a posição de um eixo 3X. Notar a expansão do raio das partículas intermediária e fusogênica. **B.** Estrutura cristalográfica da proteína E, mostrando a variação na angulação entre os domínios I e II. A estrutura do domínio II da proteína E no estado pós-fusão é mostrado em roxo, no vírus imaturo em cinza, na forma dimérica de pré-fusão em amarelo e vermelho, e no vírus maduro em azul. O diagrama das estruturas comuns dos domínios I e III é mostrado em vermelho e azul. Extraído de Mukhopadhyay e cols., 2005.

Dímeros da proteína E completa, isolados pelo tratamento dos virions com detergente, sofrem em solução uma transição dímero-trímero dirigida por baixo pH, mas formas truncadas de E, que perderam a região de ancoramento à membrana, sofrem a fase de dissociação sem trimerização.



Estudos iniciais com a proteína de fusão da classe I do vírus Influenza (hemaglutinina) mostraram que a atividade de fusão, bem como as alterações conformacionais associadas, que são normalmente induzidas pelo baixo pH, poderiam também ser induzidas por temperaturas elevadas e outras condições desestabilizantes de proteína, tais como o tratamento com uréia (Haywood & Boyer, 1986; Ruigrok e cols., 1986; Carr e cols., 1997). Uma vez que a forma final é mais estável, foi concluído que a hemaglutinina nativa é cineticamente encontrada em um estado metaestável (Baker & Agard, 1994). A indução da fusão por temperaturas elevadas tem sido observada também com outras proteínas de fusão de classe I, contrastando com o alfavírus SFV, cuja proteína de fusão pertence à classe II, que não induz fusão por aquecimento ou tratamento com uréia (Gibbons e cols., 2000).

Assim como na hemaglutinina, a forma trimérica da proteína E é mais estável que a forma dimérica nativa. Contudo, em contraste ao que ocorre com as proteínas de fusão de classe I, e similarmente ao que ocorre com a proteína de fusão E1 do SFV, as temperaturas elevadas não podem ser substituídas pela redução do pH como um gatilho para a fusão (Stiasny e cols., 2001).

## 1.5) A Febre Amarela

### ***Histórico***

A febre amarela foi reconhecida como uma entidade clínica em 1648, em Yucatan. As áreas tropicais das Américas foram sujeitas a grandes epidemias desde o século XVII até início do século XX, e a doença ocorreu em focos epidêmicos até o norte de Boston e Halifax. Ela também apareceu durante o século XVIII na Itália, França, Espanha e Inglaterra. Em 1905 ainda houve 5000 casos e 1000 mortes nos portos das cidades do sul dos EUA.

Os mosquitos foram sugeridos como vetor da febre amarela por Nott em 1848, mas esta teoria só foi seriamente proposta por Carlos Finlay, em 1881. Em 1900, Walter Reed demonstrou a existência de um agente filtrável no sangue de pacientes.

Os flavivírus têm sido experimentalmente estudados desde inícios do século passado. O vírus da febre amarela (YFV) foi o primeiro agente filtrável mostrado como sendo um causador de doença em humanos, e o primeiro vírus demonstrado ser transmissível por um vetor artrópode (Theiler & Downs, 1973). Essas descobertas ocorreram no limiar do século XX, cerca de 350 anos após a primeira descrição da doença.

Em 1927, Mahaffy e Bauer isolaram o primeiro flavivírus, o YFV, por inoculação de um macaco rhesus com sangue de um paciente em Ghana. Esta foi a fonte da cepa Asibi, origem da vacina 17D (Stokes e cols., 1928). Em 1937, Theiler e Smith relataram a atenuação da cepa Asibi por passagens em embriões de galinha e demonstraram o uso dos vírus modificados (17D) para imunização humana (Theiler

e Smith, 1937a). Durante a primeira década do século passado, o vírus da dengue foi também mostrado ser um agente filtrável e transmitido por artrópodes, mas ele não foi isolado até 1943.

A febre amarela continuou sendo um dos maiores problemas de saúde pública nas Américas. Os maiores casos são do tipo selvagem, e nenhuma epidemia ocasionada por *Aedes aegypti* tem sido relatada nos últimos 50 anos. Entretanto, na África, grandes epidemias envolvendo milhares de casos continuam ocorrendo, e a incidência da doença tem sido dramaticamente aumentada nos últimos anos (Lindenbach & Rice, 2001). O *Aedes aegypti* e vários vetores silvestres têm sido responsáveis pelas transmissões epidêmicas na África.

Até recentemente desconhecia-se a origem destes vírus. Não se sabia se eles já existiam na América antes do comércio de escravos vindos da África. Pesquisas utilizando ferramentas moleculares indicam que as amostras de febre amarela da América perderam parte de uma sequência repetitiva do genoma na região não codificante 3', o que não ocorre nas amostras africanas, inclusive na vacina 17D e na amostra protótipo Asibi, da qual derivou a amostra vacinal. Isto praticamente encerra a polêmica, indicando que o vírus se originou na África (Wang e cols., 1996; Barrett, 1997; Mutebi e cols., 2001).

### ***As características da doença***

A febre amarela é uma doença infecciosa, não contagiosa, que se mantém endêmica ou enzoótica nas florestas tropicais da América e África, causando periodicamente surtos isolados ou epidemias de maior ou menor impacto em saúde pública, sendo transmitida ao homem mediante a picada de insetos hematófagos da

família *Culicidae*, em especial dos gêneros *Aedes* e *Haemagogus* (Monath, 2001). Humanos e primatas são os principais animais infectados pelo vetor, o mosquito.

O vírus da febre amarela se insere no grupo dos arbovírus, apresentando-se em sua forma clássica com febre hemorrágica de elevada letalidade. A febre amarela constitui a febre hemorrágica original, a primeira descrita no mundo, que mais temor provoca na sociedade moderna (Monath, 2001).

Sob o ponto de vista epidemiológico, a febre amarela se divide em duas formas, rural e urbana, que diferem entre si quanto à natureza dos transmissores e dos hospedeiros vertebrados, e o local de ocorrência (Monath, 1988). E embora apenas um sorotipo do vírus amarílico seja reconhecido, há pequenas alterações genéticas entre as cepas da América e da África, que permitem atualmente caracterizar dois e cinco genótipos, respectivamente, não se sabendo se um é mais patogênico que o outro (Wang e cols., 1996; Mutebi e cols., 2001).

Eliminou-se a forma urbana na América em 1954, mas ainda hoje ela ocorre na África (Monath, 2001). A letalidade global varia entre 5-10%, percentual elevado quando comparado a outras viroses. Entre os casos graves que evoluem com síndromes ictero-hemorrágica e hepato-renal, a letalidade pode chegar a 50%. Os pacientes mais acometidos são geralmente indivíduos jovens, do sexo masculino, realizando atividades agropecuárias e de extração de madeira, bem como ecoturistas que embrenham-se nas matas sem vacinação prévia.

A África responsabiliza-se por mais de 90% dos casos de febre amarela anualmente notificados à OMS, o que corresponde a cerca de 5000 casos anuais. Na América do Sul, estima-se a ocorrência de 300 casos por ano. E em alguns países da África há transmissão urbana da doença (Robertson e cols., 1996).

O vírus inicialmente se replica nos nódulos linfáticos, então se espalha para o fígado, baço, medula óssea e miocárdio (Shoff e cols., 2001). Ele permanece silencioso durante uma fase de incubação que dura de 3 a 6 dias, e então o indivíduo apresenta um quadro de febre, mialgia, dor de cabeça, anorexia e vômito. Geralmente a febre ocorre em pulsos lentos. Muitos pacientes melhoram após 3 a 4 dias. Contudo, 15% entram na “fase tóxica” dentro de 24 horas, e sua condição progride para coagulação intravascular disseminada (Shoff e cols., 2001). A febre reaparece, e a icterícia hemolítica e hepática se desenvolve rapidamente, e é acompanhada por dores abdominais e vômitos. A hemorragia pode ocorrer no nariz, boca, olhos ou estômago, e o funcionamento do rim deteriora. O tratamento é mantido, mas metade dos pacientes morre na “fase tóxica”, dentro de 2 semanas.

### ***A vacinação***

O gênero Flavivírus, do qual o vírus da febre amarela é o vírus protótipo, consiste de cerca de 70 vírus, geralmente transmitidos para vertebrados por mosquitos ou carrapatos. Estes vírus podem ser divididos dentro de 8 subtipos sorológicos baseados em testes de neutralização cruzada. Membros destes grupos existem em muitos continentes e são responsáveis pelas doenças humanas e animais nestas áreas. Os mais importantes são o vírus da febre amarela, nas Américas e na África (Monath, 1987), o vírus da dengue, com seus quatro sorotipos que estão propagados através dos trópicos, com aumento da frequência das mais severas formas desta doença (febre hemorrágica e síndrome do choque) (Halstead, 1988), bem como o vírus da encefalite japonesa, com seus perfis epidêmicos e endêmicos na Ásia (Monath, 1988).

O controle da transmissão dos flavivírus tem sido realizado principalmente por medidas de controle do vetor e pela vacinação. As vacinas aprovadas estão disponíveis apenas para a febre amarela, usando o vírus 17D atenuado, e para a encefalite do carrapato e a encefalite japonesa, ambas como vírus inativado. Atualmente, duas cepas são usadas na produção de vacinas contra a febre amarela: 17DD no Brasil e 17D-204 no resto do mundo. A diferença entre elas é que a cepa 17DD possui 81 passagens a mais (Galler e cols., 2001).

Em 1925, a Fundação Rockefeller criou um Comitê de Febre Amarela para o oeste da África, para verificar se esta doença era similar àquelas nas Américas e se campanhas de controle, como aquelas realizadas no Brasil no início do século passado, seriam eficazes na África. Foi notável que o vírus africano era similar ao americano (Sawyer e cols., 1930), e o sucesso destas investigações também veio de sua capacidade de infectar várias espécies de macaco com o vírus da febre amarela. Assim, em 1927, uma cepa do YFV foi isolada, a qual mais tarde resultou na vacina usada para imunização humana: a cepa Asibi (Stokes e cols., 1928) isolada de um africano jovem, chamado Asibi, por passagens em macacos Rhesus (*Macaca mulatta*).

Em 1935, a cepa Asibi foi adaptada para o crescimento em tecido embrionário de camundongos (Lloyd e cols., 1936). Após 17 passagens, o vírus, nomeado 17D, foi cultivado até a passagem 58 em tecido embrionário de galinha e depois disso, até a passagem 114, somente em tecido embrionário de galinha denervado. Nesta época, verificou-se uma redução acentuada no viscerotrópico e neurotrópico viral quando o vírus foi injetado intracerebralmente em macacos (Theiler & Smith, 1937a). Além disso, estes vírus foram subcultivados até passagens 227 e 229, que foram usados em 8 voluntários (Theiler & Smith, 1937b) com resultados satisfatórios, como

mostrado pela ausência de reações adversas e soroconversão para febre amarela dentro de duas semanas. A imunização em larga escala foi então realizada no Brasil (Smith e cols., 1938; Soper & Smith, 1938).

A febre amarela 17D é uma vacina viral atenuada, segura e eficaz, preparada a partir de embriões de galinha infectados sob os padrões desenvolvidos pela Organização Mundial de Saúde (Lindenbach & Rice, 2001). A imunidade ocorre em cerca de 95% dos vacinados dentro de 10 dias. Pela proposta do certificado internacional, a imunização é válida por 10 anos, mas vários estudos têm mostrado persistência dos anticorpos por mais de 30 anos (Lindenbach & Rice, 2001). Muitos países da América do Sul conduzem campanhas de vacinação e uma grande cobertura da vacina em áreas enzoóticas tem limitado a incidência de doenças humanas.

Assim, apesar do relativo sucesso inicial no desenvolvimento de uma vacina de vírus atenuado para a febre amarela há mais de 50 anos, além de amplos estudos epidemiológicos, os flavivírus permaneceram até muito recentemente entre os mais pobremente caracterizados dos vírus de ARN que infectam humanos. Eles são os menores dos vírus envelopados (40-60 nm), mas compreendem um dos maiores grupos (cerca de 70 espécies), incluindo muitas espécies patogênicas para humanos e animais domésticos e selvagens (Lindenbach & Rice, 2001).

Estudos comparativos das cepas selvagens e variantes vacinais indicaram somente 13 substituições nos aminoácidos, sendo 5 deles localizados na proteína de envelope (Duarte dos Santos e cols., 1995), o que pode estar associado com a atenuação. Simulação computacional do enovelamento e da estrutura secundária do ARN viral derivado da região 3' não-codificante tem mostrado diferenças entre as cepas atenuada e virulenta, que podem ser de importância funcional (Proutski e

cols., 1997). Contudo, apesar de muitos estudos, o conhecimento dos fatores virais que implicam na atenuação ainda está incompleto.

Os vírus vacinais são testados em macacos rhesus para ausência de neurotropismo e efeitos clínicos, e para garantir que alguma viremia resultante seja baixa. Desde o declínio dos programas de controle dos mosquitos na década de 80, a vacina 17D tem sido o elemento chave no controle da febre amarela. A vacina não é recomendada para crianças menores de 9 meses devido à grande incidência de neurotropismo. Em 1994, uma cepa isolada de um caso fatal de encefalite associada à vacina apresentou diferenças na sequência quando comparada ao vírus vacinal, e foi associada com o aumento da virulência para camundongos e macacos (Jennings e cols., 1994).

Apesar disso, o uso da vacinação 17D permanece altamente aconselhável para moradores e turistas de áreas endêmicas e epidêmicas. Contudo, esses três relatos levantam questões relevantes sobre os mecanismos de atenuação do vírus da febre amarela que precisam ser urgentemente investigados.

### ***Vacinas atenuadas e inativadas e o problema atual da vacina contra Febre Amarela***

O princípio da vacina de vírus atenuado é que o patógeno é suficientemente deficiente, sendo incapaz de provocar doença. As maiores preocupações no desenvolvimento de vacinas atenuadas são o grau de atenuação e o potencial para reversão da virulência. Utilizando a tecnologia convencional, a atenuação é realizada por passagens do agente *in vitro*, e os variantes são selecionados pela sua virulência reduzida.



Uma vez que o agente deve se replicar *in vivo* com o objetivo de induzir uma resposta imune efetiva, a super-atenuação limitaria a replicação, e a magnitude e a qualidade da resposta imune não seriam adequadas para fornecer proteção contra o vírus selvagem. Em contraste, a baixa atenuação resultaria em doença clínica. Então, existe um fino balanço entre a atenuação de magnitude suficiente para reduzir os sinais clínicos e a super-atenuação, que limitaria a eficiência da vacina (Babiuk e cols., 2002).

Infelizmente, esta maneira de abordar é puramente empírica, já que os genes podem ser alterados como resultado de mutações, o que leva a dois problemas. Primeiro, cada mutante deve ser testado *in vivo* para avaliar se seu nível de atenuação é suficiente para não causar doença, e ainda assim ser capaz de estimular a imunidade e a memória. Segundo, uma vez que a atenuação ocorre ao acaso e ela não é caracterizada, existe a possibilidade do agente voltar a mutar e reverter a virulência (Babiuk e cols., 2002).

Assim, apesar destas vacinas serem geralmente muito eficientes, existe uma preocupação em relação ao seu potencial satisfatório. Isto é o caso de alguns indivíduos que possam estar parcialmente imunossuprimidos devido ao estresse ou outros fatores que possam torná-los susceptíveis à vacina atenuada. Algumas destas vacinas não podem ser usadas em grávidas, já que podem induzir aborto (Straub, 1990). É por esta razão que algumas companhias, produtores e países não são favoráveis às vacinas atenuadas.

Se a estabilidade genética para estas vacinas fosse bem controlada, elas seriam consideradas melhores que as vacinas inativadas, uma vez que elas induzem uma ampla resposta imune (celular e humoral), similar àquela induzida pela infecção natural. Outra vantagem da vacina é que os vírus se replicam normalmente no

hospedeiro e isto geralmente induz uma maior duração da imunidade. Existem também desvantagens, como a presença de contaminantes estranhos aos vírus, já que a vacina é crescida em cultura de tecido (Babiuk e cols., 2002).

Recentemente, sete casos associados à vacina, sendo seis fatais, têm desafiado a reputação da vacina 17D contra a febre amarela, que por mais de 50 anos foi quase além da censura: dois foram brasileiros (Vasconcelos e cols., 2001), quatro foram turistas norte-americanos (Martin e cols., 2001), e um foi um turista australiano (Chan e cols., 2001). Manifestações clínicas diferem entre os jovens pacientes brasileiros (inoculados com a vacina 17DD) e os turistas mais velhos, vacinados com a 17D-204. A forma de infecção nos brasileiros se assemelhou com a febre amarela clássica, enquanto os pacientes mais idosos apresentaram febre e falência multisistêmica, que pareceu ser uma nova síndrome pós-vacinação.

A associação de reações relacionadas à vacina com altos títulos de anticorpos neutralizantes (Jennings e cols., 1994) sugerem que os mecanismos imunes, diferentemente da imunidade humoral, poderiam ser importantes. Assim, se a co-infecção com outros flavivírus ocorresse nestas raras situações, a oportunidade para a recombinação seria muito maior.

Uma maneira de resolver o problema da segurança e reversão da virulência é o uso de vacinas inativadas, que são produzidas pela inativação dos agentes infecciosos, de maneira que este não se replica no hospedeiro e não altera a imunogenicidade das proteínas protetoras. A maior desvantagem das vacinas inativadas é que elas não são muito imunogênicas e, portanto, necessitam ser combinadas a fortes adjuvantes para melhorar sua eficácia. E apesar de existir uma constante busca por novos adjuvantes, somente poucos têm sua eficiência

comprovada, e muitos deles são caros e freqüentemente levam a reações colaterais adversas (Babiuk e cols., 2002).

As vacinas inativadas consistem de agentes íntegros, que tenham sido mortos por aquecimento ou por substâncias químicas (como é o caso da vacina inativada contra a poliomielite), ou são simplesmente a parte importante do agente infeccioso que promove resposta através do sistema imune (como na vacina contra hepatite B). Ao contrário das vacinas atenuadas, as vacinas inativadas não são capazes de se replicar e, portanto, não causam nem os casos brandos da doença, porém sua presença promove uma resposta rápida do sistema imune.

Entretanto, estas vacinas causam uma resposta relativamente fraca, de maneira que a vacinação deve ser repetida. Diferente das vacinas atenuadas, as vacinas inativadas são seguras para as pessoas que têm seu sistema imune enfraquecido, para mulheres grávidas e para crianças com menos de um ano. Os efeitos colaterais geralmente são apresentados na forma de dores apenas onde a vacina foi injetada e, possivelmente, alguma febre breve após a vacinação.

## 1.6) Efeito da Alta Pressão Hidrostática

Recentes estudos têm emergido sobre o uso da alta pressão hidrostática para tentar revelar estados intermediários na via de montagem e desmontagem de vários vírus, proteínas multiméricas e complexos proteína-ácido nucléico, endereçando muitas questões de reconhecimento macromolecular (Silva e cols., 1996). Além disso, vários estudos têm mostrado a importância de comparar complexos protéicos e integrar informações sobre estrutura, dinâmica e energética (Weber, 1992; Silva e cols., 2001).

A alta pressão pode promover eficientemente a dissociação tanto de proteínas oligoméricas (Silva & Weber, 1993; Robinson & Sligar, 1995), como de estruturas virais (Silva e cols., 1996). Ela tem uma propriedade única, onde a perturbação das estruturas macromoleculares em solução depende exclusivamente da variação de volume do processo de dissociação/desnaturação.

A perturbação por pressão pode produzir novas informações acerca da estabilidade, volume e empacotamento de macromoléculas em uma extensa variedade de fenômenos biológicos, e tem sido particularmente útil na investigação de transições conformacionais em proteínas (Jonas & Jonas, 1994; Heremans & Smeller, 1998; Desai e cols., 1999). Em geral, a pressão mantém o conjunto de estruturas secundárias, mas é desfavorável às interações hidrofóbicas, que são predominantemente responsáveis pela manutenção da estrutura terciária de uma proteína (Silva e cols., 1996; Mozhaev e cols., 1996). A variação de volume negativa que ocorre com a dissociação ou desenovelamento protéico procede integralmente de interações mais íntimas entre a cadeia polipeptídica e a água. Assim, a pressão desestabiliza interações hidrofóbicas e eletrostáticas, além de eliminar as cavidades existentes (Silva e cols., 1996; Frye & Royer, 1998; Hummer e cols., 1998; Silva e cols., 2001).

Além disso, vários estudos têm descrito a dissociação/desnaturação de proteínas pelo frio (Privalov, 1990; Foguel e cols., 1992; Foguel & Silva, 1994; Foguel & Weber, 1995; Nash & Jonas, 1997). Contudo, este processo ainda não é completamente entendido. As alterações induzidas pelo frio em uma proteína são geralmente atribuídas ao rompimento de interações hidrofóbicas (Privalov, 1990). Para isto, foi proposto que as proteínas perdem a estabilidade quando sujeitas a

baixa temperatura devido à substituição de pontes fracas das interações proteína-proteína pelas mais fortes interações proteína-água (Weber, 1993).

Um extenso número de proteínas têm se mostrado sensíveis ao frio (Privalov, 1990), porém, em sua maioria, a desnaturação só ocorre em temperaturas negativas, onde a água não mais se encontra no estado líquido. Para resolver este problema, o uso combinado da alta pressão e baixas temperaturas tem sido amplamente utilizado em nosso laboratório, uma vez a pressão é capaz de deslocar o ponto de congelamento da água para cerca de  $-20^{\circ}\text{C}$  a 2,5 kbar. Isto permite que os experimentos de desnaturação protéica, promovida pelo frio, sejam acompanhados ainda em fase aquosa (Foguel e cols., 1992; Foguel & Silva, 1994; Foguel & Weber, 1995; Oliveira e cols., 1999a, b). Esta metodologia também favoreceu a abertura de novas portas para o estudo da dissociação de diversas proteínas ou arranjos protéicos que se mostraram resistentes ao emprego isolado da alta pressão.

Recentemente, a pressão hidrostática tem sido usada para estudar a montagem em vírus icosaédricos, com o objetivo de entender como a plasticidade requerida para a perfeita montagem de uma partícula viral está codificada dentro da conformação enovelada de uma subunidade protéica do capsídeo (Silva & Weber, 1988; Foguel e cols., 1995; Da Poian e cols., 1995; Gaspar e cols., 1997; Oliveira e cols., 1999a). Esta combinação dos estudos termodinâmico e estrutural tem sido utilizada para tentar identificar as regras gerais que governam a montagem viral. Em linhas gerais, as proteínas do capsídeo isoladas (monômeros ou dímeros) são muito menos estáveis frente aos efeitos da pressão do que as partículas icosaédricas montadas (Silva e cols., 1996).

As relações estruturais entre vírus são convenientemente discutidas pela comparação entre os que possuem estratégias de replicação similares. Os vírus oferecem um sistema bem definido para o estudo da biologia estrutural e são sistemas experimentais acessíveis para a investigação dos mecanismos detalhados associados aos eventos de montagem e maturação, e às mudanças na subunidade estrutural, que medeiam a translocação do ARN através das membranas (Johnson, 1996).

Em adição às informações básicas acerca da montagem e desmontagem dos vírus, o uso da pressão para inativar vírus tem sido avaliado com a finalidade de duas aplicações potenciais: desenvolvimento de vacinas e esterilização viral (Silva e cols., 1992; Pontes e cols., 1997). Para estas abordagens estruturais, os picornavírus são considerados excelentes modelos para o estudo das interações proteína-proteína, proteína-ácido nucléico e montagem viral (Rossmann & Johnson, 1989; Oliveira e cols., 1999a). E agora existe um grande interesse em desenvolver uma vacina de vírus inativado contra alguns flavivírus que vem causando grandes epidemias em várias partes do mundo.

## 2. OBJETIVOS

### ***Objetivos principais***

- ✓ Identificar a condição ideal de pressão e tempo que leva à completa inativação do Vírus da Febre Amarela, avaliando a atividade biológica das partículas através de ensaios de infecciosidade.
- ✓ Investigar de que forma as mudanças estruturais promovidas pela alta pressão estariam afetando a infecciosidade das partículas, monitorando as alterações conformacionais ocasionadas nas proteínas do envelope viral através de medidas espectroscópicas, como fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano e fluorescência de sondas extrínsecas, e medidas de espalhamento de luz das amostras.

### ***Objetivos específicos***

- ✓ Estudar a estabilidade do Vírus da Febre Amarela (YFV) frente a agentes desnaturantes químicos (uréia) e físicos (alta pressão, temperatura e pH).
- ✓ Avaliar a atividade biológica das partículas inativadas por pressão através de ensaios de infecciosidade.
- ✓ Avaliar o grau de integridade das partículas inativadas, realizando gel filtração em Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC).
- ✓ Verificar as mudanças conformacionais do envelope viral através de medidas espectroscópicas utilizando a fluorescência extrínseca das sondas bis-ANS e LAURDAN.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1) Reagentes**

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. A água destilada foi filtrada e deionizada através de um sistema de purificação de água Millipore a uma resistência > 10 Mohm. Os tampões e a uréia utilizados são obtidos da Sigma Chemical Co. As sondas fluorescentes foram obtidas da Molecular Probes Inc.

#### **3.2) Cultura de Células Vero**

As células Vero (fibroblasto de rim de macaco verde) foram necessárias para a propagação do vírus da febre amarela (YFV). As células são mantidas em monocamada e crescidas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - Sigma Chemical Co.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), além de serem mantidas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **3.3) Propagação e Purificação do YFV**

O vírus da febre amarela (cepa vacinal 17DD) foi propagado e purificado conforme previamente descrito por Kunh e cols. (2002). As células Vero foram crescidas em garrafas tipo "roller" e, após a obtenção de uma monocamada 90% confluyente, as células foram infectadas com uma baixa multiplicidade de infecção (~0.1) e mantidas a 37°C. Após 7 dias de infecção, o meio com vírus foi coletado e



clarificado por centrifugação a 10.000 rpm, por 20 min, a 4°C, em um rotor RPR 12.2. Em seguida, o sobrenadante foi incubado com 8% de polietilenoglicol 8.000 por pelo menos 3 horas a 4°C e precipitado por uma centrifugação a 10.000 rpm, por 50 min, a 4°C, no mesmo rotor. O pellet viral foi ressuspensão em um pequeno volume de tampão TNE (Tris 10 mM, NaCl 0,1 M, EDTA 1 mM) pH 7,6, aplicado em um gradiente descontínuo de tartarato de potássio e glicerol (10-40% de tartarato de potássio e 7,5-30% de glicerol) e submetido a uma ultracentrifugação de 32.000 rpm por 2 h a 4°C em um rotor SW-40 Ti.

O gradiente é coletado em frações de 500 µL, e a absorção destas frações é lida a 260 nm e 280 nm. O grau de pureza é avaliado após a realização de um gel de poliacrilamida 15%, e a concentração de proteínas é determinada através do método de Lowry (Lowry e cols., 1951). Para a realização de todos os experimentos, as amostras utilizadas são sempre dialisadas, para eliminar o tartarato e o glicerol, e concentradas muitas vezes usando filtros de centrífuga Centricon de 100 kDa de poro (Millipore). Dessa forma, acabamos por eliminar algumas impurezas que eventualmente as amostras virais possam apresentar.

### 3.4) Ensaio de Infeciosidade

Este método é utilizado com o objetivo de testar o grau de infeciosidade das partículas virais após serem submetidas a um processo de purificação e alta pressão hidrostática. Os ensaios foram realizados em placas estéreis de 6 poços (Corning) com uma monocamada semi-confluyente de células Vero. Foram realizadas diluições seriadas da ordem de  $10^1$  a  $10^{10}$ , onde 100 µL da amostra a ser avaliada são colocados em cada poço correspondente à diluição. Após o tempo de adsorção de 1

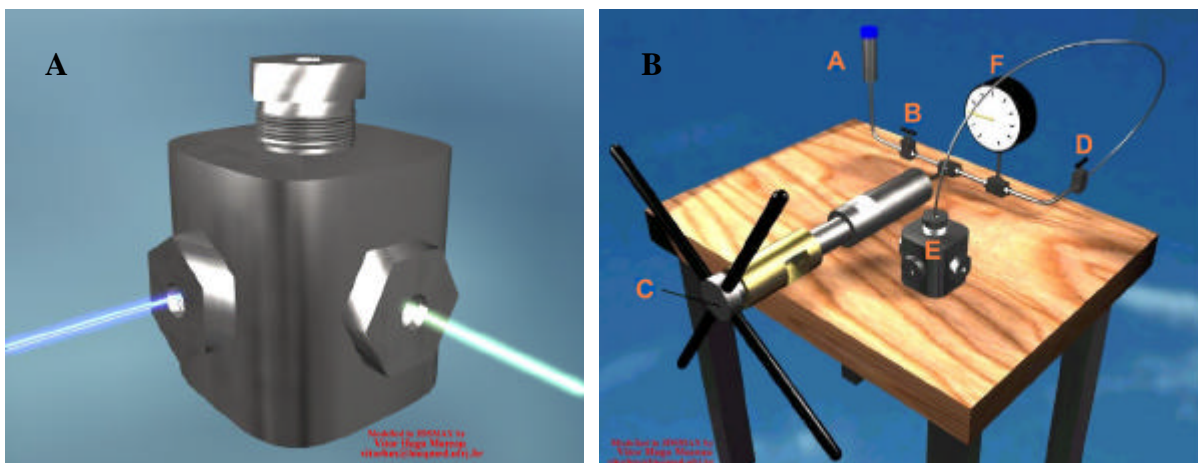
h a 37°C, são adicionados 2 mL de meio semi-sólido (DMEM a 10% de soro fetal bovino, em uma concentração final de 3% de carboxi-metil-celulose - CMC) a cada poço da placa. Após 7 dias a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>, as placas são reveladas corando-se as células com uma solução de cristal violeta 1% e formaldeído 20% por 30 min. As placas de lise são então contadas.

O título viral é expresso em unidades formadoras de placa por unidade de volume (UFP/mL). Assim, o grau de infecciosidade era avaliado através de ensaios de infecciosidade, onde quanto maior a diluição do vírus, e ainda assim sendo capaz de induzir efeito citopático, maior é o seu título. A maioria das purificações gerava amostras com títulos superiores a 10<sup>7</sup> UFP/mL e, além disso, podíamos aferir também o grau de infecciosidade das amostras submetidas a alta pressão hidrostática.

### 3.5) Pressão Hidrostática e Termodinâmica

A bomba de alta pressão (Figura 10A) foi descrita por Paladini & Weber (1981) e fabricada pela ISS Inc. (Champaign, IL). A bomba é de aço vascomax e equipada com três janelas ópticas de quartzo ou safira (Silva e cols., 1992), além de uma abertura superior por onde é colocada a cubeta de quartzo e é acoplado um tubo flexível que conecta a bomba ao gerador de pressão. Esta cubeta é fechada na sua extremidade por um tubo flexível de polietileno, que equaliza a pressão entre o meio hidrostático (etanol) e a amostra que se encontra no interior da cubeta. A bomba também suporta diferentes temperaturas pelo acoplamento de um banho-maria circulatório (Fisher Scientific). O uso de gás nitrogênio também se faz

necessário para evitar a condensação de água na superfície óptica durante os experimentos a temperaturas inferiores a 4°C.



**Figura 10. Sistema de alta pressão hidrostática.** Ilustração dos componentes do sistema de alta pressão. **(A)** Bomba de pressão e as suas janelas ópticas. **(B)** Componentes do gerador de pressão: (A) reservatório de etanol; (B) válvula que controla a saída do etanol para o gerador de pressão; (C) gerador manual de pressão; (D) válvula que controla a saída do etanol do gerador de pressão para a bomba de pressão; (E) bomba de pressão onde é colocada a amostra; (F) manômetro que afere a pressão aplicada na amostra.

Toda a bomba é preenchida com etanol absoluto, escolhido por possuir um índice de refração muito similar ao do quartzo, o que impede o desvio da luz até a amostra. A luz incidida sobre a amostra é coletada num ângulo de 90°, permitindo que o monitoramento da fluorescência emitida seja feito antes, durante e depois da aplicação da pressão.

O segundo componente do sistema de pressão é o gerador de pressão propriamente dito (Figura 10B). Ele é composto por um pistão operado manualmente, que tem por objetivo comprimir o etanol no interior da tubulação e, conseqüentemente, a amostra. Esta compressão se dá por duas válvulas que controlam o fluxo de etanol no tubo conectado à bomba. A pressão gerada no sistema é acompanhada por um manômetro.

### 3.6) Medidas Espectroscópicas

#### ***Espectroscopia de fluorescência***

Os espectros de fluorescência foram obtidos em um espectrofluorímetro modelo ISS K2 (ISS Inc., Champaign, IL). No caso dos experimentos com alta pressão, as amostras eram incubadas durante 10 minutos em cada pressão. Nas curvas de uréia as amostras foram também incubadas por 10 minutos em cada concentração. A espectroscopia de fluorescência permite estudar a dinâmica de proteínas ou mesmo de complexos protéicos, uma vez que tanto a fluorescência quanto a dinâmica ocorrem em escalas de tempo muito próximas. O monitoramento de estruturas virais por espectroscopia de fluorescência (Lakowicz, 1983) permite acompanhar as mudanças na conformação destas estruturas, uma vez que essa fluorescência é oriunda de aminoácidos aromáticos presentes nessas proteínas.

Em nosso caso, acompanhamos a emissão de fluorescência dos resíduos de triptofano presentes na estrutura do YFV, que são aminoácidos hidrofóbicos bastante sensíveis a qualquer mudança de polaridade do meio (Lakowicz, 1983). Sendo assim, a mudança na emissão de fluorescência dos triptofanos quando excitados em um determinado comprimento de onda reflete nada mais que as mudanças de polaridade do meio em que eles se encontram (Lakowicz, 1983). Podemos acompanhar então a desnaturação ou dissociação protéica quando as amostras são submetidas a perturbações, químicas ou físicas, pela mudança no espectro de emissão de fluorescência do triptofano, ou seja, por mudanças no centro de massa do espectro para comprimentos de onda maiores. Em ambientes apolares,

ou seja, com pouco acesso ao solvente polar, esses resíduos emitem em comprimentos de onda menores (em torno de 320 nm) e portanto mais energéticos.

À medida que a proteína vai expondo seus triptofanos para o meio aquoso, estes passam então a emitir em comprimentos de onda maiores e menos energéticos, uma vez que parte dessa energia é gasta para ocorrer uma reorientação das moléculas do solvente.

O centro de massa espectral  $\langle u \rangle$ , que é obtido pela emissão de fluorescência do triptofano, é diretamente proporcional à energia de emissão quando expresso em números de onda e pode ser calculado conforme a equação abaixo:

$$\langle u \rangle = \sum u_i \cdot F_i / \sum F_i \quad (4)$$

onde  $F_i$  é a fluorescência emitida em um determinado número de onda  $u_i$ , sendo o somatório realizado a partir de uma grande quantidade de valores  $F$ .

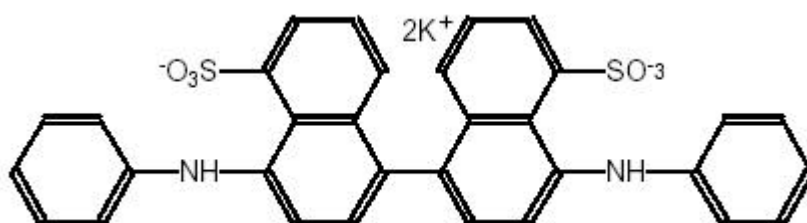
O grau de dissociação a uma pressão  $p$  ( $a_p$ ) é relacionado a  $\langle u \rangle$  pela expressão:

$$a_p = (\langle u_p \rangle - \langle u_i \rangle) / (\langle u_f \rangle - \langle u_i \rangle) \quad (5)$$

onde  $\langle u_f \rangle$  e  $\langle u_i \rangle$  são os valores do centro de massa espectral das formas final dissociada e inicial associada, respectivamente.

## **Fluorescência da sonda hidrofóbica bis-ANS**

A sonda fluorescente bis-ANS (bis 8-anilinaftaleno-1-sulfonato) (Esquema 1) (Rosen & Weber, 1969) tem a propriedade de se ligar a segmentos apolares de proteínas próximos a cargas positivas, e tem sido amplamente utilizada na determinação de estados conformacionais intermediários, nos quais a proteína perdeu grande parte da estrutura terciária, mas ainda apresenta alguns elementos de estrutura secundária (Silva e cols., 1992; Da Poian e cols., 1995). Esta sonda foi utilizada para detectar a exposição de segmentos hidrofóbicos das partículas virais submetidas a alta pressão.

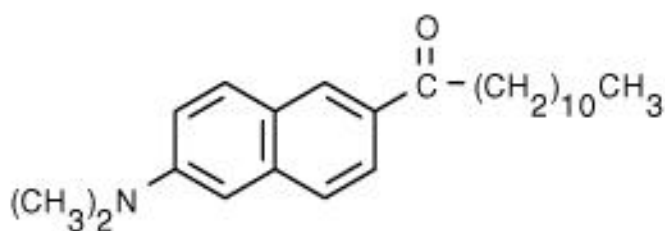


**Esquema 1. Fórmula estrutural da sonda bis-ANS.**

As amostras foram incubadas com a sonda por pelo menos 1 h e excitadas em um comprimento de onda de 360 nm, e a fluorescência emitida pela sonda foi captada de 400 a 600 nm. Quando a sonda não está ligada a resíduos hidrofóbicos, a emissão de fluorescência não é significativa. Entretanto, quando os segmentos hidrofóbicos se apresentam expostos ao solvente, a ligação da sonda sofre um aumento considerável, que é refletido no aumento da sua emissão de fluorescência e, conseqüentemente, no grau de exposição dos resíduos hidrofóbicos ao solvente.

## **Fluorescência da sonda LAURDAN**

A sonda LAURDAN (2-dimethyl-amino-6-lauroylnaphthalene) (Esquema 2) pertence à família de sondas fluorescentes sensíveis à polaridade primeiramente desenhada e sintetizada por Gregorio Weber para o estudo do fenômeno de relaxação dipolar dos fluoróforos em solventes, ligados a proteínas e associados a lipídeos (Weber & Farris, 1979; Macgregor & Weber, 1986; Parasassi e cols., 1986).



**Esquema 2. Fórmula Estrutural da sonda fluorescente LAURDAN.**

O LAURDAN possui uma característica única se comparado com outras sondas fluorescentes comumente usadas para estudar a organização lateral de lipídeos em bicamadas (Parasassi & Gratton, 1995). Uma propriedade desta sonda está na capacidade de mudança na emissão espectral dependente de fase, ou seja, a emissão do LAURDAN é azul na fase lipídica ordenada, mas tende para o verde num estado de desordem dos lipídeos (Bagatolli, 2003).

Esta sonda anfífila tem sido previamente utilizada para caracterizar a formação de domínio e separação de fase em modelos de membrana usando misturas fosfolipídicas (Bagatolli & Gratton, 1999; 2000a; 2000b) ou extratos lipídicos de membranas celulares (Bagatolli e cols., 2000; Dietrich e cols., 2001a; 2001b). O LAURDAN é uma sonda fluorescente sensível ao meio, que exhibe uma mudança para o vermelho de 50 nm quando as membranas sofrem transição de fase de gel

para fluida, devido à penetração alterada da água dentro da bicamada lipídica (Parasassi e cols., 1997).

A fluorescência da sonda em água é desprezível, e não é influenciada espectroscopicamente pelas modificações na superfície, como a ligação de lipoproteína (Tricerri e cols., 2002; Bagatolli e cols., 2003). Em solventes de alta polaridade, a sonda apresenta um desvio considerável de seu espectro de emissão para comprimentos de onda menos energéticos devido a processos de relaxação dipolar (Parasassi e cols., 1991). Quando o ambiente da sonda Laurdan é uma fase fosfolipídica, sua emissão depende fortemente do grau de compactação e organização dos lipídeos. A temperaturas abaixo da transição de fase (estado gel), o máximo de emissão é em torno de 440 nm. A temperaturas acima da transição de fase (estado líquido-cristalino), o máximo sofre um desvio para o vermelho, próximo a 490 nm (Parasassi e cols., 1991; Parasassi & Gratton, 1995).

O parâmetro de fluorescência no estado estacionário conhecido como polarização generalizada (GP) relaciona quantitativamente essas mudanças espectrais, por levar em conta as intensidades de fluorescência relativa das regiões do azul e vermelho dos espectros de emissão e excitação, respectivamente (Parasassi e cols., 1991; Parasassi & Gratton, 1995). Dessa forma, GP é definido analogamente à polarização fluorescente medindo as intensidades (I) entre 400 e 460 nm e entre 470 e 530 nm:

$$GP = [I_{(400-460)} - I_{(470-530)}] / [I_{(400-460)} + I_{(470-530)}]$$

Para fosfolipídeos, um valor característico de GP é determinado para as fases gel e líquido-cristalina. Entretanto, a observação de um valor de GP intermediário entre ambos valores não necessariamente significa a coexistência de domínios



fosfolipídicos separados. O perfil dos espectros de GP de Laurdan em vesículas fosfolipídicas permite a determinação de coexistência de fase (Parasassi e cols., 1991).

Assim, os valores de GP variam de -1 (membrana mais fluida) a +1 (mais condensada) e são independentes da concentração local da sonda. O LAURDAN se distribui igualmente dentro de membranas fluidas ou condensadas e não se associa com ácidos graxos específicos (Bagatolli e cols., 2003). Portanto, os valores de GP refletem a estrutura da membrana como um todo, e não um lipídeo específico ou composição protéica (Harris e cols., 2002).

Os vírus íntegros foram marcados com a sonda fluorescente por pelo menos 1 h, e excitados em um comprimento de onda de 360 nm. A fluorescência da sonda foi varrida de 380 a 600 nm. Para o cálculo de GP, foram utilizadas as intensidades de fluorescência em 440 e 490 nm.

### 3.7) Espalhamento de Luz

A medida de espalhamento de luz visa obter elementos que levem a uma estimativa do tamanho da partícula em solução. Uma luz incide sobre a amostra e é espalhada de acordo com o tamanho da partícula, ou seja, quanto maior a partícula maior a quantidade de luz espalhada. A detecção da luz espalhada é obtida a 90°, e utilizamos um comprimento de onda de 320 nm, uma vez que nem proteínas nem ácidos nucléicos absorvem luz neste comprimento. Com o objetivo de refinar a medida de espalhamento, a detecção da luz espalhada foi obtida na faixa de 315 e 325 nm, selecionada por um monocromador, sendo assim quantificada pela área correspondente aos valores de intensidade obtidos nesta faixa.

### 3.8) Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)

A dissociação das partículas virais após um ciclo de compressão e descompressão foi monitorada por cromatografia líquida de alta resolução (High Performance Liquid Chromatography – HPLC), utilizando um equipamento modelo SP-10A/10AV da Shimadzu Corporation. A coluna de gel filtração utilizada foi a GPC 1.000 (250 X 4,6 mm de diâmetro interno e faixa de inclusão de 25.000 a 50.000.000 Da para proteínas globulares), cujo tempo de retenção é próximo de 7,15 min a um fluxo de 0,5 mL/min. A gel filtração consiste em passar uma mistura de proteínas através de uma coluna contendo uma matriz gelatinosa com pequenas esferas porosas, onde pequenas moléculas que conseguem entrar nos poros arrastam-se lentamente por dentro de sucessivos poros à medida que passam pela coluna, ao contrário das maiores, que movem-se mais rapidamente e eluem num tempo menor. O sistema foi equilibrado em tampão TNE, pH 7,6, que foi filtrado e deaerado em sistema Millipore. O fluxo empregado nos experimentos foi de 0,5 mL/min, e a eluição das amostras foi monitorada por fluorescência em 326 nm (excitação em 280 nm).

## 4. RESULTADOS

Os capsídeos de muitos vírus sofrem grandes transformações durante seu “ciclo de vida” e estas alterações estruturais são importantes para sua infecciosidade, desde sua entrada na célula à sua desmontagem. Por exemplo, no caso dos picornavírus, como o poliovírus, sua ligação ao receptor celular leva a uma alteração conformacional, resultando em uma partícula com coeficiente de sedimentação de 135S, que expõe propriedades de ligação de membrana, podendo liberar seu ARN (Fricks & Hogle, 1990).

Recentemente, o uso da alta pressão hidrostática tem se tornado uma enorme possibilidade para o desenvolvimento de vacinas inativadas, o que é bastante requisitado por muitos países que não permitem o uso de vacinas atenuadas. Assim, o uso desta técnica tem sido amplamente documentado e explorado para induzir estas alterações conformacionais em proteínas e arranjos protéicos, como é o caso dos vírus (Heremans, 1982; Silva & Weber, 1993; Jonas & Jonas, 1994; Silva e cols., 1996; Foguel e cols., 1996, 1998).

A pressão hidrostática induz a dissociação/desnaturação de proteínas, uma vez que os processos de enovelamento e associação são geralmente acompanhados por um aumento no volume (Weber, 1992; Silva e cols., 2001). Sendo assim, a alta pressão se tornou uma eficiente ferramenta para promover a dissociação de proteínas oligoméricas e para os estudos de interação proteína-ácido nucléico na montagem e estabilidade viral (Silva e cols., 1996; Mozhaev e cols., 1996). Uma vez que as interações entre os ácidos nucléicos e as proteínas são principalmente eletrostáticas, elas são desfavorecidas pela alta pressão.

No presente trabalho, nós realizamos um estudo sobre a estabilidade estrutural do Vírus da Febre Amarela (YFV) frente a alta pressão hidrostática, a fim de tentar entender como esta perturbação afeta a estrutura, a dinâmica e a infecciosidade destas partículas. As mudanças conformacionais foram monitoradas basicamente por medidas espectroscópicas, através das alterações na emissão da fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano e da fluorescência extrínseca das sondas bis-ANS e LAURDAN, e também por medidas de espalhamento de luz das amostras. Além disso, também utilizamos outros agentes desnaturantes, físicos e químicos, com a finalidade de obter mais informações acerca da estabilidade destas partículas.

### ***Desnaturação do YFV por agentes químicos e alta temperatura***

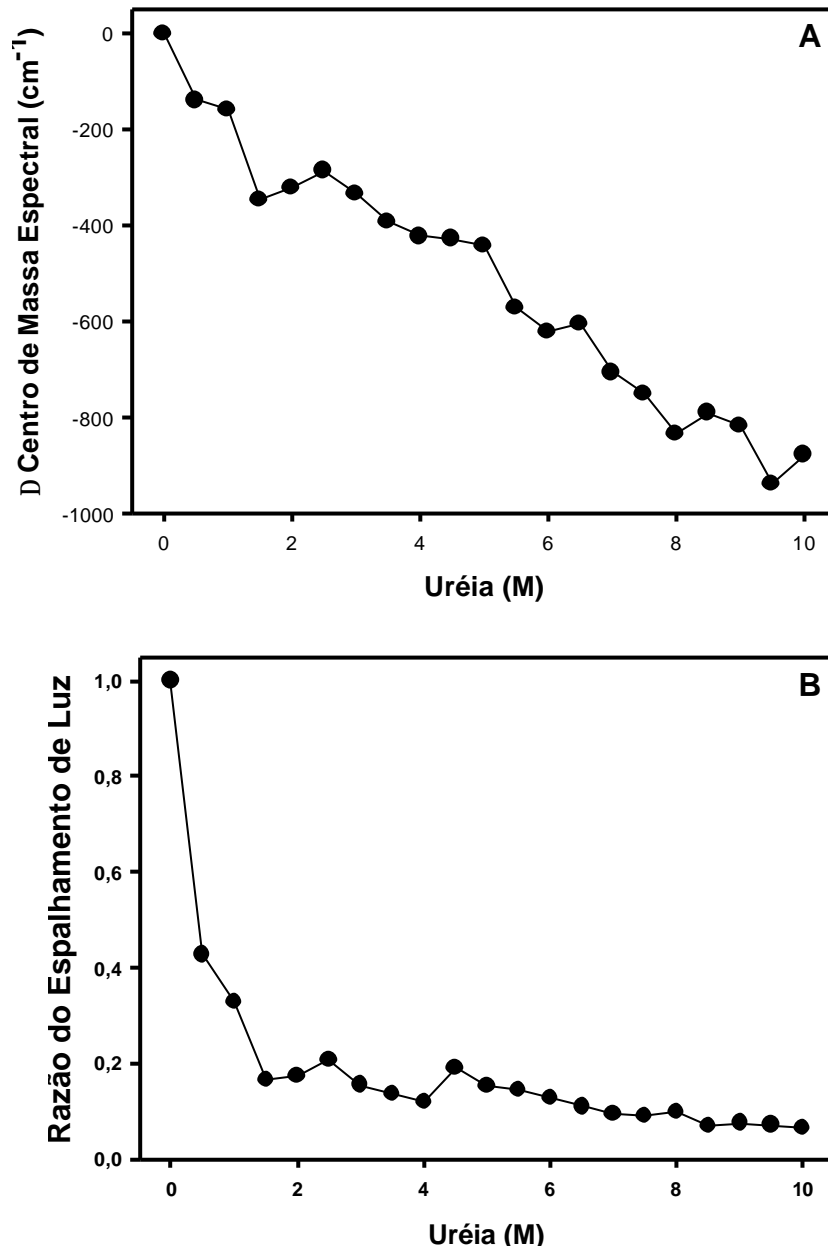
Para a realização de experimentos espectroscópicos, inicialmente tínhamos que obter as partículas virais purificadas. No entanto, os vários protocolos de purificação descritos para diversos flavivírus não se adaptavam ao Vírus da febre Amarela. Dessa forma, a partir do protocolo de purificação estabelecido por Kunh e colaboradores (2002), fizemos algumas alterações que nos permitiram uma melhoria na qualidade das partículas virais, uma vez que diminuimos a produção de partículas defectivas e, além disso, aumentamos a eficiência da produção de vírus no processo de purificação.

Sabendo-se que a uréia é um agente químico bastante eficaz na desnaturação de proteínas, decidimos primeiramente avaliar a estabilidade das partículas virais frente a este agente e, desta forma, poder obter uma dissociação

completa. Para isto, realizamos experimentos incubando o YFV com concentrações crescentes de uréia (0,5 a 10 M) (Figura 11).

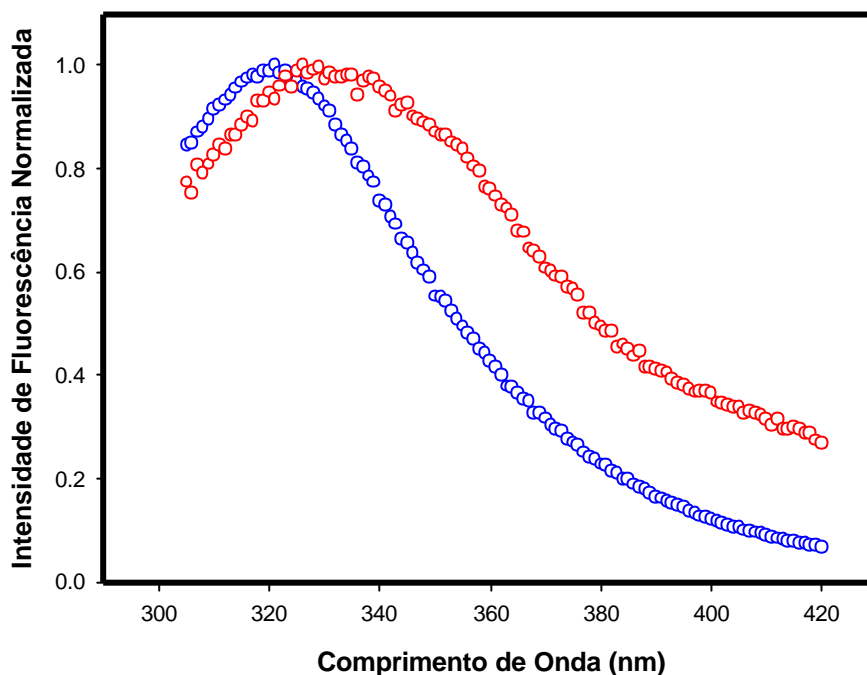
A partir destas curvas, podemos verificar que a uréia foi de fato capaz de induzir a completa dissociação/desnaturação das partículas. Podemos observar que a diminuição significativa do centro de massa espectral ocorre a partir de 2 M de uréia (Figura 11A), o que representa uma maior exposição dos resíduos de triptofano para o meio aquoso e a fluorescência passa a ser emitida em comprimentos de onda maiores e menos energéticos.

As medidas de espalhamento de luz nos dão idéia do tamanho médio das partículas virais. Assim, em solução, ao analisarmos a curva de uréia (Figura 11B), podemos verificar que 50% da dissociação ocorre logo na primeira adição, de 0,5 M de uréia, e que em 2 M, onde a desnaturação ainda não foi total (Figura 11A), observamos a completa dissociação da partícula. Portanto, a dissociação das partículas de YFV é um evento anterior à desnaturação das proteínas virais e obtida de forma eficiente com uma concentração baixíssima de uréia, o que não foi observado para outros vírus envelopados (Gaspar e cols., 2001). Além disso, essa concentração de uréia já é suficiente para o vírus perder completamente sua infecciosidade (dado não mostrado).



**Figura 11. Dissociação/Desnaturação do Vírus da Febre Amarela (YFV) induzida por uréia.** A fim de verificar os efeitos da uréia e obter a desmontagem total do YFV, utilizamos concentrações crescentes de uréia (0,5 a 10 M) como mostrado nas curvas acima. O tempo de incubação em cada concentração de uréia foi de 10 min. O vírus foi diluído em tampão TNE (pH 7,6), para uma concentração final de 200 µg/mL. Em **A**, os valores do centro de massa espectral foram medidos em cada ponto. Comprimento de onda de excitação: 280 nm; emissão varrida de 305 a 420 nm. Em **B**, este efeito foi medido por espalhamento de luz. Neste caso, a amostra foi excitada a 320 nm e a emissão varrida de 315 a 325 nm. A razão do espalhamento foi calculada dividindo-se todos os valores pelo inicial. As curvas representam uma média de quatro experimentos distintos.

Os desvios do centro de massa podem ser melhor analisados quando comparamos os espectros de emissão de fluorescência normalizados das amostras virais controle (sem uréia) e a 10 M de uréia (Figura 12), e que nos permite verificar o desvio destes espectros, refletindo a exposição dos resíduos de triptofano ao meio aquoso e provável dissociação/desnaturação das partículas virais.



**Figura 12.** Espectros normalizados de emissão de fluorescência do YFV controle (azul) e 10 M de uréia (vermelho). A amostra foi excitada em 280 nm e a emissão foi medida de 305 a 420 nm.

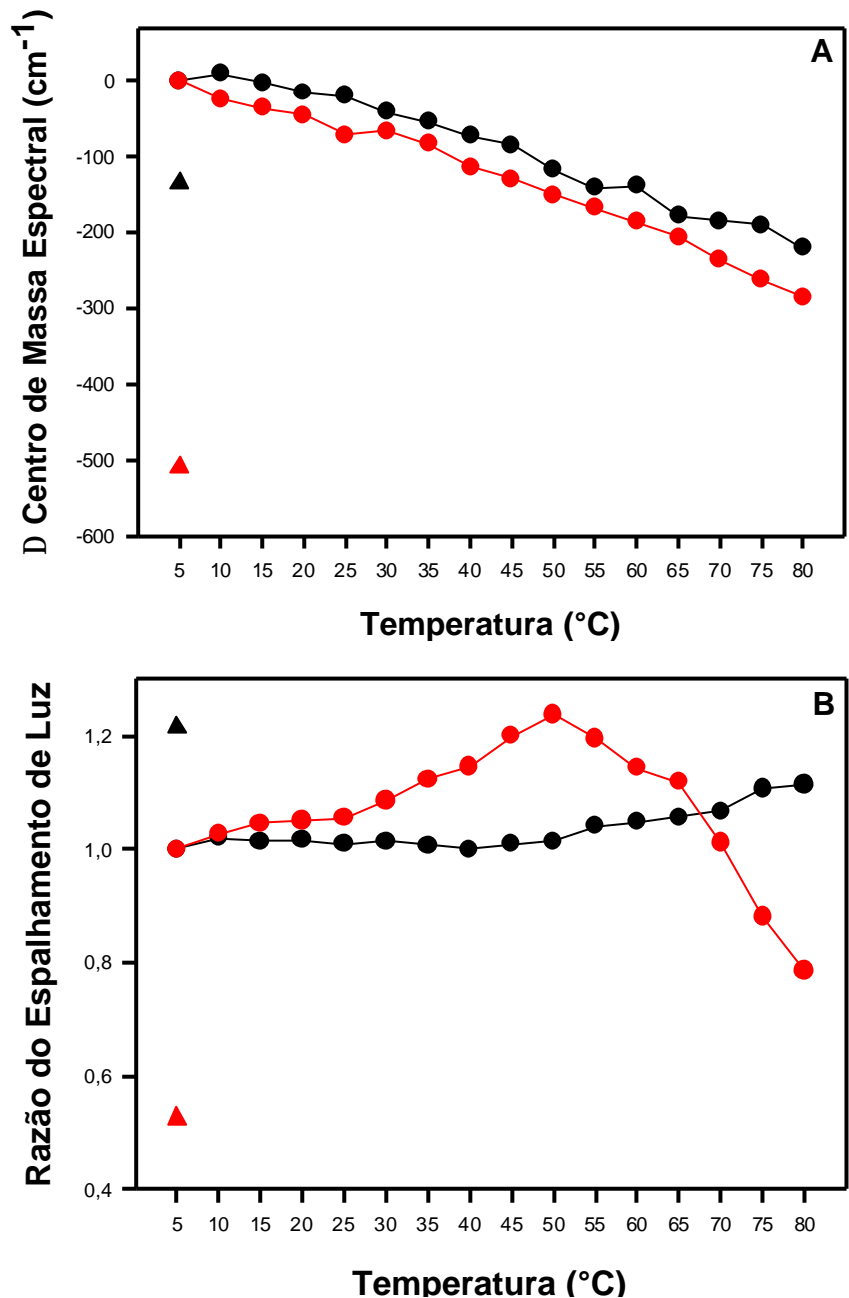
Sabendo-se que a redução do pH induz a formação de trímeros da proteína E solúvel, e que estes homotrímeros são mais estáveis que os dímeros (Stiasny e cols., 2001), resolvemos avaliar a termoestabilidade das partículas virais íntegras contendo dímeros ou trímeros da proteína E a diferentes pHs (Figura 13). As mudanças na fluorescência intrínseca do triptofano foram medidas em pH neutro e em pH ácido como forma de monitoramento da desnaturação térmica das proteínas.

Ao contrário do que prevíamos, os perfis das curvas foram similares (Figura 13A). Entretanto, o retorno da amostra incubada em pH neutro foi quase total,

enquanto que as mudanças conformacionais induzidas pelo aumento da temperatura da amostra incubada em pH 5 foram irreversíveis. Quando analisamos a razão do espalhamento de luz (Figura 13B), percebemos que as partículas virais em pH 7 não pareceram sofrer dissociação induzida por altas temperaturas até 80°C, porém os vírus em pH ácido inicialmente tiveram uma tendência a agregar, mas sofreram uma grande dissociação ao retornarem à temperatura inicial quando observamos os valores de espalhamento de luz.

Um outro resultado interessante obtido a partir destes experimentos foi o fato de que os processos de desnaturação/dissociação induzidos por alta temperatura foram bastante distintos daqueles induzidos por uréia, onde mesmo quando observamos uma variação significativa no centro de massa espectral e nos valores de espalhamento de luz no caso em que houve acidificação do meio, essa não foi a variação total obtida na presença de altas concentrações de uréia, sendo apenas um processo parcial (Figuras 11 e 13). Além disso, a desnaturação térmica não mostrou dependência de tempo (dados não mostrados).





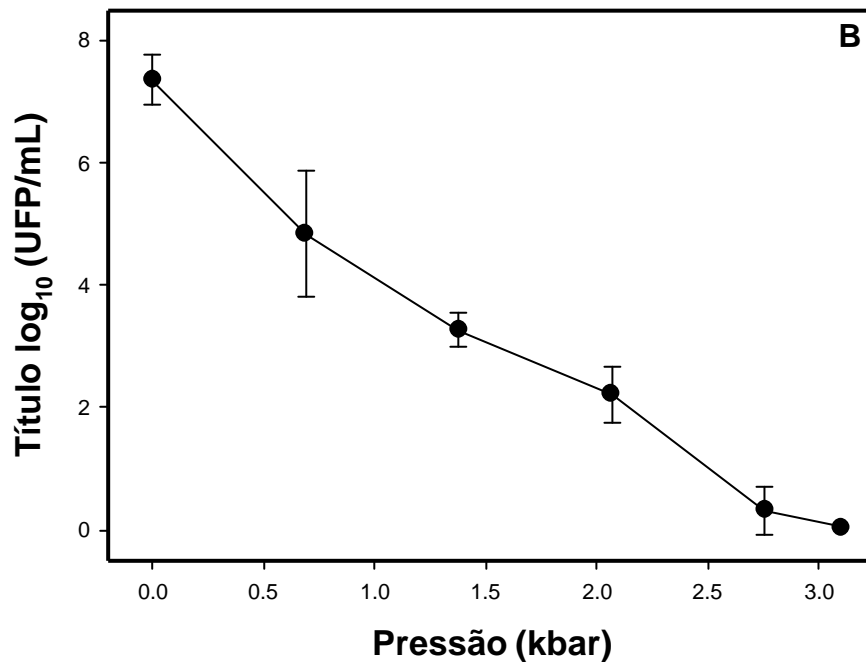
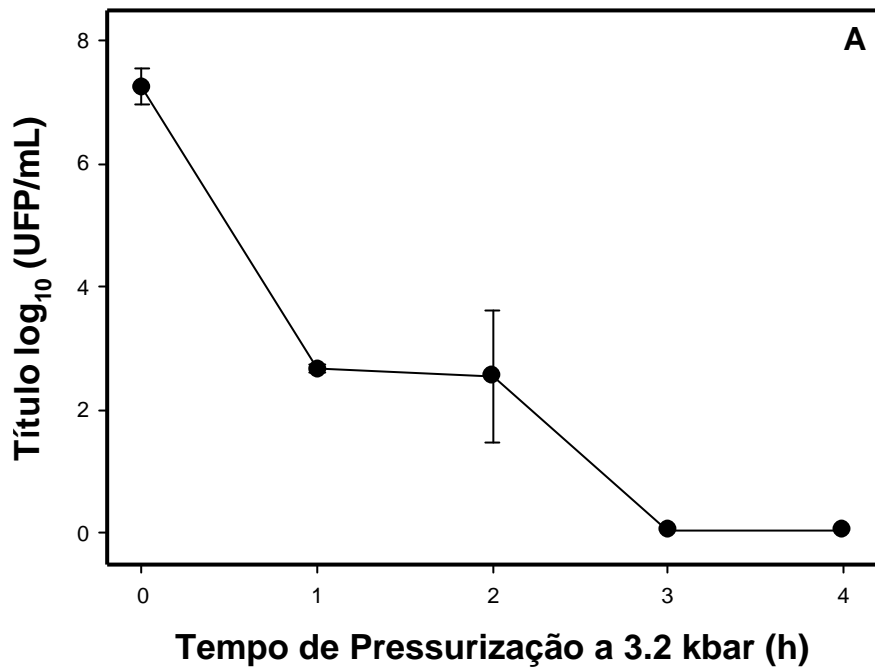
**Figura 13. Estabilidade térmica do YFV íntegro contendo dímeros ou trímeros de E, em diferentes pHs. A.** O efeito da temperatura foi monitorado através da fluorescência intrínseca do triptofano. A cada temperatura, a intensidade de fluorescência foi relativa ao ponto de 5°C de cada curva. Os trímeros foram obtidos pelo tratamento de baixo pH. O vírus foi diluído em tampão HMNE (Hepes 5 mM, Mes 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM) a pH 7 (círculos pretos) e a pH 5 (círculos vermelhos). **B.** Efeito monitorado por medidas de espalhamento de luz. Os triângulos correspondem ao retorno de cada curva. As curvas representam uma média de quatro experimentos distintos. Outras condições conforme figura 11.

### ***Inativação do YFV por alta pressão e investigação das mudanças estruturais***

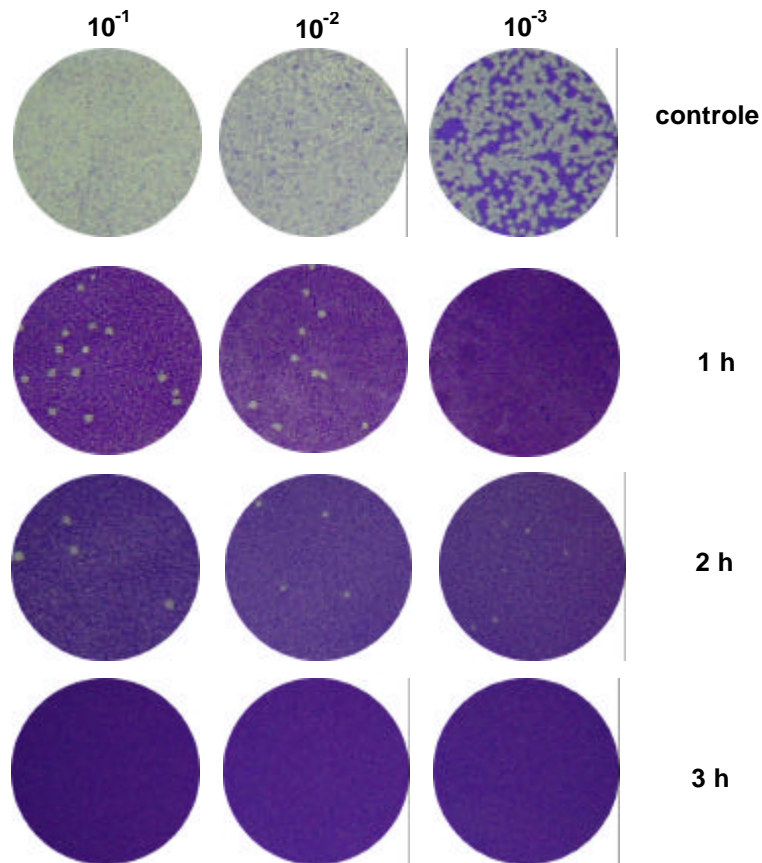
Como descrito anteriormente, a pressão é uma valiosa ferramenta capaz de perturbar a estrutura de arranjos macromoleculares, como proteínas oligoméricas e vírus (Prevelige e cols., 1994; Silva e cols., 1996; Mozhaev e cols., 1996; Oliveira e cols., 1999b), e sua aplicação desvia o equilíbrio para o estado que ocupa um menor volume, como as formas dissociadas. A combinação de abordagens estrutural e termodinâmica tem sido utilizada para tentar identificar as regras gerais que governam a montagem viral (Silva e cols., 1996, 2001).

Desta forma, com o objetivo de identificar, então, o potencial e a condição ideal de inativação do vírus da febre amarela por alta pressão, testamos uma série de condições de pressão, temperatura, tempo de incubação e número de ciclos de pressurização. Uma das inúmeras tentativas foi submeter as partículas por vários tempos de incubação a 3,2 kbar, pressão máxima permitida para o sistema de pressão que utilizamos (Figura 14A). Após incubarmos as amostras sob pressão por determinado tempo, a pressão era liberada e uma série de ensaios de infecciosidade foram realizados para avaliar a atividade biológica das partículas virais submetidas à pressão (Figura 15). Observamos que o controle manteve um título viral em torno de  $10^7$  UFP/mL, enquanto que na amostra pressurizada a 3,2 kbar por mais de 3 h não foi detectado nenhum título.

Ao realizarmos uma curva de pressurização, incubando as partículas em pressões crescentes por 3 h, observamos que a inativação completa somente é obtida a 3,2 kbar (Figura 14B). Vale a pena ressaltar que estas medidas foram realizadas com a amostra previamente purificada e também com a amostra não purificada.



**Figura 14. Curva de Titulação do YFV pressurizado.** **A.** As amostras foram pressurizadas por 1, 2, 3 e 4 horas. **B.** Os pontos equivalem à pressão aplicada por 3 horas. A pressurização foi realizada a 4°C, assim como a amostra controle. Os títulos virais foram calculados através de ensaios de infecciosidade realizados para cada amostra.

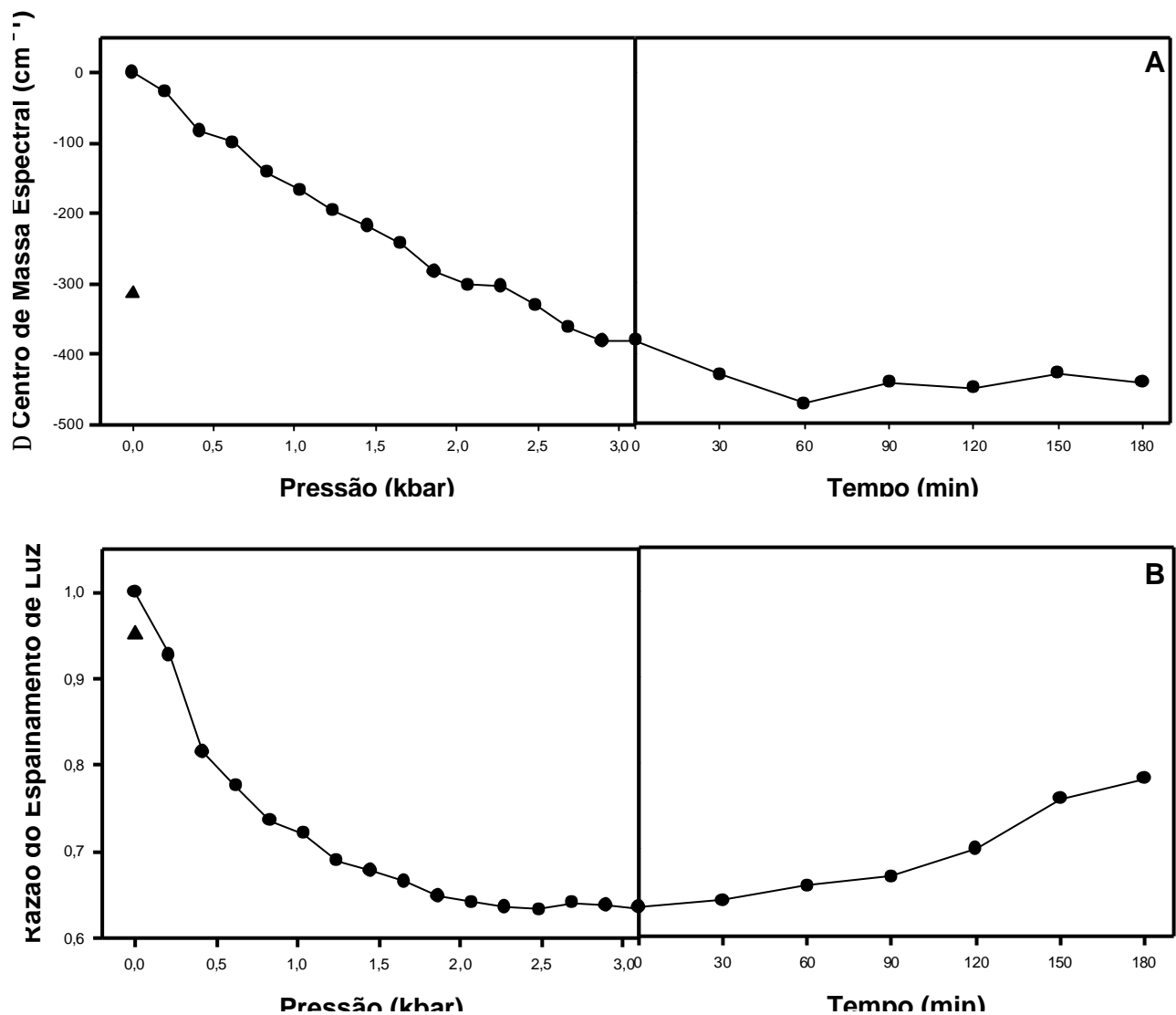


**Figura 15. Ensaio de infecciosidade do YFV pressurizado em células Vero.** Células Vero foram crescidas em placas de 6 poços e a atividade biológica das amostras virais pressurizadas a 3,2 kbar por 1, 2 e 3 h a 4°C foi avaliada. Após 7 dias de infecção, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta 1%. Cada poço mostrado representa a monocamada de células coradas com diluição viral de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , cuja concentração inicial era sempre em torno de  $10^7$  UFP/mL. No controle, não há placa porque toda monocamada foi afetada. O cálculo da contagem das placas de lise celular de cada poço revela o título viral em UFP/mL para cada amostra.

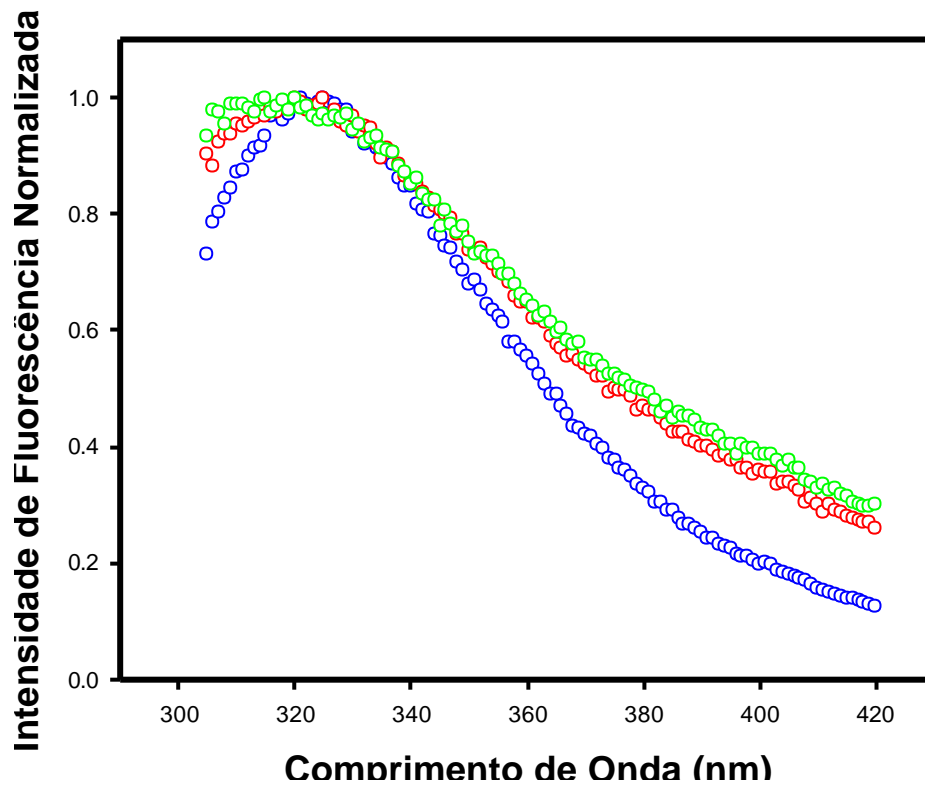
Dessa forma, decidimos investigar o efeito da pressão sobre a estabilidade do YFV quanto às possíveis mudanças estruturais. Alta pressão, ao contrário da uréia, é um agente físico capaz de induzir alterações conformacionais menos drásticas e controladas na amostra, onde a reversibilidade de seus efeitos pode ser analisada durante e imediatamente após a descompressão. Para isto, analisamos as mudanças nos valores de centro de massa espectral dos resíduos de triptofano, onde verificamos que o espectro desviado pela pressão não retornou após o processo de descompressão (Figura 17).

Além disso, conforme a pressão era aumentada, ocorria uma queda sensível nos valores de centro de massa, indicando um processo de desnaturação parcial ou apenas modificações referentes à acomodação no ambiente dos resíduos de triptofano (Figura 16A). Essas alterações parecem ser apenas parcialmente reversíveis, uma vez que ao retorno da amostra à pressão atmosférica, o valor do centro de massa não retorna completamente ao inicial, sugerindo que o ambiente final dos resíduos de triptofano é diferente daquele na forma nativa e daquele na forma sob pressão.

Observando a queda do espalhamento de luz das amostras pressurizadas (Figura 16B), podemos perceber que houve uma diminuição de cerca de 40% nestes valores a partir de 1,8 kbar, sugerindo um processo de dissociação parcial das partículas. E, apesar da curva de desnaturação (Figura 16A) não parecer ter dependência de tempo, a curva de dissociação nos mostra que os valores de espalhamento de luz voltam, sugerindo uma tendência à agregação da amostra (Figura 16B).



**Figura 16. Estabilidade do YFV à alta pressão.** O efeito da pressão no YFV foi medido a 4°C. A concentração do vírus foi de 100 µg/mL. Em **A**, o efeito foi medido pela variação do centro de massa do espectro de emissão de fluorescência dos resíduos de triptofano. Em **B**, o efeito foi medido pelo espalhamento de luz das amostras. Os triângulos correspondem aos valores de centro de massa e espalhamento dos vírus após a pressão ter sido liberada. As curvas representam uma média de quatro experimentos distintos. Outras condições, vide figura 11.

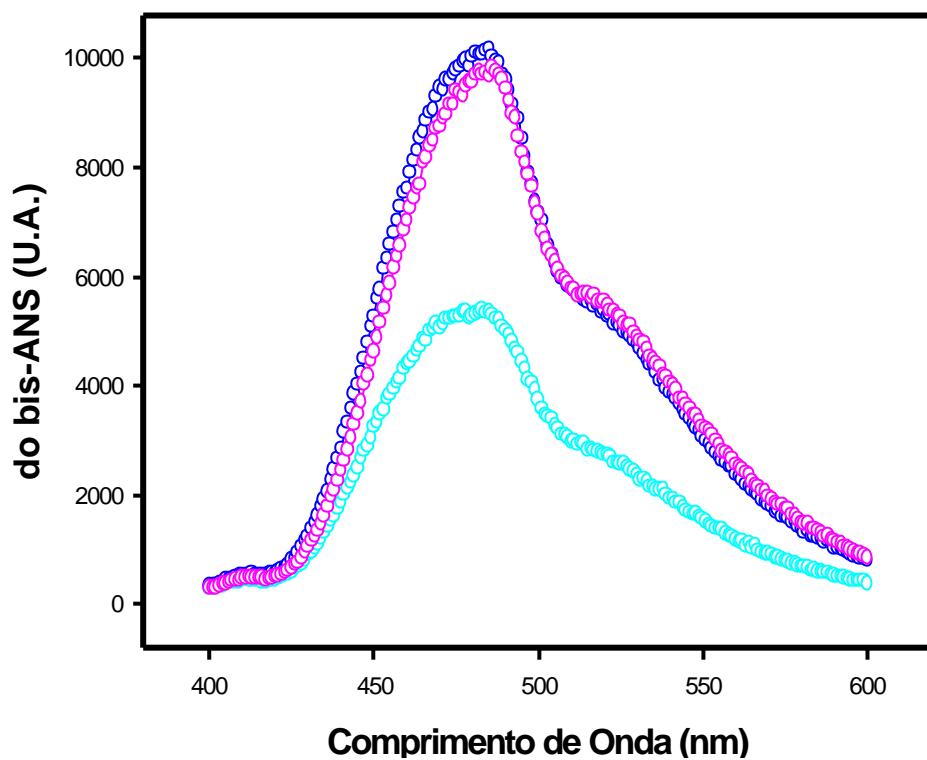


**Figura 17.** Espectros de emissão de fluorescência do triptofano da amostra viral a pressão atmosférica (azul), submetida gradativamente a 3,2 kbar (vermelho) e após a liberação da pressão (verde).

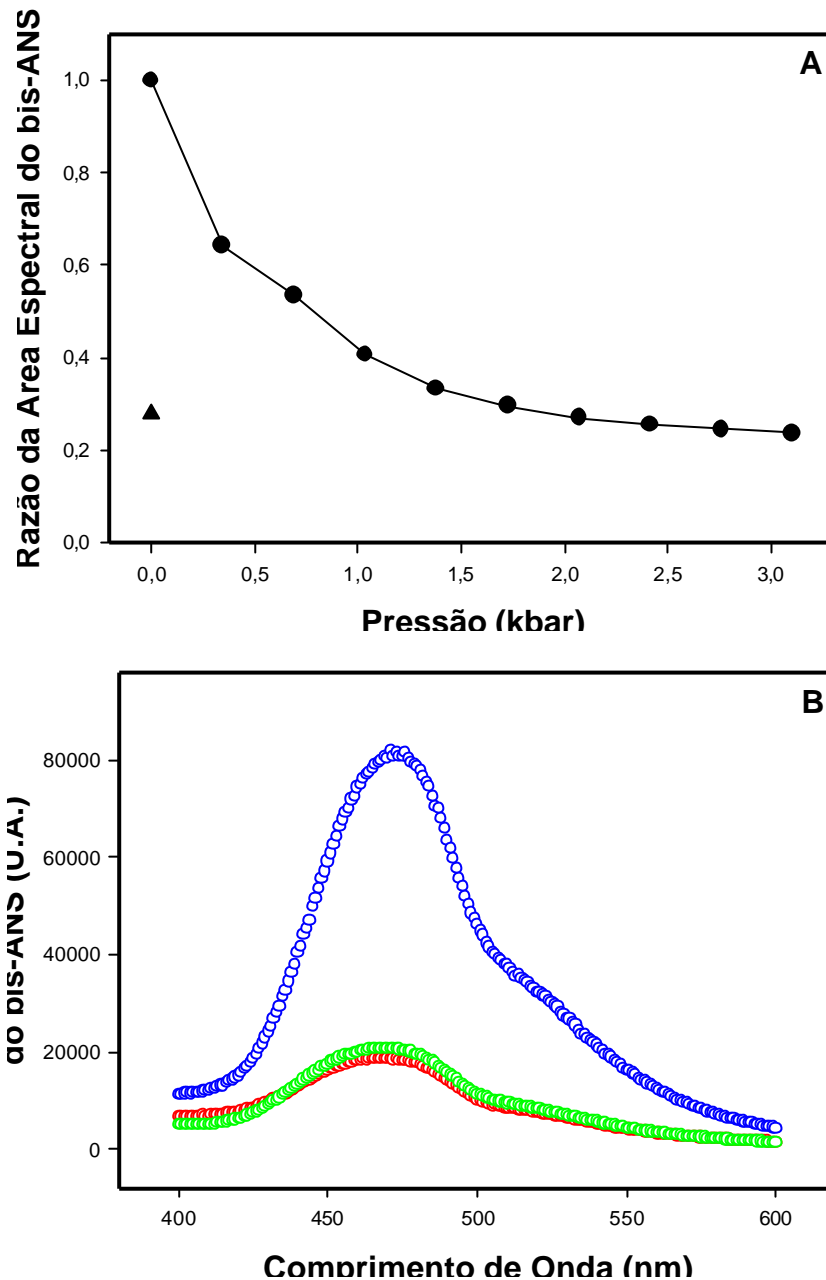
A fim de tentar buscar uma forma de estudar mais claramente como estaria sendo modificada a estrutura do YFV pela utilização de alta pressão hidrostática, realizamos experimentos utilizando a sonda fluorescente bis-ANS (Figura 19). Esta sonda possui a capacidade de se ligar de forma não covalente a segmentos hidrofóbicos de proteínas, próximos a cargas positivas, e vem sendo amplamente utilizada para detecção de estados intermediários de proteínas (Silva e cols., 1992, 2002; Bonafe e cols., 2000; Ferrão-Gonzales e cols., 2000, 2003). Bis-ANS também tem sido utilizado para acompanhar mudanças conformacionais de vírus envelopados à medida que estes atingem seu estado fusogênico ativo (Korte e Herrmann, 1994; Korte e cols., 1999; Gaspar e cols., 2002).

Inicialmente, uma titulação da sonda na presença do vírus foi realizada para determinar o perfil de ligação desta sonda às partículas virais (Figura 18). Uma observação interessante é o fato da sonda se ligar com alta afinidade às partículas nativas (Figura 19B), o que indica a presença de segmentos hidrofóbicos acessíveis à sonda, seja no envelope lipídico ou nas glicoproteínas de envelope. Dessa forma, realizamos experimentos com o YFV ligado ao bis-ANS para avaliar o que ocorreria com essa ligação. Pudemos verificar a diminuição da intensidade de fluorescência do bis-ANS à medida que o vírus foi sendo submetido gradualmente à pressão, e que a alteração foi irreversível (Figura 19A e B).





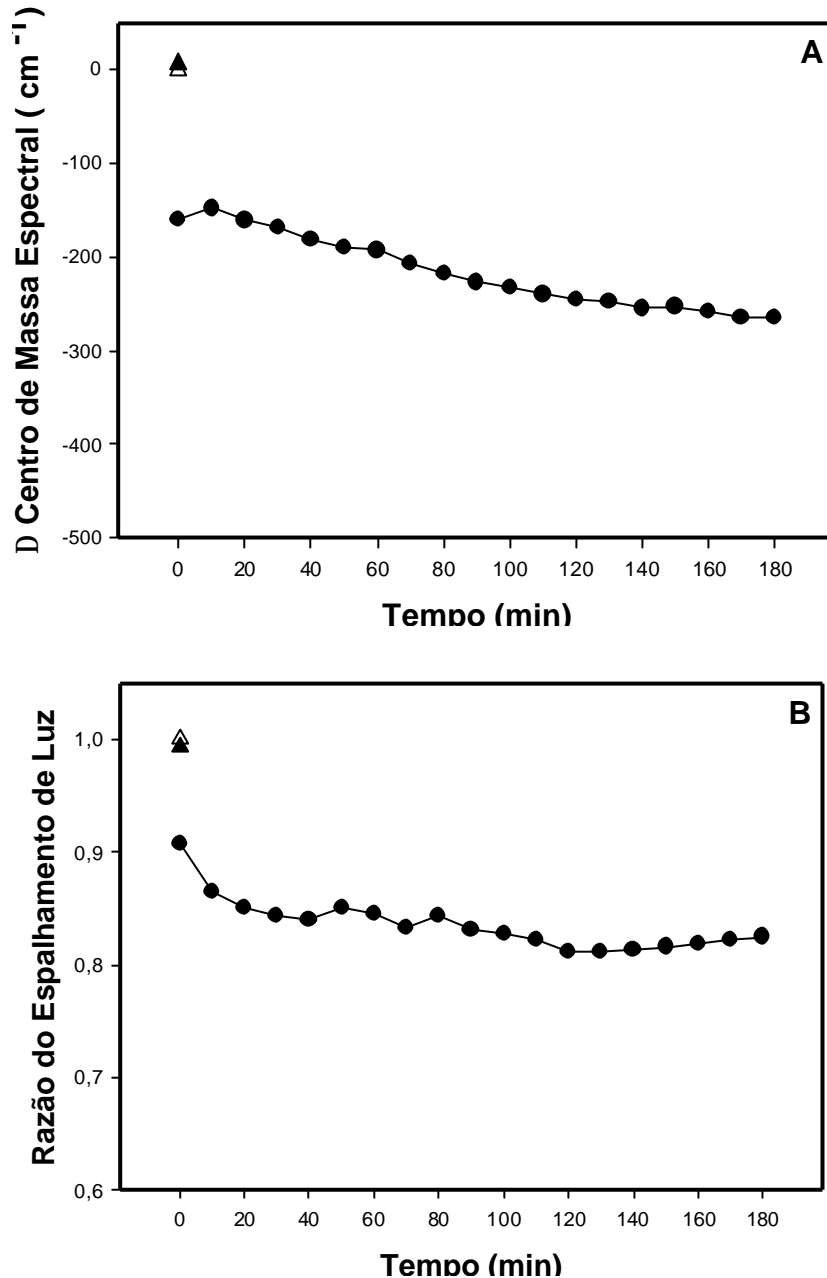
**Figura 18.** Titulação da sonda bis-ANS na presença de YFV. As concentrações utilizadas foram 1  $\mu\text{M}$  (ciano), 2  $\mu\text{M}$  (azul) e 8  $\mu\text{M}$  (rosa).



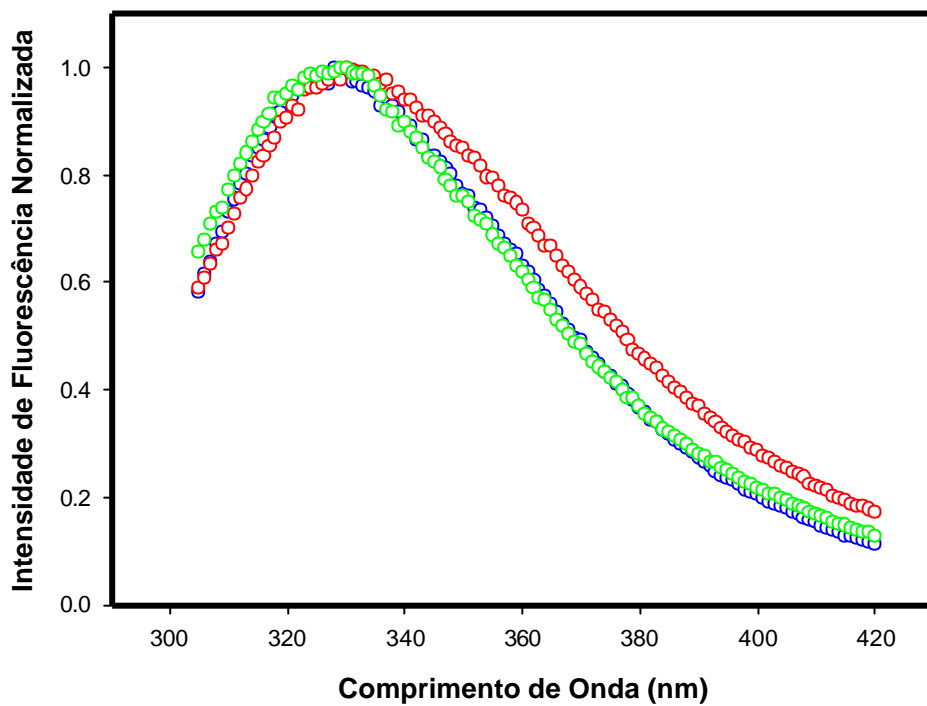
**Figura 19. Ligação da sonda hidrofóbica bis-ANS ao YFV sob aplicação gradativa da pressão. A.** As alterações estruturais induzidas pela pressão gradativa foram medidas pela emissão de fluorescência da sonda bis-ANS a uma concentração final de 2  $\mu$ M. A concentração viral utilizada foi de 100  $\mu$ g/mL. Cada ponto representa a incubação da amostra em determinada pressão por 10 min. O triângulo corresponde ao valor da área de fluorescência do bis-ANS após a liberação da pressão. **B.** Espectros de emissão de fluorescência durante o processo de pressurização. Os símbolos azuis correspondem ao vírus à pressão atmosférica, os vermelhos correspondem à amostra a 32 kbar após 3 h de pressurização, e os verdes à amostra após a liberação da pressão. O comprimento de onda de excitação foi 360 nm e a emissão foi varrida de 400 a 600 nm. A presença da sonda não alterou o perfil da variação do centro de massa nem a razão do espalhamento de luz.

Porém, algumas diferenças são visíveis quando se compara a curva de fluorescência da amostra pressurizada gradativamente a uma curva de inativação (Figuras 16 e 20), ou seja, aplicando-se pressão diretamente até 3,2 kbar e acompanhando as medidas espectroscópicas por 3 h. A variação dos valores do centro de massa neste caso é menor, menos de  $300\text{ cm}^{-1}$ , o que representa 1/3 da desnaturação total ocasionada pela presença de uréia (Figura 11). Entretanto, tal variação, apesar de parecer pouco significativa, foi suficiente pra inativar as partículas virais quando analisamos os resultados dos ensaios de infecciosidade (Figuras 14 e 20A).

Além disso, ainda comparando a curva de estabilidade (Figura 16B) e de inativação (Figura 20B), podemos observar que a razão do espalhamento de luz também foi menor, cerca de 20%, metade do observado na curva de aplicação gradativa da pressão, e que se manteve praticamente constante durante todo o tempo de inativação. Ainda, ao contrário das curvas anteriores (Figura 16), após a liberação da pressão, a alteração parece ter sido completamente reversível, como analisado também através do espectro de emissão de fluorescência (Figura 21).



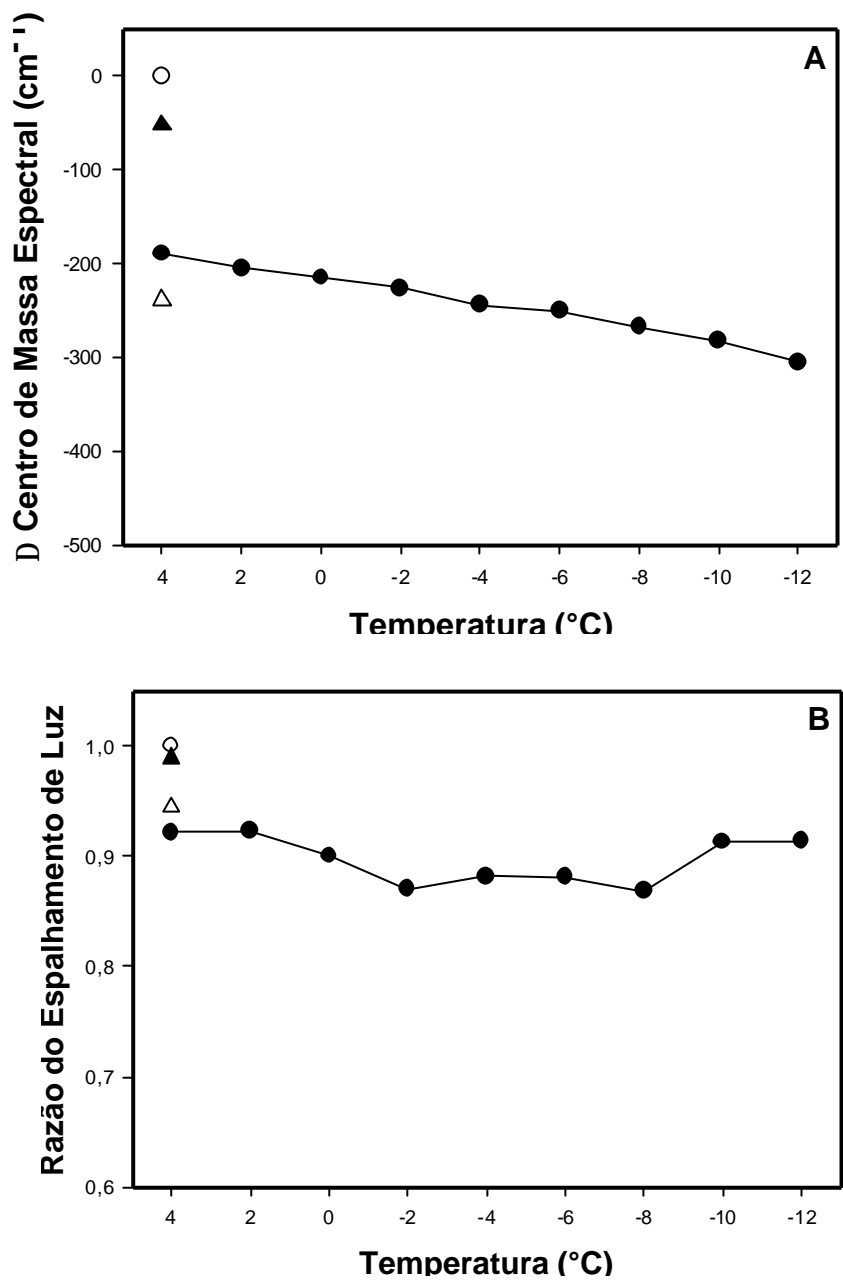
**Figura 20. Mudanças estruturais durante a curva de inativação por pressão do YFV.** As alterações induzidas pela pressão a 3.2 kbar sobre o YFV foram medidas a 4°C em função do tempo de incubação necessário para a inativação (3 h). A concentração do vírus foi de 100 µg/mL. Em **A**, o efeito foi medido pelo centro de massa do espectro de emissão de fluorescência do triptofano. Em **B**, o efeito foi medido por espalhamento de luz. Os triângulos abertos correspondem ao vírus à pressão atmosférica e os triângulos cheios ao vírus após a pressão ter sido liberada. As curvas representam uma média de dez experimentos distintos. Outras condições como na figura 11.



**Figura 21.** Espectros de emissão de fluorescência da amostra viral à pressão atmosférica (azul), submetida diretamente à pressão de 3,2 kbar por 3 h (vermelho) e após a liberação da pressão (verde).

Estudos prévios mostram que a redução da temperatura facilita a dissociação e a desnaturação induzida por pressão de diversas proteínas e agregados macromoleculares (Foguel & Weber, 1995; Zhang e cols., 1995; Silva e cols., 1996; Nash & Jonas, 1997; Oliveira e cols., 1999a). Além disso, a pressão é capaz de deslocar o ponto de congelamento da água para temperaturas próximas a  $-20^{\circ}\text{C}$  (a 2,5 kbar), o que nos permite estudar o efeito da temperatura sobre a estabilidade viral em meio aquoso.

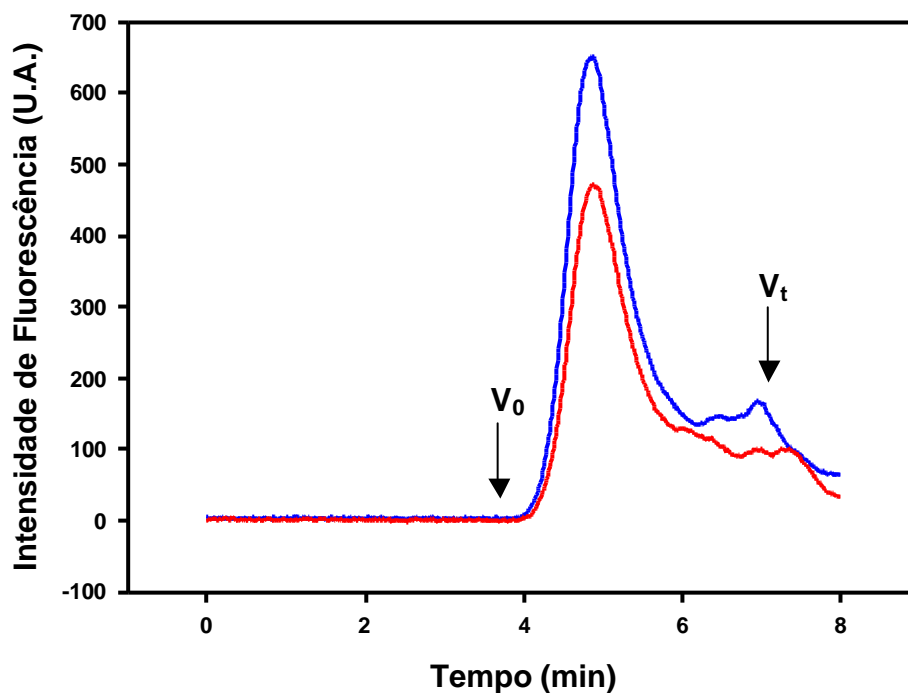
Assim, os efeitos combinados da alta pressão e baixa temperatura sobre o YFV foram investigados. Avaliando as mudanças na emissão de fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano, podemos perceber que a queda na variação do centro de massa foi similar à curva de inativação do YFV, e que o retorno também foi praticamente reversível (Figura 22A). Alterações similares também ocorrem ao analisarmos os valores de espalhamento de luz, ocorrendo cerca de 15% de dissociação da partícula (Figura 22B).



**Figura 22. Curva de inativação do YFV em função da temperatura e do tempo.** As alterações induzidas pela pressão a 3,2 kbar sobre o YFV foram medidas baixando-se a temperatura gradativamente até -12°C em função do tempo de inativação (3 h). A concentração do vírus foi de 100 µg/mL. Cada ponto representa a amostra incubada por 10 min em determinada pressão. Em **A**, o efeito foi medido pelo centro de massa do espectro de emissão de fluorescência do triptofano. Em **B**, o efeito foi medido por espalhamento de luz. Os círculos abertos correspondem à amostra à pressão atmosférica a 4°C; os triângulos abertos correspondem ao retorno a 4°C; e os cheios ao ponto após a pressão ter sido liberada. As curvas representam uma média de quatro experimentos distintos. Outras condições como na figura 11.

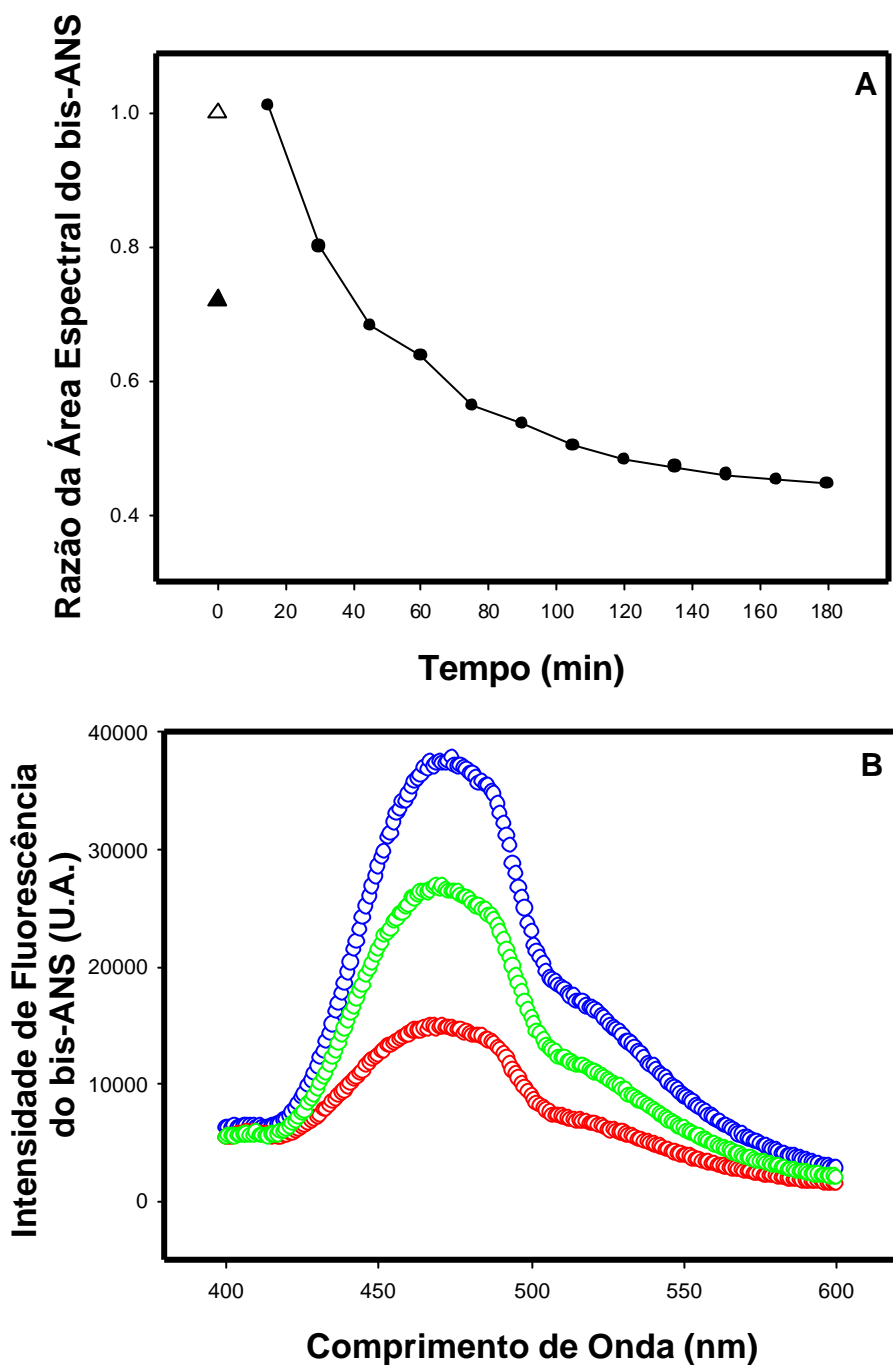
Aplicando-se a pressão diretamente a 3,2 kbar, podemos observar um retorno total dos valores de centro de massa e espalhamento de luz, diferente do que ocorreu quando as amostras foram pressurizadas gradativamente, o que sugere que estes dois efeitos podem ser distintos. Para avaliar o grau de integridade e dissociação das partículas, as amostras inativadas submetidas a 3,2 kbar por 3 h foram aplicadas em uma coluna de gel filtração em sistema de HPLC (Figura 23). Como este vírus é envelopado, existia uma grande possibilidade da maior parte da amostra interagir com a coluna. Desta forma, resolvemos aplicar uma concentração viral alta. Mesmo assim, a intensidade de fluorescência diminuiu cerca de 30% em relação à amostra não pressurizada, indicando que uma parte da população provavelmente foi capaz de interagir com a coluna, seja pela presença do envelope, seja pela exposição de resíduos hidrofóbicos provocada pela alta pressão. Porém, podemos verificar que o perfil de eluição destas amostras se mostrou muito similar ao do controle.





**Figura 23. Perfil de eluição em coluna de gel filtração em HPLC do Vírus da Febre Amarela após tratamento com alta pressão.** Cromatografia líquida de alta performance das amostras controle (azul) e após pressurização a 3,2 kbar por 3 h (vermelho) foi realizada usando uma coluna pré-empacotada modelo SynChropack GPC-1000 (SynChropack, Linden, IN). O sistema foi equilibrado em tampão TNE, pH 7,6, e a concentração de proteínas virais foi de 2 mg/mL aplicado em um loop de 50  $\mu$ L. O fluxo foi ajustado a 0,5 mL/min. Nestas condições, o  $V_0$  e o  $V_t$  correspondem a 3,75 e 7,15 min. A eluição das amostras foi monitorada pela fluorescência dos resíduos de triptofano (excitação em 280 nm, emissão em 326 nm).

Sabendo-se, então, que há diferença no comportamento do YFV quando aumentamos gradativamente a pressão ou quando submetemos a partícula diretamente a 3,2 kbar, buscamos analisar se, de fato, este último processo é reversível. Para isto, avaliamos o processo de inativação novamente através da ligação da sonda hidrofóbica bis-ANS (Figura 24). Como já mostrado, inicialmente a sonda se mantém bastante ligada à partícula à pressão atmosférica e, no decorrer do tempo de inativação, ocorre uma diminuição de sua intensidade de fluorescência, ou seja, o desligamento da sonda. No entanto, ao contrário da aplicação gradativa (Figura 19), ao retornarmos à pressão atmosférica, a sonda volta a se ligar, mostrando, então, que a pressurização desta maneira é um processo parcialmente reversível, o que condiz com a integridade das partículas virais inativadas.



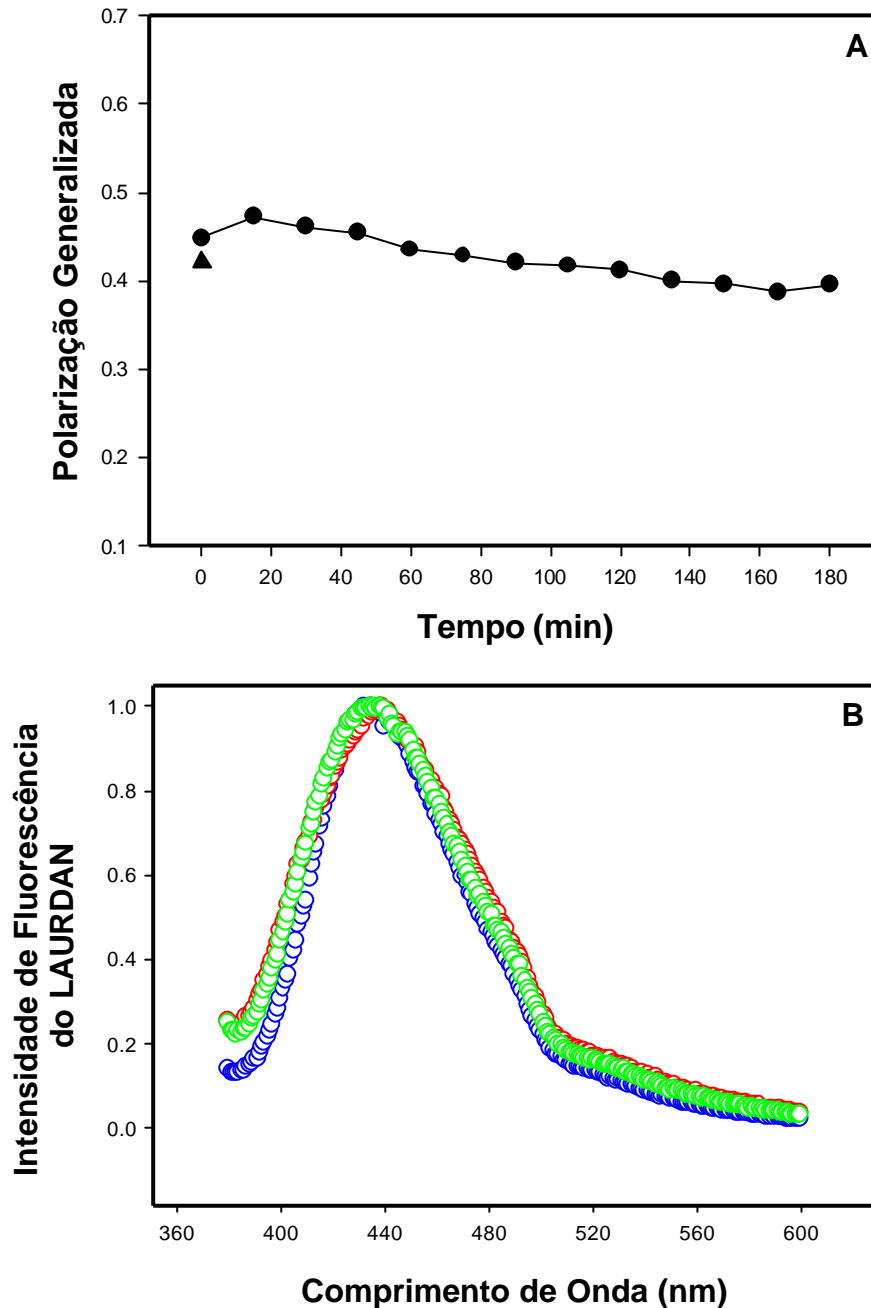
**Figura 24. Ligação da sonda hidrofóbica bis-ANS ao YFV sob pressão. A.** As alterações estruturais induzidas pela pressão foram medidas pela emissão de fluorescência da sonda bis-ANS a uma concentração final de 2  $\mu$ M. A concentração viral utilizada foi de 100  $\mu$ g/mL. O triângulo aberto corresponde à área do espectro de bis-ANS a pressão atmosférica e o fechado corresponde ao valor após a liberação da pressão. **B.** Espectros de emissão de fluorescência durante o tempo de pressurização. Os símbolos azuis correspondem ao vírus à pressão atmosférica, os vermelhos correspondem à amostra a 3,2 kbar por 3 h de pressurização, e os verdes à amostra após a liberação da pressão. Outras condições como na figura 18.

Entretanto, não podemos, com este último experimento, afirmar que as mudanças ocasionadas pela pressurização são referentes ao envelope ou às glicoproteínas do envelope. Assim, uma vez que ocorreu uma queda na ligação do bis-ANS da amostra pressurizada (Figura 24), resolvemos avaliar se a mudança conformacional induzida pela pressão ocorre a nível de envelope lipídico. Para isto, utilizamos a sonda fluorescente LAURDAN, que se intercala entre os fosfolipídeos e varia sua emissão de acordo com a fase gel ou fluida da membrana. O LAURDAN tem sido bastante empregado em estudos de sistemas binários e ternários, compostos de vesículas de fosfolipídeos e colesterol, visando o entendimento da dinâmica da bicamada lipídica (Parasassi e cols., 1994; 1995a e b; Bagatolli & Gratton, 2000a e b; Bagatolli e cols., 2003).

Por ser muito sensível à água, o perfil de seu espectro de fluorescência pode se apresentar de duas formas, com máximos de intensidade de fluorescência em 440 nm ou próximo a 490 nm. Ou seja, quando a sonda está menos acessível à água, ela fluoresce mais no azul, mas quando está em ambientes mais polares, sua fluorescência é maior no verde. No entanto, a análise da membrana em fase gel ou líquida é feita através do cálculo de polarização da sonda, que relaciona justamente suas duas intensidades de fluorescência. Assim, quando a polarização da sonda diminui, significa uma passagem da membrana da fase líquida para a fase gel.

Dessa forma, analisando as amostras pressurizadas na presença de LAURDAN (Figura 25), podemos verificar que não houve alteração significativa dos valores de polarização da sonda. Esses dados mostram que a alta pressão não afeta o envelope do YFV, e que possivelmente as mudanças observadas com a sonda bis-ANS são referentes a mudanças no ambiente das glicoproteínas e não do envelope lipídico (Figura 24), o que sugere fortemente que a inativação do vírus da

febre amarela não se deve a mudanças na organização dos lipídeos do envelope e sim das proteínas de envelope, principalmente da proteína E, que é majoritária e responsável pela interação vírus-célula.



**Figura 25. Ligação da sonda fluorescente LAURDAN ao YFV sob pressão. A.** As alterações a nível de envelope viral induzidas por pressão (3,2 kbar) foram medidas pela emissão de fluorescência da sonda LAURDAN a uma concentração final de 2,5  $\mu\text{M}$  (concentração saturante). A concentração viral utilizada foi de 100  $\mu\text{g/mL}$ . O triângulo corresponde ao valor da polarização após a liberação da pressão a 4°C. **B.** Espectros de emissão de fluorescência durante o processo de pressurização. Os símbolos azuis correspondem ao vírus à pressão atmosférica, os vermelhos a 180 min a 3,2 kbar e os verdes correspondem à amostra após a liberação da pressão. O comprimento de onda de excitação foi 360 nm e a emissão foi varrida de 380 a 600 nm. As curvas representam uma média de três experimentos distintos. A presença da sonda parece não ter alterado o perfil da variação do centro de massa nem a razão do espalhamento de luz em função do incremento de pressão.

## 5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A febre amarela é uma doença infecciosa aguda que representa um importante problema de saúde pública, especialmente na África. Apesar de existir uma vacina até certo ponto satisfatória e eficaz, a doença ainda permanece incontrolável. Em diferentes períodos da história humana, a febre amarela tem causado incontroláveis sofrimentos e indescritíveis misérias entre as populações nas Américas, Europa e África.

Nos trópicos, a maior frequência da doença ocorre no período das chuvas, entre os meses de janeiro e abril, quando a densidade vetorial (quantidade de mosquitos) é elevada, coincidindo com a época de maior atividade agrícola. No Brasil, no período de 1982 a novembro de 2004, foram confirmados 594 casos de febre amarela, com ocorrência de 286 óbitos, representando uma taxa de letalidade de 48% no período. O estado de Minas Gerais é o campeão de casos no Brasil.

### ***Desnaturação do YFV por agentes químicos, variação de pH e alta temperatura***

Estudos sobre a estabilidade estrutural de vírus são de grande valia para o desenvolvimento e teste de agentes antivirais eficazes, além de ajudarem a responder várias perguntas que ainda existem nos ciclos de infecção. Neste contexto, inicialmente visamos verificar de que modo as interações no envelope e capsídeo do YFV seriam afetadas pela presença de um agente desnaturante químico, como a uréia.

A partir da análise dos espectros de emissão de fluorescência dos resíduos de triptofano e do cálculo do centro de massa espectral, pudemos notar que a uréia

atuou drasticamente sobre a estrutura do vírus da febre amarela. A concentração de 2 M foi suficiente para diminuir significativamente os valores de centro de massa, ao contrário do que ocorre com outros vírus envelopados, cujos valores diminuem gradativamente (Gaspar e cols., 2001). Isto representa um amplo desvio do espectro de emissão de fluorescência para comprimentos de onda maiores e, portanto, menos energéticos, o que significa uma gradual exposição dos resíduos de triptofanos para ambientes cada vez mais polares.

Além da evidente desnaturação das proteínas monitorada pela emissão de fluorescência dos triptofanos, as medidas de espalhamento de luz nos sugerem uma completa dissociação da partícula viral. Podemos observar que 5 M de uréia é a concentração que induz 50% da variação dos valores de centro de massa do espectro, o que representa metade do processo de desnaturação ( $U_{1/2}$ ). No entanto, esta concentração já foi capaz de promover a completa dissociação destas partículas, o que nos permite dizer que o processo de dissociação antecede a etapa de desnaturação. Dessa forma, podemos concluir que a 5 M de uréia o vírus se encontra desmontado, porém os ambientes do triptofano, em parte, ainda estão conservados.

Uma outra forma de estudar a estrutura do YFV é avaliar a termoestabilidade destas partículas frente a diferentes pHs. Uma vez que o baixo pH induz a transição de homodímeros de proteína E em homotrímeros, e que comprovadamente estes são mais estáveis frente a altas temperaturas (Stiasny e cols., 2001), ao analisarmos a desnaturação térmica das proteínas virais, percebemos que, ao contrário do que imaginávamos, os perfis das curvas nos diferentes pHs foram semelhantes, e que a desnaturação a 80°C, em termos de centro de massa espectral do triptofano, atingiu apenas 1/3 da desnaturação provocada pela uréia.



Entretanto, avaliando o grau de dissociação e agregação, a amostra viral em pH 5 se mostrou bem mais vulnerável ao aumento de temperatura, enquanto os vírus em pH neutro se mantiveram estáveis à medida que esta era aumentada. Isto sugere que o meio ácido, ao contrário do que ocorre com a proteína E solúvel, favorece a instabilidade das partículas íntegras, deixando os resíduos hidrofóbicos mais expostos, o que, ao final, parece induzir metade do processo de dissociação total.

Assim, apesar de encontrar-se disponível uma vacina de vírus atenuado bastante imunogênica e eficaz contra o vírus da febre amarela, recentemente têm sido registradas freqüentes ocorrências de casos fatais devido a reações adversas e reversão da doença em pacientes recém-vacinados (Vasconcelos e cols., 2001; Martin e cols., 2001; Chan e cols., 2001). Muitos destes casos de morte associados à vacina são de turistas que vão visitar áreas endêmicas e são recomendados pelo governo a se vacinar. Para tentar solucionar este problema, o Ministério da Saúde solicitou à Fundação Oswaldo Cruz o desenvolvimento de uma vacina inativada contra o vírus da febre amarela.

### ***Inativação do YFV por alta pressão, investigação das mudanças estruturais causadas e a possível obtenção de uma vacina inativada contra a Febre Amarela***

A alta pressão tem emergido como uma importante técnica para tentar resolver vários problemas na medicina e na biotecnologia, e tem revelado ser uma poderosa ferramenta para o estudo das interações proteína-proteína e proteína-ácido nucléico (Da Poian e cols., 1993; 1995; Silva e cols., 1996), estando voltada

mais recentemente para o estudo de estruturas virais, vias de montagem, estados intermediários do ciclo de infecção e inativação de vírus envelopados e não envelopados (Da Poian e cols., 1995; Oliveira e cols., 1999b; Gaspar e cols., 2002; Silva e cols., 2002; 2004; Ishimaru e cols., 2004).

Uma vez que a pressão causa uma perturbação sutil quando comparada a agentes desnaturantes químicos e alta temperatura (Silva & Weber, 1993; Silva e cols., 2001), geralmente ela não produz alterações tão drásticas na estrutura da partícula viral. Ela apenas desvia o equilíbrio entre as formas desnaturada e/ou dissociada e a forma nativa, na direção daquela que ocupa o menor volume, ou seja, as formas dissociadas (Weber & Drickamer, 1983; Silva & Weber, 1993; Mozhaev e cols., 1996; Jonas & Jonas, 1994; Silva e cols., 2002).

Desta forma, em colaboração com o LATEV (Laboratório de Tecnologia Viroológica) de Bio Manguinhos, envolvido no desenvolvimento de vacinas, realizamos estudos estruturais e baseados principalmente no uso de alta pressão, visando o desenvolvimento de uma vacina inativada contra o vírus da Febre Amarela.

Inicialmente, grandes esforços foram e continuam a ser feitos no sentido de melhorar o processo de purificação do vírus da febre amarela, uma vez que boa parte das reações adversas provocadas pela vacinação atual se deve ao grau de impureza da vacina. Além disso, vale ressaltar que o vírus da cepa vacinal é crescido em ovo de galinha, e que uma parte da população é intolerante às proteínas do ovo. Posteriormente, realizamos várias tentativas de inativação das partículas por alta pressão hidrostática, avaliadas primeiramente através de ensaios de infecciosidade. Isto se deve ao fato da possibilidade das partículas não serem afetadas, ou serem apenas parcialmente afetadas, pela aplicação de alta pressão.

Recentemente, vários vírus vêm sendo inativados por alta pressão, como é o caso do Vírus da Febre Aftosa (Ishimaru e cols., 2004) e do Adenovírus (Pontes e cols., 1997), que necessitam ser pressurizados a 2,5 kbar por 16 h e a 2,2 kBar por 15 h, respectivamente, para terem seus títulos de infecciosidade completamente abolidos. Um outro exemplo é o Vírus da Estomatite Vesicular, cujo tempo de pressurização pode ser menor, em torno de 3 h (Gomes e cols., 2003).

Assim, testamos uma série de condições de pressão, temperatura, tempo de incubação e número de ciclos de pressurização com este objetivo. Tais experimentos não foram incluídos na tese, uma vez que não faria sentido apresentar um número demasiadamente grande de experimentos que não seriam satisfatórios ao objetivo final de inativação. Dessa forma, felizmente fomos capazes de identificar a condição ideal para a completa inativação do YFV, que consiste na pressurização a 3,2 kbar por 3 h, sempre mantendo a amostra a 4°C. Esta observação derivou dos ensaios de infecciosidade, uma vez que nesta condição não foi detectado título viral.

Sob este contexto, resolvemos investigar a estabilidade estrutural do YFV, e avaliar de que forma estas partículas estariam sendo inativadas pela alta pressão. Os valores de centro de massa e da razão do espalhamento de luz revelam que a pressão leva a uma pequena desestabilização da estrutura viral ( $\Delta\langle u \rangle = 300 \text{ cm}^{-1}$ ), entretanto, suficiente para promover a inativação. Vale ressaltar também que, sob este ponto de vista, parece que a exposição dos resíduos de triptofano foi totalmente reversível após a liberação da pressão. Porém, alguma alteração sutil na estrutura ocorre, já que a inativação é evidente. Esta reversibilidade também é verificada para o Vírus Sindbis e o Vírus Influenza, cuja variação do centro de massa é próximo a  $200 \text{ cm}^{-1}$  (Gaspar e cols., 2002), porém é apenas parcialmente reversível no caso do

Vírus Mayaro, que possui uma variação de cerca de  $350 \text{ cm}^{-1}$ . E, para todos estes vírus, o espalhamento de luz não passa de 30%.

Estas mudanças não foram favorecidas pela redução da temperatura, como é visto para diversas proteínas, como a tropomiosina (Suarez e cols., 2001), que é completamente desnaturada, e outros vírus, como é o caso dos picornavírus (Oliveira e cols., 1999a; Ishimaru e cols., 2004).

Uma outra abordagem para verificar mais minuciosamente o efeito da pressão foi a utilização do bis-ANS, que é uma sonda fluorescente capaz de aumentar sua emissão de fluorescência à medida que se liga a segmentos hidrofóbicos próximos a cargas positivas. Verificamos que há diferença entre a aplicação gradativa de pressão e a compressão, diretamente a 3,2 kbar. Conforme a pressão era aumentada, o desligamento da sonda era observado. Verificamos que a emissão de fluorescência da sonda bis-ANS diminuiu cerca de 4 vezes até a pressão de 3,2 kbar, e que, ao retornar à pressão atmosférica, a sonda permaneceu desligada, mostrando a irreversibilidade dos efeitos da pressão na estrutura viral.

Porém, quando monitorávamos apenas o tempo de inativação, observamos que a sonda se desligava, mas voltava a ligar após o retorno à pressão atmosférica, indicando que o processo de fato era parcialmente reversível nesta condição. Portanto, poderia estar aqui a resposta para a inativação. Este efeito não é observado para os Vírus Sindbis e Influenza, que apresentam um aumento na fluorescência do bis-ANS quando a pressão é aumentada, indicando o aparecimento de sítios de caráter hidrofóbico onde a sonda está se ligando (Gaspar e cols., 2002).

Para tentar avaliar se a organização da estrutura do envelope viral estaria sendo afetada pela pressão e, conseqüentemente, estaria desfavorecendo a interação do vírus com a célula hospedeira, resolvemos verificar a ligação da sonda

LAURDAN ao envelope viral. Assim como o bis-ANS, o LAURDAN é uma sonda fluorescente sensível ao meio, capaz de interagir com membranas lipídicas, refletindo a transição de fase da membrana de gel para fluida. Sendo assim, verificamos que as características de organização do envelope lipídico do vírus sob pressão parecem não alterar, quando comparamos a variação de GP para outros modelos e condições apresentados na literatura (Parasassi e cols., 1986, 1997; Bagatoli, 2003), e que a inativação realmente deve ocorrer a nível de proteína de superfície, como visto através dos experimentos de bis-ANS.

Para avaliar se a inativação realmente ocorre a nível da glicoproteína de membrana E, o próximo passo a ser dado é verificar se o YFV inativado é capaz de se ligar à membrana da célula alvo e ser endocitado. Para isto, pretendemos realizar ensaios de mistura de lipídeos de vesículas artificiais, os lipossomas, com os vírus marcados com ácido pireno dodecanóico. Além disso, pretendemos também utilizar a técnica de microscopia de fluorescência para analisar se ocorre entrada dos vírus inativados, marcados com sondas fluorescentes, em células de vertebrados.

Experimentos de RT-PCR têm mostrado que os vírus inativados ainda possuem ARN, sugerindo grande integridade destas partículas virais (dado não mostrado). Dessa forma, a fim de avaliarmos melhor o efeito da pressão quanto à integridade das partículas, realizamos experimentos de cromatografia líquida em HPLC. Pudemos notar uma sobreposição do perfil de eluição, onde o vírus pressurizado se mostrou tão estruturado quanto o controle à pressão atmosférica.

O uso combinado de alta pressão e baixa temperatura tem se tornado uma forma de estudar os processos de dissociação e desnaturação de proteínas (Foguel e cols., 1992; Foguel & Silva, 1994; Foguel & Weber, 1995) e estruturas virais (Oliveira e cols., 1999a). Apesar de muitas vezes promover mudanças mais

drásticas que a pressão isolada, esta combinação promove mudanças mais graduais na amostra se comparadas com o efeito da uréia. Analisando os dados dos experimentos com pressão e baixa temperatura, podemos observar uma grande similaridade com a curva de inativação realizada a 4°C, onde os ambientes do triptofano são afetados de maneira equivalente. Assim, podemos dizer que temperaturas negativas não acentuam a desnaturação promovida pelo efeito da alta pressão.

Trabalhos recentes vêm mostrando que a alta pressão, além de levar à inativação, induz um estado intermediário de fusão de vírus envelopados como Influenza, Sindbis e VSV. Isto porque a pressão hidrostática induz uma alteração conformacional nas glicoproteínas destes vírus, a pH neutro, muito similar à alteração alcançada pelo baixo pH. Ou seja, o efeito da pressão pode mimetizar a etapa que ocorre dentro do endossoma (Gaspar e cols., 2002; Gomes e cols., 2003). Assim, o uso da pressão para atingir o estado ativo de fusão pode ser utilizado no desenvolvimento de novas drogas e vacinas antivirais. Os estudos referentes à capacidade de indução do estado fusogênico do YFV por pressão são iniciais e por isso não estão discutidos nesta tese.

Estes resultados apresentam características importantes para a manutenção do interesse em desenvolver a vacina. Não há dúvidas de que as partículas são inativadas pela alta pressão nas condições aqui apresentadas. E a manutenção de sua integridade pode ajudar a favorecer uma resposta imune eficaz quando um indivíduo for infectado pela forma virulenta. Além disso, já que a pressão pode ser capaz de mimetizar alguma etapa do ciclo de infecção natural do vírus, ela pode congelar o vírus numa conformação, sutilmente diferente da nativa, que expõe mais resíduos hidrofóbicos, o que torna estas partículas mais imunogênicas.

Estudos *in vivo* têm mostrado que a inoculação do vírus da febre amarela inativado por alta pressão induz a produção de anticorpos neutralizantes em camundongos (dados não mostrados). E, como já esperado para a resposta de um agente inativado, a produção de anticorpos foi baixa, mas suficiente para que todos os animais sobrevivessem à inoculação letal intracerebral. Na tentativa de aumentar esta resposta imune, os ensaios de imunogenicidade vão ser repetidos com as partículas virais na presença de adjuvantes.

Também já verificamos que, assim como a cepa vacinal 17DD, o ARN das partículas virais inativadas por pressão é infeccioso, ou seja, quando transfectado em células de vertebrados, é capaz de produzir novas partículas perfeitas e infecciosas. Vale lembrar que a reversão da doença é dada, principalmente, pela capacidade de infecção normal do vírus atenuado. Por isto a importância de se investigar se estas partículas inativadas são realmente capazes de fundir com a célula alvo.

Para tanto, existem vantagens e desvantagens se o vírus imunogênico for capaz de fundir com a célula. A vantagem está na amplificação da resposta imune, já que o indivíduo deixaria de ter apenas resposta humoral (anticorpos), para ter também uma resposta celular. No entanto, a preocupação de ocorrer a fusão é do ARN viral intercalar com o ADN celular e ser capaz de produzir novas partículas, assim como ocorre no ensaio de transfecção. Mas se isto ocorrer, não invalida o processo de patente, nem põe em risco a produção da vacina, pois o ARN viral pode ainda ser inativado por outros métodos como raios ultravioleta. Esta associação de UV à alta pressão para eliminar a infecciosidade residual já foi verificada para o vírus da febre suína clássica (CSFV), também um membro da família *Flaviviridae* (Freitas e cols., 2003).

Dando continuidade à caracterização estrutural dos mecanismos de fusão deste vírus, pretendemos também avaliar as condições ideais de entrada das partículas na célula, analisando a presença de lipídeos importantes e o pH ótimo para ocorrer a fusão. Além disso, com o objetivo de visualizar a morfologia das partículas imunogênicas inativadas, temos tentado realizar microscopia eletrônica de transmissão.

Nossos dados sugerem que um único ciclo de compressão e descompressão realmente leva à inativação do Vírus da Febre Amarela e buscamos compreender de que forma isto poderia acontecer na estrutura desta partícula viral. É claro que todos estes experimentos fazem parte de uma caracterização inicial, mas que são de grande valia para o entendimento das mudanças estruturais ocorridas neste processo.

Devido ao aumento da incidência e da distribuição geográfica da Dengue nos últimos 50 anos, esta doença vem se tornando cada vez mais reconhecida como uma das doenças mais infecciosas do mundo (Mairuhu e cols., 2004). Um outro agente que vem se tornando de grande importância é o vírus do oeste do Nilo (WNV), que em 1999 foi identificado na cidade de Nova Iorque. No Canadá, WNV foi isolado em pássaros, em 2001, e em humanos, em 2002, e já foi detectado na Jamaica, República Dominicana e no México. No final de 2003, o vírus alcançou um total de nove províncias e territórios (Gould & Fikrig, 2004). E, se ele continuar se expandindo desta forma, brevemente poderá estar causando epidemias em regiões da América do Sul.

Como estas doenças são uma séria questão de saúde pública e vêm causando um impacto na economia mundial, grandes investimentos estão voltados para o desenvolvimento de uma vacina que extermine com as epidemias de



flavivírus que atualmente estão disseminadas em várias partes do mundo, seja através da tecnologia da engenharia genética, seja pelo método convencional (atenuada ou inativada).

A vantagem da ferramenta de alta pressão hidrostática está justamente em seu custo reduzido, inclusive para processamento de grandes volumes, além de ser um processo limpo por não fazer uso de agentes químicos, como o formol. Além disso, o aparato de pressão em larga escala já está sendo amplamente utilizado em indústrias alimentícias como forma de inativação de enzimas. Assim, este trabalho pode abrir portas para a inativação de diversos vírus com o objetivo de desenvolver vacinas que ainda não existem, mas que estão sendo amplamente pesquisadas. Todo este processo de inativação e inoculação em animais já está sendo desenvolvido para os quatro sorotipos do vírus da Dengue. E o diferencial deste trabalho é que hoje temos uma empresa interessada em lançar no mercado o produto final, que é a vacina.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLISON, S.L., SCHALICH, J., STIASNY, K., MANDL, C.W. & HEINZ, F.X. Mutational evidence for an internal fusion peptide in the flavivirus envelope protein E. *Journal of Virology* **75**: 4268-4275 (2001).

ALLISON, S.L., SCHALICH, J., STIASNY, K., MANDL, C.W., KUNZ, C. & HEINZ, F.X. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *Journal of Virology* **69**: 695-700 (1995).

BABIUK, L.A., BABIUK, S.L. & BACA-ESTRADA, M.E. Novel vaccine strategies. *Advances in Virus Research* **58**: 29-80 (2002).

BAGATOLLI, L.A. Direct observation of lipid domains in free standing bilayers from simple to complex lipid mixtures. *Chemistry and Physics of Lipids* **122**: 137-145 (2003).

BAGATOLLI, L.A. & GRATTON, E. A correlation between lipid domain shape and binary phospholipids mixture composition in free standing bilayers: a two-photon fluorescence microscopy study. *Biophysical Journal* **79**: 434-447 (2000a).

BAGATOLLI, L.A. & GRATTON, E. Two photon fluorescence microscopy observation of shape changes at the phase transition in phospholipids giant unilamellar vesicles. *Biophysical Journal* **77**: 2090-2101 (1999).

BAGATOLLI, L.A. & GRATTON, E. Two photon fluorescence microscopy of coexisting lipid domains in giant unilamellar vesicles of binary phospholipids mixtures. *Biophysical Journal* **78**: 290-305 (2000b).

BAGATOLLI, L.A., GRATTON, E., KHAN, T.K. & CHONG, P.L. Two-photon fluorescence microscopy studies of bipolar tetraether giant liposomes from thermoacidophilic archaeobacteria *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biophysical Journal* **79**: 416-425 (2000).

BAGATOLLI, L.A., SANCHEZ, S.A., HAZLETT, T. & GRATTON, E. Giant vesicles, Laurdan, and two-photon fluorescence microscopy: evidence of lipid lateral separation in bilayers. *Methods in Enzymology* **360**: 481-500 (2003).

BAKER, D. & AGARD, D.A. Influenza hemagglutinin: kinetic control of protein function. *Structure* **2**: 907-910 (1994).

BARRETT, A.D.T. Yellow Fever Virus. *Biologicals* **25**: 17-25 (1997).

BONAFE, C.F.S., GLASER, M., VOSS, E.W., WEBER, G. & SILVA, J.L. Virus inactivation by anilino-naphthalene sulfonate compounds and comparison with other ligands. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **275**: 955-961 (2000).

BRESSANELLI, S., STIASNY, K., ALLISON, S.L., STURA, E.A., DUQUERROY, S., LESCAR, J., HEINZ, F.X. & REY, F.A. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *The EMBO Journal* **23**: 728-738 (2004).

BULLOUGH, P.A., HUGHSON, F.M., SKEHEL, J.J. & WILEY, D.C. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* **371**: 37-43 (1994).

BURKE, D.S. & MONATH, T.P. Flaviviruses. Em Fields Virology, 4<sup>th</sup> ed., KNIPE, D.M. & HOWLEY, P.M., eds. (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins), p. 1043-1125 (2001).

BYRNES, A.P. & GRIFFIN, D.E. Binding of Sindbis virus to cell surface heparin sulfate. *Journal of Virology* **72**: 7349-7356 (1998).

CAHOUR, A., PLETNEV, A., VAZIELLE-FALCOZ, M., ROSEN, L. & LAI, C.J. Growth-restricted dengue virus mutants containing deletions in the 5' noncoding region of the RNA genome. *Virology* **207**: 68-76 (1995).

CARR, C.M., CHAUDHRY, C. & KIM, P.S. Influenza is spring-loaded by a metastable native conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 14306-14313 (1997).

CASPAR, D.L.D. & KLUG, A. Physical principles in the construction of regular viruses. Cold Spring Harb. Symp. *Quant. Biol.* **27**: 1-24 (1962).

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. West Nile update – current case count. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&control.htm>. (2004).

CHAMBERS, T.J., HAHN, C.S., GALLER, R. & RICE, C.M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Reviews Microbiology* **44**: 649-688 (1990a).

CHAMBERS, T.J., WEIR, R.C., GRAKOU, A., MCCOURT, D.W., BAZAN, J.F., FLETTERICK, R.J. & RICE, C.M. Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 8898-8902 (1990b).

CHAN, D.C. & KIM, P.S. HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**: 681-684 (1998).

CHAN, R.C., PENNEY, D.J., LITTLE, D., CARTER, I.W., ROBERTS, J.A. & RAWLINSON, W.D. Hepatitis and death following vaccination with 17D-204 yellow fever vaccine. *Lancet* **358**: 121-122 (2001).

CHAZAL, N. & GERLIER, D. Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiology Molecular Biology Review* **67**: 226-237 (2003).

CHEN, Y., MAGUIRE, T., HILEMAN, R.E., FROMM, J.R., ESKO, J.D., LINHARDT, R.J., & MARKS, R.M. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparin sulfate. *Nature Medicine* **3**: 866-871 (1997).

CHU, J.J.H. & NG, M.L. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *Journal of Virology* **78**: 10543-10555 (2004).

CHU, J.J.H. & NG, M.L. Trafficking mechanism of west nile (sarafend) virus structural proteins. *Journal Medical Virology* **67**: 127-136 (2002).

CORVER, J., ORTIZ, A., ALLISON, S.L. SCHALICH, J., HEINZ, F.X. & WILSCHUT, J. Membrane fusion activity of tick-borne encephalitis virus and recombinant subviral particles in a liposomal model system. *Virology* **269**: 37-46 (2000).

CRILL, W.D. & ROEHRIG, J.T. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *Journal of Virology* **75**: 7769-7773 (2001).

DA POIAN, A.T., OLIVEIRA, A.C. & SILVA, J.L. Cold denaturation of an icosahedral virus. the role of entropy in virus assembly. *Biochemistry* **34**: 2672-2677 (1995).

DA POIAN, A.T., OLIVEIRA, A.C., GASPAR, L.P., SILVA, J.L. & WEBER, G. Reversible pressure dissociation of R17 bacteriophage: the physical individuality of virus particles. *Journal of Molecular Biology* **231**: 999-1008 (1993).

DeFOLIART, G.R., GRIMSTAD, P.R. & WATTS, D.M. Advances in mosquito-borne arbovirus/vector research. *Annual Review Entomology* **32**: 479-505 (1987).

DESAI, G., PANICK, G., ZEIN, M., WINTER, R. & ROYER, C. A. pressure-jump studies of the folding/unfolding of trp repressor. *Journal of Molecular Biology* **288**: 461-475 (1999).

DEUBEL, V., DIGOUTTE, J.P., MATTEI, X. & PANDARE, D. Morphogenesis of yellow fever virus in *Aedes aegypti* cultured cells. II. An ultrastructural study. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene* **30**: 1071-1077 (1981).

DIETRICH, C., BAGATOLLI, L.A., VOLOVYK, Z.N., THOMPSON, N.L. LEVI, M., JACOBSON, K. & GRATTON, E. Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophysical Journal* **80**: 1417-1428 (2001a).

DIETRICH, C., VOLOVYK, Z.N., LEVI, M., THOMPSON, N.L. & JACOBSON, K. Partitioning of Thy-1, GM1, and cross-linked phospholipids analogs into lipid rafts reconstituted in supported model membrane monolayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 10642-10647 (2001b).

DIMITROV, D.S. Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 109-122 (2004).

DUARTE DOS SANTOS, C., POST, P.R., CARVALHO, R., FERREIRA, I.I., RICE, C.M. & GALLER, R. Complete nucleotide sequence of yellow fever virus vaccine strains 17DD and 17D-213. *Virus Research* **35**: 35-41 (1995).

FALGOUT, B., CHANOCK, R. & LAI, C.J. Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a. *Journal of Virology* **63**: 1852-1860 (1989).

FALGOUT, B., PETHEL, M., ZHANG, Y.M., LAI, C.J. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *Journal of Virology* **65**: 2467-2475 (1991).

FERLENGHI, L., CLARKE, M., RUTTEN, T., ALLISON, S.L., SCHALICH, J., HINZ, F.X., HARRISON, C.S., REY, F.A. & FULLER, S.D. Molecular organization of a recombinant subviral particle from tick-borne encephalitis virus. *Molecular Cell* **7**: 593-602 (2001).

FERRAO-GONZALES, A.D., PALMIERI, L., VALORY, M., SILVA, J.L., LASHUEL, H., KELLY, J.W. & FOGUEL, D. Hydration and packing are crucial to amyloidogenesis as revealed by pressure studies on transthyretin variants that either protect or worsen amyloid disease. *Journal of Molecular Biology* **328**: 963-974 (2003).

FERRAO-GONZALES, A.D., SOUTO, S.O., SILVA, J.L. & FOGUEL, D. The preaggregated state of an amyloidogenic protein: hydrostatic pressure converts native transthyretin into the amyloidogenic state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 6445-6450 (2000).

FOGUEL, D. & SILVA, J.L. Cold denaturation of a repressor-operator complex – the role of entropy in protein-DNA recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 8244-8247 (1994).

FOGUEL, D. & WEBER, G. Pressure-induced dissociation and denaturation of Allophycocyanin at subzero temperature. *Journal of Biological Chemistry* **48**: 28759-28766 (1995).

FOGUEL, D., CHALOUB, R.M., SILVA, J.L., CROFTS, A.R. & WEBER, G. Pressure and low temperature effects on the fluorescence emission spectra and lifetimes of the photosynthetic components of Cyanobacteria. *Biophysical Journal* **63**: 1613-1622 (1992).

FOGUEL, D., SILVA, J.L. & PRAT-GAY, G. Characterization of a partially folded monomer of the DNA-binding domain of Human Papillomavirus E2 protein obtained at high pressure. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 9050-9057 (1998).

FOGUEL, D., SUAREZ, M.C., BARBOSA, C., RODRIGUES, J.J., SORENSON, M.M., SMILLIE, L.B. & SILVA, J.L. Mimicry of the calcium-induced conformational state of troponin C by low temperature under pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 10642-10646 (1996).

FOGUEL, D., TESCHKE, C.M., PREVELIGE, P.E. JR & SILVA, J.L. Role of entropic interactions in viral capsids single amino acid substitutions in P22 bacteriophage coat protein resulting in loss of capsid stability. *Biochemistry* **34**: 1120-1126 (1995).

FREITAS, T.R., GASPAR, L.P., CALDAS, L.A., SILVA, J.L. & REBELLO, M.A. Inactivation of classical swine fever virus: association of hydrostatic pressure and ultraviolet irradiation. *Journal of Virological Methods* **108**: 205-211 (2003).

FRICKS, C.E. & HOGLE, J.M. Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *Journal of Virology* **64**: 1934-1945 (1990).

FRY, E.E., LEA, S.M., JACKSON, T., NEWMAN, J.W., ELLARD, F.M., BLAKEMORE, W.E., ABU-GHAZALEH, R., SAMUEL, A., KING, A.M. & STUART, D.I. The structure and function of a Foot-and-Mouth Disease Virus-oligosaccharide receptor complex. *The EMBO Journal* **18**: 543-554 (1999).

FRYE, K.J. & ROYER, C.A. Probing the contribution of internal cavities to the volume change of protein unfolding under pressure. *Protein Science* **7**: 2217-2222 (1998).

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

GASPAR, L.P., JOHNSON, J.E., SILVA, J.L. & DA POIAN, A.T. Different partially folded states of the capsid protein of Cowpea Severe Mosaic Virus in the disassembly pathway. *Journal of Molecular Biology* **273**: 456-466 (1997).

GASPAR, L.P., SILVA, A.C.B., GOMES, A.M.O., FREITAS, M.S., ANO BOM, A.P.D., SCHWARCZ, W.D., MESTECKY, J., NOVAK, M.J., FOGUEL, D. & SILVA, J.L. Hydrostatic pressure induces the fusion-active state of enveloped viruses. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 8433-8439 (2002).

GASPAR, L.P., TEREZAN, A.F., PINHEIRO, A.S., FOGUEL, D., REBELLO, M.A. & SILVA, J.L. The metastable state of nucleocapsids of enveloped viruses as probed by hydrostatic pressure. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 7415-7421 (2001).

GERMI, R., CRANCE, J., GARIN, D., GUIMET, J., LORTAT-JACOB, H., RUIGROK, R.W.H., ZARSKI, J. & DROUET, E. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology* **292**: 162-168 (2002).

GIBBONS, D.L., AHN, A., CHATTERJEE, P.K. & KIELIAN, M. Formation and characterization of the trimeric form of the fusion protein of Semliki Forest virus. *Journal of Virology* **74**: 7772-7780 (2000).

GRANGE, T., BOULOY, M. & GIRARD, M. Stable secondary structures at the 3'-end of the genome of yellow fever virus (17D vaccine strain). *FEBS letters* **188**: 159-163 (1985).

GOMES, A.M.O., PINHEIRO, A.S., BONAFE, C.F.S. & SILVA, J.L. Pressure-induced fusogenic conformational of vesicular stomatitis virus glycoprotein. *Biochemistry* **42**: 5540-5546 (2003).

GORBALENYA, A.E., DONCHENKO, A.P., KOONIN, E.V. & BLINOV, V.M. N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Research* **17**: 3889-3897 (1989).

GOULD, L.H. & FIKRIG, E. West Nile Virus: a growing concern? *The Journal of Clinical Investigation* **113**: 1102-1107 (2004).

GUIRAKHOO, F., HEINZ, F.X., MANDL, C.W., HOLZMANN, H. & KUNZ, C. Fusion activity of flaviviruses: comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne encephalitis virions. *Journal General Virology* **72**: 1323-1329 (1991).

HALSTEAD, S.B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* **239**: 476-481 (1988).

HARRIS, F.M. BEST, K.B. & BELL, J.D. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipids order. *Biochimica et Biophysica Acta* **1565**: 123-128 (2002).

HAYWOOD, A.M. & BOYER, B.P. Time and temperature dependence of influenza virus membrane fusion at neutral pH. *Journal General Virology* **67**: 2813-2817 (1986).

HEINZ, F.X. & ALLISON, S.L. Structures and mechanisms in flavivirus fusion. *Advances in Virus Research* **55**: 231-269 (2000).

HEINZ, F.X. & ALLISON, S.L. The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. *Current Opinion in Microbiology* **4**: 450-455 (2001).



HEINZ, F.X., AUER, G., STIASNY, K., HOLZMANN, H., MANDL, C., GUIRAKHOO, F. & KUNZ, C. The interactions of the flavivirus envelope proteins: implications for virus entry and release. *Archives in Virology* **9** (suppl.): 339-348 (1994).

HEINZ, F.X. & MANDL, C.W. The molecular biology of tick-borne encephalitis virus. *APMIS* **101**: 735-745 (1993).

HELENIUS, A. Alphavirus and flavivirus glycoproteins: structures and functions. *Cell* **81**: 651-653 (1995).

HEREMANS, K. High Pressure effects on proteins and other biomolecules. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **11**: 1-21 (1982).

HEREMANS, K. & SMELLER, L. Protein structure and dynamics at high pressure. *Biochimica et Biophysica Acta* **1386**: 353-370 (1998).

HERNANDEZ, L.D., HOFFMAN, L.R., WOLFSBERG, T.G. & WHITE, J.M. Virus-cell and cell-cell fusion. *Annual Review Cell Dev. Biology* **12**: 627-661 (1996).

HUMMER, G., GARDE, S., GARCÍA, A.E., PAULAITIS, M.E. & PRATT, L.R. The Pressure dependence of hydrophobic interactions is consistent with the observed pressure denaturation of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 1552-1555 (1998).

HUNG, S.L., LEE, P.L., CHEN, H.W., CHEN, L.K., KAO, C.L. & KING, C.C. Analysis of the steps involved in Dengue virus entry into host cells. *Virology* **257**: 156-167 (1999).

ISHIMARU, D., SA-CARVALHO, D. & SILVA, J.L. Pressure-inactivated FMDV: a potential vaccine. *Vaccine* **22**: 2334-2339 (2004).

JAN, L.R., YANG, C.S., TRENT, D.W., FALGOUT, B. & LAI, C.J. Processing of Japanese encephalitis virus non-structural proteins: NS2B-NS3 complex and heterologous proteases. *Journal of General Virology* **76**: 573-580 (1995).

JARDETZKY, T.S. & LAMB, R.A. Virology: a class act. *Nature* **427**: 307-308 (2004).

JENNINGS, A.D., GBSON, C.A., MILLER, B.R., MATHEWS, J.H., MITCHELL, C.J., ROEHRIG, J.T., WOOD, D.J., TAFFS, F., SIL, B.K., WHITBY, S.N., MINOR, P.D., MONATH, T.P. & BARRETT, A.D.T. Analysis of a yellow fever virus isolated from a fatal case of vaccine-associated human encephalitis. *Journal of Infection Disease* **169**:512-518 (1994).

JOHNSON, J.E. Functional implications of protein-protein interactions in icosahedral viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**: 27-33 (1996).

JONAS, J. & JONAS, A. High-pressure NMR spectroscopy of proteins and membrane. *Annual Review Biophys. Biomol. Struct.* **23**: 287-318 (1994).

JOYCE, J.G., TUNG, J.S., PRZYSIECKI, C.T., COOK, J.C., LEHMAN, E.D., SANDS, J.A., JANSEN, K.U. & KELLER, P.M. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interact with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 5810-5822 (1999).

KIELIAN, M., CHATTERJEE, P.K., GIBBONS, D.L. & LU, Y.E. Specific roles for lipids in virus fusion and exit. Examples from the alphaviruses. *Subcellular Biochemistry* **34**: 409-455 (2000).

KO, K.K., IGARASHI, A. & FUKAI, K. Electron microscopic observations on *Aedes albopictus* cells infected with dengue viruses. *Archives in Virology* **62**: 41-52 (1979).

KORTE, T. & HERRMANN, A. pH-dependent binding of the fluorophore bis-ANS to influenza virus reflects the conformational change of hemagglutinin. *European Biophysical Journal* **23**: 105-113 (1994).

KORTE, T., LUDWIG, K., BOOY, F. P., BLUMENTHAL, R., & HERRMANN, A. Conformational intermediates and fusion activity of influenza virus hemagglutinin. *Journal of Virology* **73**: 4567-4574 (1999).

KUNH, R.J., ZHANG, W., ROSSMANN, M.G., PLETNEV, S.V., CORVER, J., LENCHES, E., JONES, C.T., MUKHOPADHYAY, S., CHIPMAN, P.R., STRAUSS, E.G., BAKER, T.S. & STRAUSS, J.H. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* **108**: 717-725 (2002).

KUNO, G., CHANG, G.J.J., TSUCHIYA, K.R., KARABTISO, N. & CROPP, C.B. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *Journal of Virology* **72**: 73-83 (1998).

LAKOWICZ, J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum Press, New York, NY (1983).

LESCAR, J., ROUSSEL, A., WIEN, M.W., NAVAZA, J., FULLER, S.D., WENGLER, G., WENGLER, G. & REY, F.A. The fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus. An icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell* **105**: 137-148 (2001).

LIN, C.L., CHUNG, C.S., HEINE, H.G. & CHANG, W. Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparin sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo. *Journal of Virology* **74**: 3353-3365 (2000).

LINDENBACH, B.D. & RICE, C.M. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. Em Fields Virology, 4<sup>th</sup> ed., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., GRIFFIN D.E., LAMB, R.A., MARTIN, M.A., ROIZMAN, B. & STRAUS, S.E., eds. (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins), p. 991-1041 (2001).

LLOYD, W., THEILER, M. & RICCI, N.I. Modification of the virulence of yellow fever virus by cultivation in tissues. *Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene* **29**: 481-529 (1936).

LORENZ, I.C., ALLISON, S.L., HEINZ, F.X. & HELENIUS, A. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology* **76**: 5480-5491 (2002).

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.Y., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurements with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265-275. (1951).

MACGREGOR, R.B. & WEBER, G. Estimation of the polarity of the protein interior by optical spectroscopy. *Nature* **319**: 70-73 (1986).

MACKENZIE, J.M. & WESTAWAY, E.G. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *Journal of Virology* **75**: 10787-10799 (2001).

MAIRUHU, A.T. A., WAGENAAR, J., BRANDJES, D.P.M. & VAN GORP, E.C.M. Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. *European Journal of Clinical Microbiology and Infection Disease* **23**: 425-433 (2004).

MARTIN, M., TSAI, T.F., CROPP, B., CHANG, G.J., HOLMES, D.A., TSENG, J., SHIEH, W., ZAKI, S.R., AL-SANOURI, I., CUTRONA, A.F., RAY, G., WELD, L.H. & CETRON, M.S. Fever and multisystem organ failure associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of four cases. *Lancet* **358**: 98-104 (2001).

MODIS, Y., OGATA, S, CLEMENTS, D. & HARRISON, S.C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* **427**: 313-319 (2004).

MONATH, T.P. Yellow fever. Em: Monath, T.P. (ed) Arboviruses: ecology and epidemiology, Volume V, CRC Press, Boca Raton, p. 139-241 (1988).

MONATH, T.P. Yellow fever. *Lancet Infectious Diseases* **1**: 11-20 (2001).

MONATH, T.P. Yellow fever: a medically neglected disease. Report on a seminar. *Review of Infection Disease* **9**: 165-175 (1987).

MOZHAEV, V.V., HEREMANS, K., FRANK, J., MASSON, P. & BALNY, C. High pressure effects on protein structure and function. *Proteins* **24**: 81-91 (1996).

MUKHOPADHYAY, S., KUNH, R.J. & ROSSMANN, M.G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 13-22 (2005).

MUNOZ, M.L., CISNEROS, A., CRUZ, J., DAS, P., TOVAR, R. & ORTEGA, A. Putative Dengue virus receptors from mosquito cells. *FEMS Microbiology Letters* **168**: 251-258 (1998).

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

NASH, D.P. & JONAS, J. Structure of pressure-assisted cold denatured lysozyme and comparison with lysozyme folding intermediates. *Biochemistry* **36**: 14375-14383 (1997).

OLIVEIRA, A.C., ISHIMARU, D, GONÇALVES, R.B., SMITH, T.J., MASON, P., CARVALHO, D. & SILVA, J.L. Low temperature and pressure stability of Picornavirus: implications for virus uncoating. *Biophysical Journal* **76**: 1270-1279 (1999a).

OLIVEIRA, A.C., VALENTE, A.P., ALMEIDA, F., LIMA, S.M.B., ISHIMARU, D., GONÇALVES, R.B., PEABODY, D.S., FOGUEL, D. & SILVA, J.L. Hydrostatic pressure as a tool to study virus assembly: inactivated vaccines and viral drugs. *High Pressure Molecular Science*, NATO ASI **series c**, 497-513 (1999b).

PALADINI, A.A. & WEBER, G. Pressure-induced reversible dissociation of enolase. *Biochemistry* **20**: 2587-2593 (1981).

PARASASSI, T., CONTI, F. & GRATTON, E. Time-resolved fluorescence emission spectra of Laurdan in phospholipids vesicles by multifrequency phase and modulation fluorometry. *Cell Molecular Biology* **32**: 103-108 (1986).

PARASASSI, T., DE STASIO, G., RAVAGNAN, G., RUSCH, R.M. & GRATTON, E. Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophysical Journal* **60**: 179-189 (1991).

PARASASSI, T., DI STEFANO, M., LOIERO, M., RAVAGNAN, G. & GRATTON, E. Influence of cholesterol on phospholipid bilayers phase domains as detected by Laurdan fluorescence. *Biophysical Journal* **66**: 120-132 (1994).

PARASASSI, T., GIUSTI, A.M., RAIMOND, M. & GRATTON, E. Abrupt modifications of phospholipid bilayer properties at critical cholesterol concentrations. *Biophysical Journal* **68**: 1895-1902 (1995a).

PARASASSI, T. & GRATTON, E. Membrane lipid domains and dynamics detected by Laurdan. *Journal of Fluorescence* **5**: 59-70 (1995b).

PARASASSI, T., GRATTON, E., YU, W.M., WILSON, P. & LEVI, M. Two-photon fluorescence microscopy of laurdan generalized polarization domains in model and natural membranes. *Biophysical Journal* **72**: 2413-2429 (1997).

PATEL, M., YANAGISHITA, M., RODERIQUEZ, G., BOU-HABIB, D.C., ORAVECZ, T., HASCALL, V.C. & NORCROSS, M.A. Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. *AIDS Research Human Retroviruses* **9**: 167-174 (1993).

PETERSEN, L.R., ROEHRIG, J.T. & HUGHES, J.M. West Nile virus encephalitis. *The New England Journal of Medicine* **347**: 1225-1226 (2002).

PLETNEV, S.V., ZHANG, W., MUKHOPADHYAY, S., FISHER, B.R., HERNANDEZ, R., BROWN, D.T., BAKER, T.S., ROSSMANN, M.G. & KUHN, R.J. Locations of carbohydrate sites on alphavirus glycoproteins show that forms an icosahedral scaffold. *Cell* **105**: 127-136 (2001).

PONTES, L., FORNELLS, L.A., GIONGO, V., ARAUJO, J.R.V., SEPULVEDA, A., VILLAS-BOAS, M., BONAFE, C.F.S. & SILVA, J.L. Pressure inactivation of animal viruses: potential biotechnological applications. Em: *High Pressure Research in the Bioscience and Biotechnology*. Ed. Heremans, K. Leuven University Press, Leuven, Belgium. pg. 91-94 (1997).

PREUGSCHAT, F. & STRAUSS, J.H. Processing of nonstructural proteins NS4A and NS4B of dengue 2 virus in vitro and in vivo. *Virology* **185**: 689-697 (1991).

PREUGSCHAT, F., YAO, C.W. & STRAUSS, J.H. In vitro processing of dengue virus type 2 nonstructural proteins NS2A, NS2B, and NS3. *Journal of Virology* **64**: 4364-4374 (1990).

PREVELIGE, P.E., KING, J. & SILVA, J.L. Pressure denaturation of the bacteriophage P22 coat protein and its entropic stabilization in icosahedral shells. *Biophysical Journal* **66**: 1631-1641 (1994).

PRIVALOV, P.L. Cold denaturation of proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**: 281-305 (1990).

PROUTSKI, V., GAUNT, M.W., GOULD, E.A. & HOLMES, E.C. Secondary structure of the 3'-untranslated region of yellow fever virus: implications for virulence, attenuation and vaccine development. *Journal General Virology* **78**: 1543-1549 (1997).

PUGACHEV, K.V., GUIRAKHOO, F., TRENT, D.W., MONATH, T.P. Traditional and novel approaches to flavivirus vaccines. *International Journal for Parasitology* **33**: 567-582 (2003).

RAMOS-CASTANEDA, J., IMBERT, J.L., BARRON, B.L. & RAMOS, C. A 65-kDa trypsin-sensible membrane cell protein as a possible receptor for Dengue virus in cultured neuroblastoma cells. *Journal of Neurovirology* **3**: 435-440 (1997).

REY, F.A., HEINZ, F.X., MANDL, C., KUNZ, C. & HARRISON, S.C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 ? resolution. *Nature* **375**: 291-298 (1995).

RICE, C.M., LENCHES, E.M., EDDY, S.R., SHIN, S.H. & STRAUSS, J.H. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* **229**: 726-733 (1985).

ROBERTSON, S.E., HULL, B.P., TOMORI, O., BELE, O., LEDUC, J.W., & ESTEVES, K. Yellow fever. A decade of reemergence. *Journal of the American Medical Association* **276**: 1157-1162 (1996).

ROBINSON, C.R. & SLIGAR, S.G. Hydrostatic and osmotic pressure as tools to study macromolecular recognition. Em *Methods in Enzymology: Energetics of Biological Macromolecules*, Vol. **259**. Academic Press, New York. pg. 395-427 (1995).

ROSEN, C.G. & WEBER, G. Dimer formation from 1-anilino-8-naphthalenesulfonate catalyzed by bovine serum albumin. A new fluorescent molecule with exceptional binding properties. *Biochemistry* **8**: 3915-3920 (1969).

ROSSMANN, M.G. & JOHNSON, J.E. Icosahedral RNA virus structure. *Annual Review Biochemistry* **58**: 533-573 (1989).

RUIGROK, R.W., MARTIN, S.R., WHARTON, S.A., SKEHEL, J.J., BAYLEY, P.M. & WILEY, D.C. Conformational changes in the hemagglutinin of influenza virus which accompany heat-induced fusion of virus with liposomes. *Virology* **155**: 484-497 (1986).

SAWYER, W.A., KITCHEN, S.F., FROBISHER, M.M. & LLOYD, W. Relationship of yellow fever of western hemisphere to that of Africa and leptospiral jaundice. *Journal of Experimental Medicine* **51**: 493-517 (1930).

SHOFF, W., HINFEY, P., BEHRMAN, A.J. & SHEPHERD, S. Yellow fever. *Emed. Journal* **2** (2001).

<http://www.emedicine.com/emerg/topic645.htm>

SHUKLA, D., LIU, J., BLAIKLOCK, P., SHWORAK, N.W., BAI, X., ESKO, J.D., COHEN, G.H., EISENBERG, R.J., ROSENBERG, R.D. & SPEAR, P.G. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* **99**: 13-22 (1999).

SILVA, J.L. & WEBER, G. Pressure stability of proteins. *Annual Review Phys. Chem.* **44**: 89-113 (1993).

SILVA, J.L. & WEBER, G. Pressure-induced dissociation of Brome Mosaic Virus. *Journal Molecular Biology* **199**: 149-161 (1988).

SILVA, J.L., FOGUEL, D. & ROYER, C.A. Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. *Trends in Biochemistry Science* **26**: 612-618 (2001).

SILVA, J.L., FOGUEL, D., DA POIAN, A.T. & PREVELIGE, P.E., JR. The use of hydrostatic pressure as a tool to study viruses and other macromolecular assemblages. *Current Opinion Structure Biology* **6**: 166-175 (1996).

SILVA, J.L., FOGUEL, D., SUAREZ, M., GOMES, A.M.O. & Oliveira, A.C. High-pressure applications in medicine and pharmacology. *Journal of Physics: Condensed Matter* **16**: S929-S944 (2004).

SILVA, J.L., LUAN, P., GLASER, M., VOSS, E.W. & WEBER, G. Effects of hydrostatic pressure on a membrane-enveloped virus: high immunogenicity of the pressure-inactivated virus. *Journal of Virology* **66**: 2111-2117 (1992).

SILVA, J.L., OLIVEIRA, A.C., GOMES, A.M.O., LIMA, L.M.T.R., MOHANA-BORGES, R., PACHECO, A.B.F. & FOGUEL, D. Pressure induces folding intermediates that are crucial for protein-DNA recognition and virus assembly. *Biochimica et Biophysica Acta* **1595**: 250-265 (2002).

SKEHEL, J.J. & WILEY, D.C. Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion. *Cell* **95**: 871-874 (1998).

SMITH, H.H., PENNA, H. & PAOLIELOLO, A. Yellow fever vaccination with cultured virus (17D) without immune serum. *American Journal of tropical Medicine and Hygiene* **18**: 437-468 (1938).

SOLOMON, T., DUNG, N.M., KNEEN, R., GAINSBOROUGH, M., VAUGHN, D.W. & KHANH, V.T. Japanese encephalitis. *Journal of Neurological and Neurosurgical Psychiatry* **68**: 405-415 (2000).

SOLOMON, T., OOI, M.H., BEASLEY, D.W. & MALLEWA, M. West Nile encephalitis. *BMJ* **326**: 865-869 (2003).



SOPER, F.L. & SMITH, H.H. Vaccination with virus 17D in the control of jungle yellow fever in Brazil. *Transactions of the Third International Congress of tropical Medicine and Malaria*, Amsterdam, **1**: 295-313 (1938).

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

STIASNY, K., ALLISON, S.L., MANDL, C.W. & HEINZ, F.X. Role of metastability and acidic pH in membrane fusion by tick-borne encephalitis virus. *Journal of Virology* **75**: 7392-7398 (2001).

STIASNY, K., ALLISON, S.L., MARCHLER-BAUER, A., KUNZ, C. & HEINZ, F.X. Structural requirements for low-pH-induced rearrangements in the envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus. *Journal of Virology* **70**: 8142-8147 (1996).

STOKES, A., BAUER, J.H. & HUDSON, J.H. Transmission of yellow fever to Mcaucus rhesus. *JAMA* **90**: 253-254 (1928).

STRAUB, O.C. Infectious bovine rhinotracheitis. Em: Virus Infections of Ruminants (Dinter, A & Morein, B., eds.), pp. 71-108. Elsevier, Amsterdam (1990).

STRAUSS, J.H. & STRAUSS, E.G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiology Reviews* **58**: 491-562 (1994).

SUAREZ, M.C., LEHRER, S.S. & SILVA, J.L. Local heterogeneity in the pressure denaturation of the coiled-coil tropomyosin because of subdomain folding units. *Biochemistry* **40**:1300-1307 (2001).

THEILER, M. & DOWNS, W.G. Part II. The arthropod-borne viruses of vertebrates: an account of the Rockefeller Foundation Virus Program 1951-1970. Yale University Press, New Haven, CT (1973).

THEILER, M. & SMITH, H.H. The effect of prolonged cultivation in vitro upon the pathogenicity of yellow fever virus. *Journal of Experimental Medicine* **65**: 767-786 (1937a).

THEILER, M. & SMITH, H.H. The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. *Journal of Experimental Medicine* **65**: 787-800 (1937b).

THULLIER, P., DEMANGEL, C., BEDONELLE, H., MEGRET, F., JONAN, A., DEUBEL, V., MAZIE, J.C. & LAFAYE, P. Mapping of a dengue virus neutralizing epitope critical for the infectivity of all serotypes: insight into the neutralization mechanism. *Journal General Virology* **82**: 1885-1892 (2001).

TRICERRI, M.A., SANCHEZ, S.A., ARNULPHI, C., DURBIN, D.M., GRATTON, E. & JONAS, A. Interaction of apolipoprotein A-I in three different conformations with palmitoyl oleoyl phosphatidylcholine vesicles. *Journal of Lipid Research* **43**: 187-197 (2002).

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

WANG, E., WEAVER, S.C., SHOPE, R.E., TESH, R.B., WATTS, D.M. & BARRETT, A.D.T. Genetic variation in yellow fever virus: duplication in the 3' noncoding region of strains from Africa. *Virology* **225**: 274-281 (1996).

WEBER, G. Effects of temperature and pressure on molecular associations and on single peptide chain proteins. *Em Protein Interactions*, pp. 199-215, Chapman and Hall (1992).

WEBER, G. Thermodynamics of the association and the pressure dissociation of oligomeric proteins. *Journal Phys. Chem.* **97**: 7108-7115 (1993).

WEBER, G. & DRICKAMER, H.G. The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules. *Q. Rev. Biophys.* **16**: 89-112 (1983).

WEBER, G. & FARRIS, F.J. Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene. *Biochemistry* **18**: 3075-3078 (1979).

WEISSENHORN, W., DESSEN, A., CALDER, L.J., HARRISON, S.C., SKEHEL, J.J. & WILEY, D.C. Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses. *Molecular Membrane Biology* **16**: 3-9 (1999).

WENGLER, G., CASTLE, E., LEIDNER, U., NOWAK, T. & WENGLER, G. Sequence analysis of the membrane protein V3 of the flavivirus west nile virus and of its gene. *Virology* **147**: 264-274 (1985).

WENGLER, G. & WENGLER, G. Terminal sequences of the genome and replicative-from RNA of the flavivirus west nile virus: absence of poly(A) and possible role in RNA replication. *Virology* **113**: 544-555 (1981).

WENGLER, G. & WENGLER, G. The NS3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. *Virology* **197**: 265-273 (1993).

WILSON, I.A., SKEHEL, J.J. & WILEY, D.C. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* **289**: 366-373 (1981).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Fact sheet no. 117 (1998).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Yellow fever factsheet. (2001)  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/> (2001).

YAMSHCHIKOV, V.F. & COMPANS, R.W. Formation of the flavivirus envelope: role of the viral NS2B-NS3 protease. *Journal of Virology* **69**: 1995-2003 (1995).

ZHANG, J., PENG, X., JONAS, A. & JONAS, J. NMR study of the cold, heat, and pressure unfolding of ribonuclease A. *Biochemistry* **34**: 8631-8641 (1995).

ZHANG, W., CHIPMAN, P.R., CORVER, J., JOHNSON, P.R., ZHANG, Y., MUKHOPADHYAY, S., BAKER, T.S., STRAUSS, J.H., ROSSMANN, M.G. & KUNH, R.J. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nature Structural Biology* **10**: 907-912 (2003a).

ZHANG, Y., CORVER, J., CHIPMAN, P.R., ZHANG, W., PLETNEV, S.V., SEDLAK, D., BAKER, T.S., STRAUSS, J.H., KUHN, R.J. & ROSSMANN, M.G. Structures of immature flavivirus particles. *The EMBO Journal* **22**: 2604-2613 (2003b).