

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

EMILIANA PEREIRA ABRÃO

**Estudo da detecção de interferência viral entre os vírus dengue-2 e
febre amarela**

Ribeirão Preto - SP

2008

EMILIANA PEREIRA ABRÃO

Estudo da detecção da Interferência viral entre os vírus dengue-2 e febre
amarela

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, para
a obtenção do título de Doutor em Ciências – Área
de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.
Opção Bioagentes Patogênicos

Orientador: Prof. Dr. Benedito Antônio Lopes da
Fonseca

Ribeirão Preto - SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Abrão, Emiliana Pereira

Estudo da detecção de interferência viral entre os vírus dengue-2 e febre amarela.

125p. il., 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Fonseca, Benedito Antônio Lopes.

1. Vírus Dengue-2
2. Vírus da febre amarela
3. PCR em tempo real

Dedicatória

Ao meu filho amado: **Gabriel**. Por me trazer tantas alegrias, pelo seu amor puro e sincero, pelo seu sorriso diário que me enche de alegria e, sobretudo por ter me feito uma pessoa melhor.

Ao amor da minha vida: **Cláudio**. Por me fazer tão feliz e realizada, por ser meu companheiro leal, por ter me ensinado tantas coisas! Eu te amo.

Aos meu pais: **Valdete e Paulo**. Pela extrema dedicação aos filhos. Pelo exemplo de vida e luta. Pelos valores que carregarei pelo o resto de minha vida. Obrigada por tudo! Eu amo vocês!

Aos meus irmãos: **Lila, Paulinho e Juliano**. Porque simplesmente sinto uma imensa alegria e segurança em saber que os tenho sempre ao meu lado, apesar da distância. Eu amo vocês!

Agradecimentos especiais

Agradeço ao **Prof. Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca**, antes de tudo pela oportunidade e confiança depositada em mim. Obrigada pelos ensinamentos e por ter sido meu maior incentivador ao longo desse trabalho. Obrigada pelo convívio, pela paciência, pelos conselhos e apoio durante os momentos difíceis enfrentados ao longo desse período. Um profissional admirável pela sua competência, mas, sobretudo pelo seu lado humano. Sou muito grata a você!

Agradecimentos

Acima de tudo agradeço a Deus por sempre ter me dado a serenidade, força e a coragem de seguir em frente diante de todas as dificuldades enfrentadas.

Aos membros da banca examinadora pelo empenho nas correções de minha tese e, sobretudo pela disponibilidade de participarem de minha defesa.

Ao Curso de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da FMRP – USP, na pessoa de seus Professores e Funcionários pelos ensinamentos.

À secretária da pós-graduação Ana Cristine, pelo apoio, orientação e carinho.

Aos companheiros e amigos do Laboratório de Virologia Molecular: Mariana, Maira, Paula, Kleber, Rafael, Teresa, Camila, Alessandra, Patrícia, Cláudio, Nathália. Muito obrigada a todos pela convivência alegre que tivemos, pela ajuda que recebi de cada um de vocês e que se fez em todos os sentidos inclusive de babá!

Às queridas Juliana e Vanessa tão especiais, doces e prestativas. Muito obrigada pelo apoio em vários momentos!

A todos do Centro de Pesquisa em Virologia, pela ajuda e convivência agradável.

À D. Maria, técnica do laboratório pelo carinho, deliciosas roscas, doces e também pela organização do laboratório.

Aos amigos Dani e Keny, Harnoldo e Raquel, Patrícia e Pierre: pela sincera amizade, pelo apoio, pelo delicioso convívio. Vocês são a nossa família em Ribeirão!

Às amigas de sempre: Rosana e Lêle, por estarem sempre por perto.

À CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro na realização desse trabalho.

Rios sem Discurso

Quando um rio corta, corta-se de vez o discurso-rio de água que ele fazia; cortado, a água se quebra em pedaços, em poços de água, em água parálitica. Em situação de poço, a água equivale a uma palavra em situação dicionária: isolada, estanque no poço dela mesma, e porque assim estanque, estancada; e mais: porque assim estancada, muda, e muda porque com nenhuma comunica, porque cortou-se a sintaxe desse rio, o fio de água por que ele discorria.

O curso de um rio, seu discurso-rio, chega raramente a se reatar de vez; um rio precisa de muito fio de água para refazer o fio antigo que o fez. Salvo a grandiloquência de uma cheia lhe impondo interina outra linguagem, um rio precisa de muita água em fios para que todos os poços se enfrasem: se reatando, de um para outro poço, em frases curtas, então frase e frase, até a sentença-rio do discurso único em que se tem voz a seca ele combate.

Portanto, que meu discurso-rio, pleno de outros discursos, com toda sua abundância, siga seu curso preciso e desagüe em algum lugar onde a seca possa combater.

João Cabral de Melo Neto

ÍNDICE

| | |
|--|-------------|
| Lista de Figuras | xi |
| Lista de Tabelas | xiii |
| Resumo..... | xiv |
| Abstract..... | xv |
| Lista de Abreviaturas | xvi |
| | |
| I – Introdução | 1 |
| 1.1 – Histórico..... | 1 |
| 1.1.1 Febre amarela..... | 2 |
| 1.1.2 Dengue..... | 3 |
| 1.2 - Agentes etiológicos: DENV e VFA | 5 |
| 1.2.1 Características gerais do <i>Flavivirus</i> | 5 |
| 1.2.1.1 Vírus da febre amarela (VFA) | 10 |
| 1.2.1.2 Vírus dengue (DENV)..... | 11 |
| 1.3 – Ciclos de transmissão..... | 11 |
| 1.3.1 VFA..... | 11 |
| 1.3.2 DENV | 13 |
| 1.4 – Manifestações Clínicas..... | 14 |
| 1.4.1 Febre amarela..... | 14 |
| 1.4.2 Dengue..... | 16 |
| 1.5 – Prevenção | 18 |
| 1.5.1 Febre amarela..... | 18 |
| 1.5.2 Dengue..... | 21 |
| 1.6 – Epidemiologia | 22 |
| 1.6.1 Febre amarela..... | 22 |
| 1.6.2 Dengue..... | 23 |
| 1.7 – Riscos da reurbanização da febre amarela no Brasil | 24 |
| 1.8 – Interferência Viral | 27 |

| | |
|--|-----------|
| II – Objetivos | 31 |
| 2.1 – Objetivo Geral..... | 32 |
| 2.2 – Objetivos específicos..... | 32 |
| | |
| III – Materiais e Métodos | 33 |
| 3.1 – Cultura celular | 34 |
| 3.1.1 Cultura de células C6/36..... | 34 |
| 3.1.2 Cultura de células Vero..... | 34 |
| 3.1.3 Cultura de células U937 | 34 |
| 3.2 – Produção de estoques virais | 35 |
| 3.2.1. Estoques produzidos em cultura celular..... | 35 |
| 3.2.2. Estoques produzidos em cérebro de camundongos | 35 |
| 3.3 – Titulação viral | 36 |
| 3.4 – Otimização da reação: transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)..... | 38 |
| 3.4.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers)..... | 38 |
| 3.4.2 One-Step RT-PCR e avaliação da especificidade dos primers..... | 40 |
| 3.5 – PCR em tempo real | 41 |
| 3.5.1 Padronização das curvas-padrão..... | 42 |
| 3.5.2 Extração do RNA viral..... | 42 |
| 3.6 – Clonagem dos vírus DEN-2 e YF 17D..... | 43 |
| 3.6.1 One-Step RT-PCR | 43 |
| 3.6.2 Purificação do Produto da PCR | 44 |
| 3.6.3 Reação de ligação vetor/inserto..... | 44 |
| 3.6.4 Preparo das Bactérias Competentes..... | 45 |
| 3.6.5 Transformação Bacteriana | 45 |
| 3.6.6 Extração do DNA plasmidial..... | 46 |
| 3.6.7 Confirmação da clonagem | 46 |
| 3.6.8 Curva-padrão a partir do plasmídeo..... | 47 |
| 3.7 – Padronização da Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) para VFA17D ... | 47 |
| 3.7.1 Produção de anticorpos anti-VFA17D em coelhos..... | 47 |
| 3.7.2 Determinação do título de anticorpos anti-VFA17D | 48 |
| 3.7.3 Purificação dos anticorpos produzidos..... | 49 |
| 3.7.4 Cultivo e Infecção das células..... | 50 |
| 3.7.5 Reação de Imunofluorescência Indireta para detecção de VFA17D..... | 50 |

| | |
|---|-----------|
| 3.8 – Ensaio de Interferência Viral..... | 51 |
| 3.8.1 Interferência viral em C6/36: DENV-2 e VFA17D / DENV-2 e VFABeH111 | 51 |
| 3.8.1.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) | 53 |
| 3.8.1.2 Extração do RNA viral..... | 54 |
| 3.8.1.3 Quantificação absoluta – PCR Tempo Real..... | 54 |
| 3.8.1.4 Análise da morfologia celular: microscopia óptica comum | 54 |
| 3.8.2 Ensaio de interferência viral C6/36 utilizando reação de IFI..... | 54 |
| 3.9 – Ensaio de competição..... | 55 |
| 3.10 – Ensaio de Interferência viral em U937 | 56 |
| 3.10.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) | 57 |
| 3.10.2 Extração do RNA viral | 57 |
| 3.10.3 PCR em Tempo Real | 57 |
| 3.11 – Análise estatística..... | 58 |
| IV – Resultados | 59 |
| 4.1 – Titulação viral por unidades formadores de placas (PFU)..... | 60 |
| 4.2 - Otimização da Reação: Transcrição Reversa seguida por reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e avaliação da especificidade dos 4.3 – PCR em Tempo Real | 60 |
| 4.3 – PCR em Tempo Real..... | 61 |
| 4.3.1 Padronização das curvas-padrão..... | 61 |
| 4.4 – Clonagem do vírus da febre amarela e dengue..... | 64 |
| 4.5 – Padronização da Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) para detecção de infecção por VFA..... | 66 |
| 4.5.1 Determinação do título dos anticorpos anti-VFA17D..... | 66 |
| 4.5.2 Reação de IFI para VFA..... | 67 |
| 4.6 – Ensaio de Interferência viral em C6/36..... | 68 |
| 4.6.1 Interferência viral entre VFA17D e DENV-2 | 68 |
| 4.6.2 Análise da Morfologia Celular | 73 |
| 4.6.3 Visualização da interferência viral utilizando reação de IFI: VFA17D e DENV-2..... | 76 |
| 4.6.4 Interferência viral entre VFABeH111 e DENV-2..... | 78 |
| 4.7 – Ensaio de competição | 81 |
| 4.7.1 Competição entre VFA17D e DENV-2 | 81 |
| 4.7.2 Competição entre DENV-2 e VFABeH111 | 83 |
| 4.8 – Ensaio de Interferência viral em células de mamíferos: linhagem U937 .. | 85 |

| | |
|--|------------|
| V – Discussão..... | 89 |
| VI – Conclusões | 98 |
| VII – Referências Bibliográficas..... | 100 |
| VIII – Anexo..... | 109 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Representação esquemática da estrutura genômica e expressão dos <i>Flavivirus</i> | 7 |
| Figura 2 - Ciclo de replicação dos <i>Flavivirus</i> | 10 |
| Figura 3 - Representação esquemática do ciclo de transmissão do VFA América do Sul..... | 13 |
| Figura 4 - Seqüência completa da 3´NCR do DENV-2 | 39 |
| Figura 5 - Seqüência completa da 3´NCR do VFA17D | 39 |
| Figura 6 - Reação de PCR para análise de especificidade do oligonucleotídeos ... | 61 |
| Figura 7 - Representação de uma curva padrão obtida a partir da diluição de estoques virais previamente titulados | 62 |
| Figura 8 - Gráfico da emissão de fluorescência gerado por incorporação de corante fluorogênico SYBR Green em dupla fita de DNA resultante da amplificação do alvo | 63 |
| Figura 9 - Curva de dissociação para análise da especificidade da reação..... | 64 |
| Figura 10 - Gel de agarose 0.8% representando a confirmação da clonagem do fragmento de VFA17D via análise de restrição..... | 65 |
| Figura 11 - Gel de agarose 0.8% representando a confirmação da clonagem do fragmento de DENV-2 via análise de restrição | 65 |
| Figura 12 - Reação de IFI para detecção do vírus YF | 67 |
| Figura 13 - Perfil de replicação de DENV-2 e VFA17D..... | 69 |
| Figura 14 - Interferência viral DENV-2 /VFA17D..... | 71 |
| Figura 15 - Interferência viral VFA17D /DENV-2..... | 72 |
| Figura 16 - Morfologia das células C6/36 em microscopia de campo claro | 74 |
| Figura 17 - Morfologia das células C6/36 em microscopia de campo claro | 75 |
| Figura 18 - Reação de IFI em ensaio de interferência viral..... | 77 |
| Figura 19 - Perfil de replicação de VFABeH111 e DENV-2 | 79 |
| Figura 20 - Interferência viral DENV-2 /VFABeH111 | 80 |

| | |
|---|----|
| Figura 21 - Ensaios de competição entre DENV-2 e VFA17D | 82 |
| Figura 22 - Ensaios de competição entre DENV-2 e VFABeH111 | 84 |
| Figura 23 - Perfil de replicação de VFA17D e DENV-2 em U937 | 86 |
| Figura 24 - Interferência viral DENV-2 /VFA17D em células U937 | 87 |
| Figura 25 - Interferência viral VFA17D /DENV-2 em células U937 | 88 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 01: Seqüência dos oligonucleotídeos <i>sense</i> e <i>anti-sense</i> amplificadores de VFA e DENV2 e a região de amplificação | 40 |
| Tabela 02: Títulos virais dos estoques dos vírus DENV-2 <i>New Guinea C</i> e VFA cepas 17D e BeH111 | 60 |
| Tabela 03: Valores em absorbância do título dos anticorpos nos coelhos 1, 2 e controle nas diferentes diluições | 66 |

RESUMO

A dengue é a mais importante doença causada por um arbovírus. Anualmente as infecções com o vírus dengue ocasionam aproximadamente 100 milhões de casos de dengue clássico e mais de 500 mil de dengue hemorrágico em todo o mundo (Halstead, 2007)). O principal vetor urbano dos vírus dengue é o mosquito *Aedes aegypti* (*Ae aegypti*), que se caracteriza por seu perfil altamente doméstico.

Da mesma forma que a dengue, outra arbovirose de semelhante importância é a febre amarela. Esta se caracteriza por ser uma doença infecciosa aguda, prevalente nas Américas e África. Manifesta-se nas modalidades urbana e silvestre e é causada pelo vírus da febre amarela, um arbovírus transmitido pelos mosquitos *Aedes aegypti* (no caso da modalidade urbana) e *Ae. africanus*, *Haemagogus* e outros (no caso da modalidade silvestre).

Com relação à febre amarela, embora uma vacina segura esteja disponível há 60 anos, houve um aumento no número de pessoas infectadas desde o início da década de 1980 em países da América do Sul, incluindo o Brasil. No entanto, o ciclo urbano da doença não tem sido detectado por mais de meio século no país. Algumas hipóteses têm sido investigadas para se tentar explicar essa ausência de epidemias no Brasil, embora nenhuma delas tenha sido efetivamente comprovada.

Este trabalho teve como objetivo estudar este achado epidemiológico através da análise "in vitro" de um fenômeno conhecido como interferência viral, uma situação em que a infecção por um determinado tipo viral impede a infecção das mesmas células por um vírus diferente. Desta forma, foi estudada a influência dos vírus dengue sorotipo 2 (DENV-2) e febre amarela cepa vacinal 17D (VFA17D) e selvagem (BeH111) em uma mesma cultura de células C6/36 (células provenientes de *Aedes albopictus*) e células U937, analisando-se as dinâmicas de replicações virais.

Observamos que células derivadas de *Ae albopictus* cronicamente infectadas com DENV-2 não se apresentam permissivas à replicação do VFA, cepas 17D e BeH111. Porém, em ensaios de competição entre os dois vírus observamos uma maior eficiência de replicação de VFA17D e VFABeH111 em relação ao DENV-2. Finalmente, os ensaios de interferência viral envolvendo linhagens de células de mamífero U937 demonstraram uma ligeira diminuição da replicação de VFA17D em células cronicamente infectadas com DENV2.

ABSTRACT

Dengue is the most important disease caused by an arbovirus worldwide. Each year dengue virus infection causes about 100 million cases of dengue fever and more than 500,000 of hemorrhagic dengue in the world (Halstead, 2007). The main vector of the urban dengue virus is the *Aedes aegypti* mosquito, characterized by a domestic profile.

Similarly to dengue, another arthropod-borne virus of similar importance is yellow fever. This disease is characterized by an acute infection, prevalent in the Americas and Africa. It exists either as an urban or a rural cycle and is caused by yellow fever virus, an arbovirus transmitted by mosquitoes *Aedes aegypti* (in the case of urban form) and *Ae. africanus*, *Haemagogus* and others (in the case of jungle cycle).

Concerning yellow fever, although a safe vaccine is available for 60 years, there was an increase in the number of infected people since the beginning of the 1980s in several South American countries, including Brazil. However, the urban cycle of this disease has not been detected for more than fifty years. Some hypotheses have been investigated in order to explain this lack of urban epidemics in Brazil, although none has been effectively proved.

The present study investigated this epidemiological finding by the "*in vitro*" analysis of a phenomenon known as viral interference, a situation where the infection by a particular virus prevents the infection of the same cells by a different virus. Thus, we studied the influence of dengue virus serotype 2 (DENV-2) and two yellow fever strains, the VFA17D vaccine and a wild one, in the same culture of cells (C6/36 cells from *Aedes albopictus*), examining the dynamics of viral replication.

We observed that cells derived from *Ae. albopictus* chronically infected with DENV-2 are not permissive to replication of VFA, either the vaccine (17D) or wild-type (BeH111) strains. Nevertheless, in competition experiments between VFA and DENV-2 we found a greater replication efficiency of VFA17D and VFABeH111 compared to DENV-2. Finally, the viral interference experiments with the U937 mammalian cells showed a slight decrease in the replication of VFA17D in cells chronically infected with DENV2.

LISTA DE ABREVIATURAS

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

DENV-1 – Vírus dengue tipo 1

DENV-2 – Vírus dengue tipo 2

DENV-3 – Vírus dengue tipo 3

DENV-4 – Vírus dengue tipo 4

DNA – Ácido deoxiribonucléico

dNTPs – Deoxinucleotídeos

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

FD – febre do dengue

FHS – febre hemorrágica do dengue

FITC – isotiocianato de fluoresceína

IgG – imunoglobulina G

IFI – imunofluorescência indireta

MIAF – *mouse immuneascitic fluid*

MOI – *multiplicity of infection*

3'NCR – região 3' não codificadora

5'NCR – região 5' não codificadora

OMS – organização mundial da saúde

ORF – *open reading frame*

pb – pares de bases

PBS – tampão salina fosfato

PCR – reação em cadeia da polimerase

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa

RNA – ácido ribonucléico

SFB – soro fetal bovino

SVS – secretaria de vigilância em saúde

TRITC - *Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate*

TA – temperature ambiente

I – INTRODUÇÃO

1.1 – Histórico

1.1.1 Febre amarela

Os relatos mais antigos envolvendo descrições que se assemelham à febre amarela foram encontrados em manuscritos Maias datados do ano de 1648 em Yucatan, México (Monath, 2001; Barrett & Higgs, 2007). Porém, análises refinadas envolvendo sequenciamento genômico, revelam que o vírus da febre amarela (VFA) originou-se na África, aproximadamente há 3000 anos (Zanotto *et al.*, 1996).

O termo febre amarela foi provavelmente utilizado pela primeira vez por Griffin Hughes, em seu livro *História Natural de Barbados* (1750) e mais de 100 anos depois, em 1885, Torres Homem sugeriu que a doença tinha caráter infeccioso, mas não era contagiosa. Porém, a constatação de que o vírus da febre amarela tinha como vetor mosquitos da espécie *Aedes aegypti* foi mostrada por Finlay, em 1881, e confirmada no início do ano de 1900 por Walter Reed e colaboradores (Prata, 2000; Gubler, 2007; Lindenbach, 2007). O isolamento viral foi realizado somente em 1927 em Gana, África, através da inoculação de sangue de um paciente infectado, em macacos *Rhesus*. A cepa foi denominada *Asibi* (Barrett & Higgs, 2007). Finalmente a descrição do ciclo silvestre do VFA resultou de uma epidemia no Vale do Canaã, Brasil, em 1932, onde nenhum mosquito da espécie *Ae. aegypti* foi encontrado (Barrett & Higgs, 2007).

No Brasil, o vírus da febre amarela causou graves epidemias durante o século XVII. Acredita-se que o vírus tenha sido introduzido nas Américas, juntamente com o seu transmissor, por navios vindos da África durante o tráfico de escravos. Várias cidades da costa brasileira foram afetadas por períodos de graves epidemias, sendo que a primeira delas data de 1685 em Pernambuco, relatada por João Ferreira da

Rosa. Epidemias reapareceram em 1849 no estado da Bahia e Rio de Janeiro em 1850 (Prata, 2000; Figueiredo, 2007). A dimensão dessas epidemias pode ser constatada em manuscritos que relatam que, no período de 1850 a 1902, na cidade do Rio de Janeiro, as epidemias de febre amarela levaram a óbito aproximadamente um terço da população (Figueiredo, 2000; Prata, 2000; Figueiredo, 2007).

O início do século XX presenciou a campanha de erradicação do *Aedes aegypti* em várias partes da América como, por exemplo, em Havana e durante a construção do canal do Panamá (Prata, 2000). No Brasil, a campanha foi coordenada por Emílio Ribas, no estado de São Paulo e por Oswaldo Cruz, no estado do Rio de Janeiro e na região Sudeste do país (Figueiredo, 2000; Prata, 2000), resultando em uma significativa redução de casos por todo o país (Figueiredo, 2000; Vasconcelos, 2003; Figueiredo, 2007). Sendo assim, a última grande epidemia de febre amarela urbana relatada no Brasil ocorreu em 1929 no Rio de Janeiro, embora alguns casos envolvendo o ciclo urbano da doença tenham sido registrados em Sena Madureira no Acre, em 1942 (Gubler, 2002; Vasconcelos, 2003).

Em 1937, uma vacina segura e eficaz foi desenvolvida por Max Theiler, passando a ser produzida no Brasil a partir de 1938 pelo Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro (Figueiredo, 2000).

1.1.2 Dengue

Embora existam relatos envolvendo uma doença com características clínicas prováveis de uma infecção pelo vírus dengue há vários séculos, a primeira descrição detalhada da dengue foi feita por Benjamin Rush, em 1780 (Gubler, 1997). As primeiras epidemias da doença foram relatadas entre os anos 1779 e 1780, em

países da Ásia, como Batavia (Jakarta) e Indonésia, regiões da América do Norte, como Filadélfia e finalmente na África, como Cairo, no Egito (Henchal & Putnak, 1990; Gubler, 1998).

Acredita-se que as pandemias de dengue que se seguiram no mundo tropical tiveram sua origem na Ásia e outras regiões do Pacífico durante e após a II Guerra Mundial (Gubler, 1997; Guzman & Kouri, 2003). Fatores relacionados a alterações ecológicas, favorecendo a expansão e o aumento da densidade dos vetores, assim como alterações demográficas e sociais, foram pontos cruciais para facilitar a dispersão da doença (Guzman & Kouri, 2003; Mackenzie *et al.*, 2004). As epidemias pós II Guerra também trouxeram um aumento da incidência de um padrão mais severo da doença, com a primeira descrição da sua forma hemorrágica ocorrido nas Filipinas, em 1954 (Henchal & Putnak, 1990).

No Brasil, os relatos das primeiras epidemias ocorreram desde o século XVIII. Referência a primeira provável epidemia de dengue data de 1846, na cidade do Rio de Janeiro, com descrições de manifestações clínicas características da infecção tais como: presença de febre, mialgia e artralgia. Em 1922 há relatos de uma epidemia naquele mesmo estado (para uma revisão: Figueiredo, 2000).

A campanha de erradicação do transmissor da doença, *Aedes aegypti*, foi iniciada por Oswaldo Cruz em 1904. Este instituiu as brigadas sanitárias, que tinham como objetivo detectar os casos de febre amarela e eliminar os focos do mosquito. No entanto, esta campanha também teve importante impacto no controle da dengue durante a primeira metade do século XX. Mas foi somente com o incentivo e o suporte financeiro da Fundação Rockefeller no país que se alcançou a completa erradicação do vetor, confirmada em 1955 (para revisão: Figueiredo, 2000 e Braga &

Valle, 2007). No entanto, em 1967, confirmou-se a reintrodução do vetor no país, no estado do Pará e em 1969 para o Maranhão (Braga & Valle, 2007).

O reaparecimento das epidemias de dengue começou no ano de 1981, na cidade de Boa Vista, Roraima, com a detecção dos sorotipos 1 e 4 no país (Osanai *et al.*, 1983; Figueiredo, 2000; Camara *et al.*, 2007)). Novas epidemias ocorreram nos anos 1986-1987, nas regiões SE, no Rio de Janeiro e NE, em Alagoas e Ceará, causadas pelo vírus do sorotipo 1 (Schatzmayr *et al.*, 1986; Vasconcelos *et al.*, 1995). Em 1990-1991 constatou se a entrada do sorotipo 2 (Nogueira *et al.*, 1990), em 2001-2002 a presença do sorotipo 3 (Nogueira *et al.*, 2001), ambas em epidemias iniciadas no Rio de Janeiro.

1.2 - Agentes etiológicos: DENV e VFA

1.2.1 Características gerais do *Flavivirus*

O gênero dos *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, é composto por 53 espécies virais, sendo que 27 delas são transmitidas por mosquitos, 12 por carrapatos e 14 que não se sabe o mecanismo de transmissão (Gubler, 2007). Dessa forma, os membros desse gênero são, em sua maioria, arbovírus – *arthropod born virus* - ou seja, vírus que necessitam de artrópodes hematófagos completarem o seu ciclo de vida (Mackenzie *et al.*, 2004). Os vírus pertencentes a esse gênero causam uma ampla variedade de doenças que incluem febres, encefalites e febres hemorrágicas (Lindenbach, 2007).

A evolução dos *Flavivirus* transmitidos por mosquitos permitiu classificá-los em dois principais grupos, distinguidos entre si através de suas apresentações clínicas em humanos e também por sua ecologia (Gubler, 2007). Os *Flavivirus*

causadores de encefalite estão agrupados no sorogrupo da encefalite japonesa que incluem: vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus do Oeste do Nilo (WNV), Murray Valley encephalitis vírus (MVEV) e vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV). São todas viroses zoonóticas que possuem pássaros como hospedeiros vertebrados e mosquitos da espécie *Culex* como vetor. Nenhum dos vírus desta clade possuem um ciclo envolvendo primatas. O outro sorogrupo inclui os vírus isolados de *Aedes*, como os vírus dengue (DENV) e o vírus da febre amarela (VFA), que caracterizam por seus efeitos patológicos mais relacionados ao viscerotropismo e às febres hemorrágicas. Porém, nenhum dos vírus desta clade são conhecidos por infectar pássaros (Gubler *et al.*, 2007).

Os vírus pertencentes à família *Flaviviridae* compartilham similaridades no que se refere à morfologia do vírion, organização do genoma viral e estratégias de replicação. Desta forma, os vírus dengue e febre amarela, morfologicamente, se apresentam como partículas pequenas e esféricas, de aproximadamente 50nm de diâmetro e com um envelope viral composto de uma bicamada lipídica derivada da membrana da célula hospedeira (Henchal & Putnak, 1990; Monath, 2001; Kuhn *et al.*, 2002; Gubler, 2007). A superfície da partícula viral contém duas proteínas: a glicoproteína E, usualmente glicosilada, que representa o principal determinante antigênico do vírus e é responsável pela ligação e fusão durante a infecção viral, e a proteína M, não glicosilada, que é um fragmento proteolítico gerado a partir de uma proteína precursora prM durante a maturação das progênes virais (Rice *et al.*, 1985; Monath, 2001). Logo abaixo do envelope observa-se um nucleocapsídeo, de simetria icosaédrica e aproximadamente 30nm, composto pelas proteínas do core C, que envolvem o genoma viral (Kuhn *et al.*, 2002).

A primeira análise completa da seqüência genômica do cDNA de um *flavivirus* foi realizada para o vírus da febre amarela por Rice e cols, 1985. O genoma do vírus em questão apresentou 10862 nucleotídeos de extensão e uma *open reading frame* (ORF) de 10233 nucleotídeos, que codifica um polipeptídeo de 3.411 aminoácidos (Rice *et al.*, 1985). Portanto, podemos dizer que o genoma dos *Flavivirus* consiste de uma fita simples de RNA, de polaridade positiva, com aproximadamente 11Kb de extensão, traduzida em uma única poliproteína viral, e clivada, durante e após a tradução, por proteases de origem viral e também da célula hospedeira. As extremidades desse genoma possuem seqüências curtas não codificadoras nas posições N-terminal e C-terminal denominadas: 3'-NC e 5'-NC, respectivamente. Por sua vez, essas seqüências não traduzíveis flanqueiam genes que vão codificar as proteínas estruturais do vírus, tais como as proteínas C, prM e E, assim como 7 proteínas não estruturais, tais como NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 na ordem 5' -C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5- 3' (Figura 1) (Svitkin *et al.*, 1978; Rice *et al.*, 1985; Henschal & Putnak, 1990; Monath, 2001; Gubler, 2007; Wilkins, 2007).

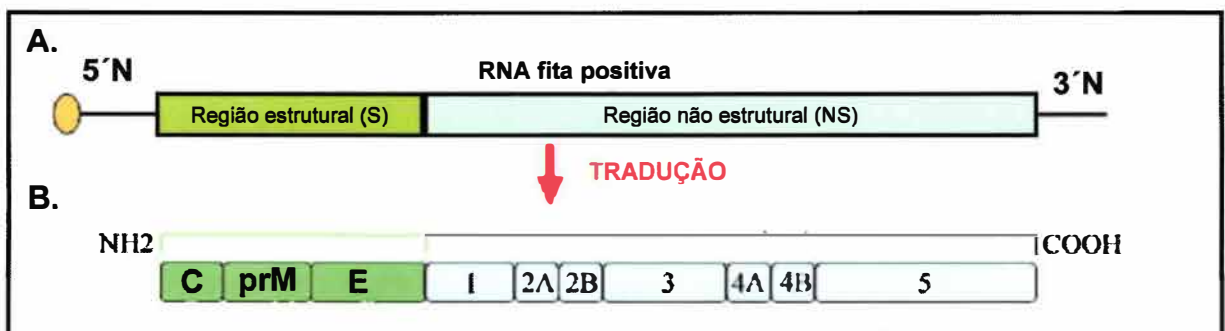


Figura 1: Representação esquemática da estrutura genômica e expressão protéica dos *Flavivirus*. A. Estrutura do genoma e elementos do RNA viral. B. Processamento da poliproteína e produtos de clivagem. O genoma de RNA senso positivo codifica para uma poliproteína que quando clivada gera 10 proteínas: sendo 3 estruturais (C, M, e E) e 7 não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, e NS5).

Dentre as proteínas estruturais, a glicoproteína E do envelope desempenha um papel central na geração de anticorpos neutralizantes e indução da resposta imune do hospedeiro. Além disso, essa proteína é responsável por mediar a fase inicial da infecção, caracterizada pela ligação ao receptor ou moléculas de superfície da célula hospedeira, assim como a fusão com a membrana celular (Monath, 2001; Rey, 2003; Lindenbach, 2007). A proteína C, com peso molecular de 12 a 14 kDa, pelo seu caráter altamente básico, interage com o RNA viral para formar o nucleocapsídeo. A glicoproteína prM, com peso molecular de 18,1 a 19,1 kDa, após sofrer clivagem na sua porção N-terminal, dá origem à proteína M, de aproximadamente 8,5 kDa, encontrada somente nos vírus maduros. Essa é uma das duas proteínas que formam o envelope viral participando na penetração do vírus na célula hospedeira (Chambers *et al.*, 1990)

Dentre as 7 proteínas não estruturais (NS1-NS5), alguns papéis já se encontram bem definidos. A NS1 realiza a maturação viral e pode ser encontrada na superfície da célula hospedeira e também no meio extracelular, após sua secreção (Chambers *et al.*, 1990). Embora as funções da NS1 não tenham sido claramente definidas, estudos com mutantes sugerem participação na fase precoce da replicação viral e na virulência (Pletnev *et al.*, 1993; Lindenbach, 2007). As infecções com *Flavivirus* induzem anticorpos anti-NS1 fixadores do complemento, contra epítomos tipo-específicos e grupo-específicos, alguns dos quais têm atividade protetora. A proteção parece ocorrer pela lise das células infectadas que expressam NS1 na superfície, via lise mediada pelo complemento dependente de anticorpo (Schlesinger *et al.*, 1993). A proteína NS2 é dividida nas porções NS2a e NS2b, sendo esta última portadora da atividade proteolítica. As proteínas NS3 e NS5 têm sido associadas aos processos de replicação e transcrição do RNA viral. Atividades

de protease e trifosfatase/helicase foram atribuídas à proteína NS3 (Chambers *et al.*, 1990; Lindenbach, 2007), e a atividade de RNA polimerase, à NS5 (Lindenbach, 2007). A proteína NS4 é clivada nas porções NS4a e NS4b e ambas, juntamente com a NS2a e NS2b, associam-se à membrana da célula infectada durante o processo de maturação viral (Gubler, 2007)

Com relação à replicação viral, poucos receptores que medeiam a interação dos *Flavivirus* com a célula hospedeira têm sido descritos, porém várias moléculas da superfície já foram propostas para a interação vírus-célula hospedeira. Com relação a receptores, alguns trabalhos recentes revelaram a necessidade da expressão de DC-SIGN (lectina específica de manose que interage com resíduos de carboidratos na proteína E) em células dendríticas (DC) como receptores primários para o DENV (Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Lindenbach, 2007). Recentemente, também foi descrita a interação do DC-SIGN com células dendríticas em infecção com o VFA, porém para ambos os vírus o DC-SIGN se mostrou como um receptor de ligação, mas não necessário para a internalização viral (Barba-Spaeth *et al.*, 2005; Lozach *et al.*, 2005). Outras descrições de supostas proteínas receptoras de *flavivirus* incluem GRP/78 (BiP) e CD14 (Mukhopadhyay *et al.*, 2005). Com relação às moléculas de superfície mostrou-se que a infecção viral também se faz via receptores do tipo glicosaminoglicano altamente sulfatados e presentes nas membranas de células alvo, tais como heparansulfato (Chen *et al.*, 1997; Kroschewski *et al.*, 2003). Dessa forma, o ciclo de replicação viral envolve a interação viral com a superfície da célula hospedeira e, subsequentemente, a internalização viral por endocitose via vesículas revestidas por clatrina. As vesículas recém-formadas trafegam em um compartimento endocítico pré-lisossomal, onde uma diminuição do pH intra-vesicular favorece a fusão envelope viral – membrana

hospedeiro e liberação do genoma no citoplasma celular para se iniciar a tradução e consequentemente a síntese de novas progênes virais (Figura 2) (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

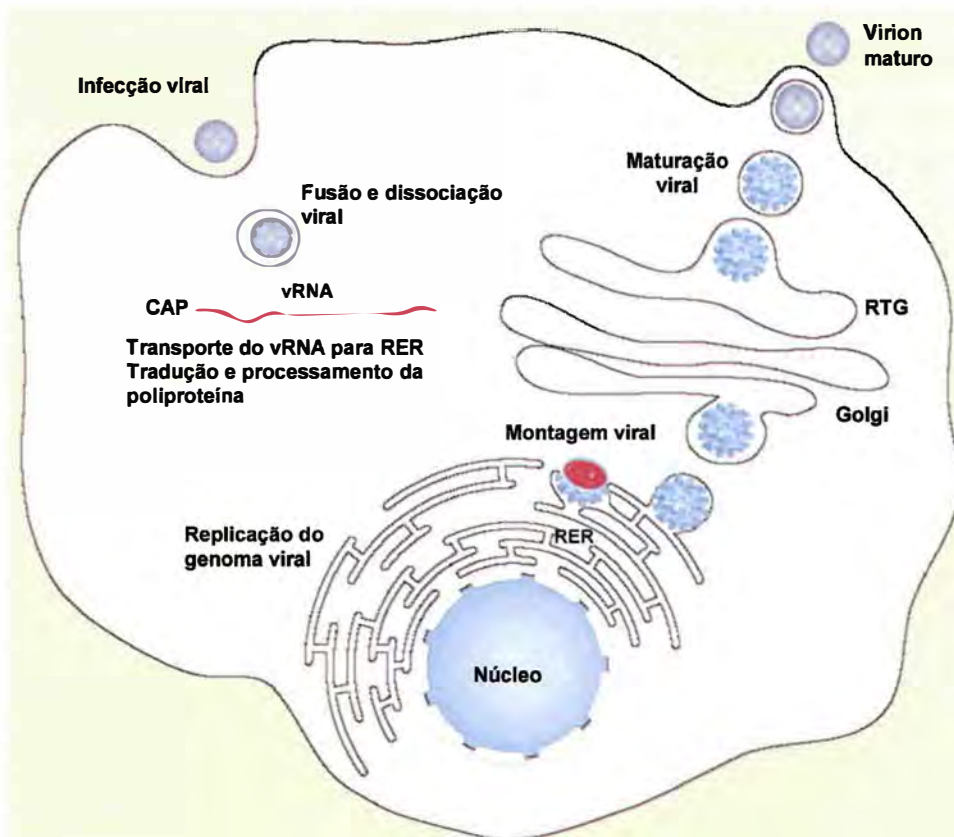


Figura 2 - Ciclo de replicação dos *Flavivirus* – Após a ligação do vírus na superfície celular, o vírus penetra na célula hospedeira via endocitose mediada por receptor formando uma vesícula pré-lisossomal; a acidificação da vesícula após fusão com lisossomos leva a uma mudança conformacional da glicoproteína E do vírus, que favorece a fusão do envelope viral com a membrana do endossomo e a dissociação do nucleocapsídeo; O genoma é liberado para o citoplasma e o ssRNA de polaridade positiva é traduzido em uma poliproteína. A partícula viral imatura segue através de vias secretoras, onde uma protease semelhante à furina cliva a proteína prM já nos compartimentos *trans* do complexo de Golgi, gerando a proteína M. Esta clivagem gera partículas maduras e infecciosas, que são então liberadas da célula por exocitose (Figura adaptada de MUKHOPADHYAY; 2005).

1.2.1.1 Vírus da febre amarela (VFA)

O vírus da febre amarela é o protótipo do gênero *Flavivirus* e é utilizado como modelo para elucidar fatores relacionados à replicação, estrutura genômica e outras características de vírus do mesmo gênero (Gubler, 2007). Como dito anteriormente,

a cepa vacinal 17D possui 10.863 nucleotídeos de extensão (Rice *et al.*, 1985). Porém, estudos genéticos das cepas de VFA utilizando-se técnicas moleculares, realizadas, inicialmente, por Deubel *et al.* (1986) e, posteriormente, por Chang *et al.* (1995), revelam variações genéticas entre as cepas virais associadas a diferentes regiões geográficas (Barrett & Higgs, 2007). Ao todo foram identificados 7 genótipos, baseados em uma variação nucleotídica maior ou igual a 9%, dos quais 5 estão presentes na África e dois na América do sul (Barrett & Higgs, 2007).

1.2.1.2 Vírus dengue (DENV)

O grupo sorológico dos vírus dengue foi classificado com base em ensaios de neutralização por redução de placas por Russel & Nisalak em 1967, sendo dividido em 4 sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Gubler, 2007). Os sorotipos são antigenicamente distintos, porém apresentam a mesma epidemiologia e causam doenças similares, não havendo uma imunidade protetora cruzada permanente entre eles. Dessa forma, indivíduos que vivem em áreas consideradas endêmicas, com a co-circulação dos 4 sorotipos podem adquirir, teoricamente, pelo menos 4 tipos de infecções virais ao longo de sua vida (Gubler, 2002; Mackenzie *et al.*, 2004)

1.3 – Ciclos de transmissão

1.3.1 VFA

A febre amarela pode ocorrer em um ciclo urbano, em que o vetor responsável pela transmissão, tanto nas Américas quanto na África, é o *Aedes aegypti*, e em um outro ciclo, silvestre, que se mostra bastante complexo, de maneira que os vetores responsáveis pelo ciclo diferem nos dois continentes

anteriormente citados (Vasconcelos, 2003). No ciclo urbano, um ser humano acidentalmente infectado, durante fase virêmica, pode ser fonte de infecção para vetores competentes presentes no ambiente urbano. Por sua vez, esses vetores infectados podem perpetuar a infecção ao se alimentarem do sangue de outro ser humano sadio. Dessa forma, o ciclo se repete até que se esgotem os susceptíveis ou se realize vacinação em massa da população como o objetivo de bloquear a transmissão viral (Vasconcelos, 2003). Dessa forma o ciclo urbano se resume a um ciclo do tipo homem-mosquito-homem (Figura 3).

O ciclo silvestre permanece pobremente compreendido em função de sua complexidade. Na África, as espécies de mosquitos que têm sido descritas no ciclo viral são os das espécies *Ae. africanus*, *Ae. furcifer*, *Ae. simpsoni*, dentre outros. Esses mosquitos são reservatórios virais, permanecendo infectados durante toda a sua vida, ao contrário do que ocorre com os macacos, que se comportam como hospedeiros amplificadores e, ao se infectarem, morrem ou se curam, ficando imunes a novas infecções (Barrett & Monath, 2003; Vasconcelos, 2003). Com relação à susceptibilidade à infecção no ciclo silvestre, parece que apenas primatas estão envolvidos no ciclo. Aqueles envolvidos no ciclo das Américas, freqüentemente, são sensíveis e susceptíveis ao vírus, sucumbindo à infecção, ao contrário das espécies presentes no continente africano que não desenvolvem nenhum sinal da doença (Barrett & Monath, 2003; Barrett & Higgs, 2007).

No Brasil, os principais vetores do ciclo silvestre são os mosquitos do gênero *Sabethes* e *Haemagogus*, sendo esse último o principal responsável pela transmissão da febre amarela. Esses vetores apresentam hábitos estritamente silvestres e picam, preferencialmente, macacos e, acidentalmente, o homem que invade o seu *habitat* (Vasconcelos, 2003). Com relação aos macacos, existe uma

diferença de susceptibilidade à infecção viral relacionada ao gênero dos mesmos. Macacos do gênero *Alouatta*, ou guariba, se mostram extremamente susceptíveis ao vírus, enquanto que aqueles do gênero *Cebus*, conhecidos como macaco-prego apresentam grande resistência à infecção. Portanto, o ciclo silvestre da doença se passa entre mosquitos-macacos-mosquitos (Figura 3) (Vasconcelos, 2003).



Figura 3: Representação esquemática do ciclo de transmissão do VFA na América do sul. O ciclo silvestre tem como principais representantes os mosquitos do gênero *Sabethes* e *Haemagogus*. São vetores de hábitos estritamente silvestres e picam, preferencialmente, macacos e, acidentalmente, o homem que invade o seu *habitat*. No ciclo urbano, o homem acidentalmente infectado pode ser fonte de infecção para *Aedes aegypti* competentes presentes no ambiente urbano.

1.3.2 DENV

O principal vetor urbano do vírus da dengue é o *Aedes aegypti*, que se caracteriza por seu perfil altamente doméstico, ou seja, um vetor adaptado aos ambientes humanos, alimentando-se de sangue e depositando seus ovos em recipientes próximos às residências. O vírus dengue, há aproximadamente três séculos, saiu de seu ciclo de transmissão silvestre, estabeleceu-se nos centros urbanos dos trópicos e hoje é considerado o único arbovírus totalmente adaptado aos humanos, sem a necessidade de haver um ciclo enzoótico para sua

manutenção (Mackenzie *et al.*, 2004). O ciclo de transmissão silvestre é observado entre primatas não humanos e mosquitos do gênero *Aedes* nas florestas da Ásia e oeste da África. No entanto, a contribuição desse ciclo enzoótico para a manutenção viral e em epidemias urbanas acredita-se ser mínima (Whitehead *et al.*, 2007)

Os humanos são infectados com o vírus quando são picados por fêmeas de mosquito infectadas, que por sua vez, infectam-se após alimentarem-se de indivíduos virêmicos. Os vetores, somente depois de um período de incubação de 8 a 12 dias, tornam-se capazes de transmitir o vírus para indivíduos não infectados. E os sintomas clínicos aparecem após período de incubação de 4 a 7 dias (Gubler, 1998).

Dessa forma, os vírus são mantidos em um ciclo homem-*Ae.aegypti*-homem. Outros vetores, considerados secundários, também são descritos o *Ae. albopictus* e *Ae. polynesiensis* (Gubler, 1998).

1.4 – Manifestações Clínicas

1.4.1 Febre amarela

A apresentação da doença varia de infecções subclínicas a infecções sistêmicas graves, que incluem febre, icterícia, fenômenos hemorrágicos e falência renal (Barnett, 2007). Estima-se que, aproximadamente, 90% dos casos de febre amarela se apresentem na forma leve e moderada e que somente 10% sejam das formas graves associadas à alta letalidade (Vasconcelos, 2003). Existem três fases bem caracterizadas da doença. A fase inicial é denominada de fase de infecção e é caracterizada pela presença de febre, náuseas, vômitos, tonturas e dores no corpo. Nesta fase é possível isolar o vírus do sangue do paciente ou detectá-lo através de

exames envolvendo técnicas moleculares de detecção viral. Outros achados laboratoriais consistem em leucopenia durante o início dos sintomas e a elevação dos níveis de transaminase no soro durante o 2^o e o 3^o dia da doença. A segunda fase, também chamada de fase de remissão, caracteriza-se por uma melhora das manifestações clínicas, incluindo a febre, e pode durar até 48 horas. A estimativa é que, aproximadamente 85%-90% dos pacientes se recuperem nessa fase sem desenvolverem icterícia. A terceira fase, também conhecida como fase de intoxicação, caracteriza-se pelo retorno dos sintomas característicos da primeira fase, mas com o desenvolvimento de icterícia, oligúria e diátese hemorrágica, esta caracterizada, principalmente, por hematêmese (vômitos negros), além da ocorrência de bradicardia acompanhando a febre elevada, evento denominado sinal de Faget (Vasconcelos, 2003; Barnett, 2007). O acometimento de múltiplos órgãos é comumente descrito no desenvolvimento desta fase da doença e os níveis de transaminase no soro estão diretamente relacionados à gravidade da infecção. A gravidade da doença também está associada à idade dos pacientes, sendo que os casos mais severos são geralmente observados em idosos e crianças (Barnett, 2007).

Com relação a parâmetros imunológicos, sabe-se que o vírus da febre amarela desencadeia uma resposta imune rápida e específica. A via mais caracterizada da infecção tem sido a da resposta imune humoral, em que anticorpos do tipo IgM são detectados na primeira semana da infecção atingindo seu pico na segunda semana para diminuir rapidamente nos próximos meses (Monath, 2001). Com relação aos anticorpos neutralizantes da classe IgG, o seu aparecimento se dá no final da primeira semana da doença, persistindo por muitos anos, evitando uma segunda infecção pelo VFA (Monath, 2001).

1.4.2 Dengue

A infecção pelo vírus dengue pode levar a sintomas que variam de uma doença febril não específica a sintomas com a síndrome clássica: febre-artralgia-rash (febre do dengue – DF) e até mesmo a sintomas severos, e às vezes fatais, denominados febre hemorrágica da dengue/síndrome do choque da dengue (DHF/DSS) (Mackenzie *et al.*, 2004; Gould & Solomon, 2008).

Acredita-se que após a inoculação, na pele, dos vírus provenientes da picada do mosquito infectado, os vírus iniciam a sua replicação nas células dendríticas locais com subsequente infecção sistêmica de macrófagos e linfócitos, culminando com a sua entrada na circulação sanguínea (Whitehead *et al.*, 2007). Após um período de incubação que varia de 5 a 8 dias, os sintomas clássicos da doença envolvem um início abrupto de febre alta acompanhada de cefaléias frontal e retro-orbital, mialgias e, freqüentemente artralgias, náuseas, vômitos também podem ser observados (Henchal & Putnak, 1990; Mackenzie *et al.*, 2004). Aproximadamente 50% dos pacientes desenvolvem erupções cutâneas e um *rash* descrito como “ilhas brancas em um mar vermelho”, e também pode-se observar petéquias e sangramentos provenientes da gengiva, nariz, trato gastrointestinal, assim como hematúria e hipermenorréia (Henchal & Putnak, 1990; Guzman & Kouri, 2002; Gould & Solomon, 2008). Nos casos típicos a febre persiste por 4 a 6 dias e a viremia, em geral, coincide com este período. A viremia produzida pelos DENV apresenta uma grande variação de acordo com alguns fatores relacionados ao hospedeiro e ao próprio vírus. No entanto, altos títulos virêmicos são alcançados durante os períodos febris alcançando aproximadamente $10^5 - 10^6$ unidades infecciosas/ml (Henchal & Putnak, 1990; Whitehead *et al.*, 2007). A convalescença da doença pode durar várias semanas e pode ser acompanhada de sintomas de depressão (Henchal

&Putnak, 1990; Gould &Solomon, 2008). Achados laboratoriais indicam uma diminuição na contagem de leucócitos periféricos acompanhada de granulocitopenia e plaquetopenia (Henchal &Putnak, 1990).

A forma grave da doença conhecida como febre hemorrágica da dengue/síndrome do choque de dengue (DHF/DSS) foi inicialmente descrita na década de 1950, em cidades do sudeste da Ásia. Na década de 1980, emergiu em países das Américas, provavelmente causada pela situação de hiperendemicidade, caracterizada pela presença de múltiplos sorotipos em uma mesma região (Gubler, 1998). A doença caracteriza-se por um início de sintomas semelhantes àqueles causados pela DF, porém a principal diferença da DHF/DSS com a forma típica da doença se encontra na presença da síndrome do extravasamento de plasma dos vasos sanguíneos para os tecidos, assim como a presença de trombocitopenia (Henchal &Putnak, 1990; Guzman &Kouri, 2002; Mackenzie *et al.*, 2004; Gould &Solomon, 2008). A primeira fase da doença é indistinguível dos sintomas relacionados à DF. A segunda fase caracteriza-se por uma diminuição da febre e, frequentemente, observa-se a presença de petéquias, lesões púrpuras e equimoses, epistaxes e sangramentos gengivais, gastro-intestinais e hematúria (Henchal &Putnak, 1990; Gubler, 1998).

A fim de estadiar a evolução clínica, os sintomas que levam à caracterização da doença como sendo DHF/DSS foram definidos pela OMS, que estabeleceu uma classificação da doença em graus I, II, III e IV. De acordo com essa classificação, a presença de trombocitopenia e hemoconcentração diferencia os graus I e II da DHF/DSS daqueles observados na clássica DF com manifestações hemorrágicas e o choque hipovolêmico é o único critério para a discriminação entre os graus I e II

dos graus III e IV (Henchal & Putnak, 1990), sendo estes últimos definidos como DSS.

1.5 – Prevenção

1.5.1 Febre amarela

A prevenção contra a doença pode ser realizada através de uma vacina segura e efetiva, desenvolvida por Max Theiler e colaboradores, que encontra-se disponível há mais de 65 anos e vem garantindo uma proteção acima de 98% a seus receptores por pelo menos 10 anos (Reinhardt *et al.*, 1998; Theiler & Smith, 2000; Vasconcelos, 2003; Lefevre *et al.*, 2006).

A vacina, conhecida como 17D, foi atenuada a partir de uma cepa selvagem isolada em Ghana no ano de 1927 e denominada Asibi. Max Theiler e colaboradores, na década de 1930 atenuaram a cepa Asibi através de múltiplas passagens do vírus, inicialmente em cérebro de camundongos, que conferia apenas uma diminuição em sua afinidade viscerotrópica, mas não em sua afinidade neurotrópica e, posteriormente em de ovos embrionados desprovidos de sistema nervoso. Dessa forma, a cepa 17 D é derivada de um total de 176 passagens (Barrett, 1997; Theiler & Smith, 2000). Uma das principais características do vírus atenuado obtido por esse processo é a elevada estabilidade genética, com apenas 48 alterações nucleotídicas em todo seu genoma (Lefevre *et al.*, 2006).

Atualmente, a produção da vacina em ovos embrionado ocorre em um sistema altamente eficiente e bem padronizado pela OMS. O sistema, denominado “lote-semente”, controla os níveis de passagens da cepa e inclui, entre os procedimentos de produção, testes dos vírus “semente” em macacos, no que se refere à

neurovirulência e viscerotropismo, antes de serem liberados para a produção da vacina (Vasconcelos *et al.*, 2001; Barrett & Higgs, 2007). O Brasil é o maior produtor da vacina da febre amarela no mundo, mas outros locais de produção desta vacina aprovados pela OMS estão localizados na Inglaterra, Alemanha, França, Rússia, Senegal e EUA (Monath, 2001; Vasconcelos *et al.*, 2001; Barnett, 2007). Atualmente, duas subcepas do vírus 17D são utilizadas para a produção da vacina. Uma é baseada na subcepa 17D-204, a qual foi derivada da 204^o passagem, enquanto a subcepa 17DD foi derivada da passagem 195, além de passagens adicionais em ovos embrionados na América do Sul, resultando em um vírus usado na passagem 286-288 (Barrett, 1997).

A vacinação com a cepa 17D confere altos níveis de proteção, assim como altas taxas de soroconversão com a produção de anticorpos neutralizantes em aproximadamente 99% dos indivíduos vacinados, com uma proteção que pode durar mais de 10 anos (Barnett, 2007; Monath, 2007). A produção de anticorpos neutralizantes ocorre dentro de 10 dias em 90% dos indivíduos imunizados e uma viremia branda pode ser detectada 3 a 7 dias após a primeira vacinação (Monath, 2001; Barnett, 2007). Efeitos adversos brandos podem ser relatados por 20 a 25% dos receptores tais como dores de cabeça, mialgia e mal estar. No entanto, esses sintomas devem estar relacionados às elevações nos níveis de IFN e TNF- α e de marcadores de ativação de células T provocadas pela replicação viral (Monath, 2001; Barnett, 2007). Assim como ocorre com outras vacinas de vírus vivo atenuado, a vacina contra febre amarela não é indicada a um grupo restrito de pacientes tais como aqueles que apresentam depressão do sistema imune. Este é o caso de pacientes com AIDS, câncer, sob uso de medicação imunossupressora, crianças menores de 6 meses e gestantes (Vasconcelos, 2003). A vacina também é contra-indicada em

peças alérgicas à proteína do ovo em função do risco de desenvolverem reação alérgica do tipo I à vacina, que é produzida em ovos embrionados (Vasconcelos, 2003; Barnett, 2007).

A VFA 17D tem sido uma das vacinas de vírus vivo atenuado de maior sucesso desenvolvida até o momento. Seu uso é estimado em 400 milhões de doses administradas; apenas 23 casos de encefalite pós-vacinal foram descritos desde a implementação do sistema "lote-semente" em 1945 (Vasconcelos *et al.*, 2001; Barnett, 2007). No Brasil, foram descritos apenas 3 casos de reações adversas relacionadas a sintomas neurológicos como encefalite e paralisia, o que corresponde a uma prevalência de 0,09 por 1.000.000 (Vasconcelos *et al.*, 2001). No entanto, alguns casos graves, relacionados a uma nova síndrome que desencadeia falência múltipla dos órgãos após a vacinação, começaram a ser descritos a partir de 1996, com uma taxa de letalidade de 60%, tendo sido denominada doença viscerotrópica aguda (Barnett, 2007; Monath, 2007; Ministério da saúde, 2008). No Brasil, um trabalho de Vasconcelos e colaboradores, em 2001, descreveu dois casos fatais em decorrência da vacinação com a 17DD VFA. A investigação das causas relacionadas ao óbito pós-vacinação se basearam em fatores virais, tais como uma possível ocorrência de variação genética durante a replicação do vírus vacinal e também fatores relacionados ao hospedeiro, como um imunocomprometimento do paciente em um dos casos (Vasconcelos *et al.*, 2001).

A caracterização desta nova síndrome clínica ligada a graves eventos adversos associados à vacina contra a febre amarela, estabelece um novo desafio no que diz respeito à doença. Investigações relacionadas à identificação do espectro de tais eventos, assim como os fatores de risco associados, se fazem necessárias a fim de se estabelecer novos critérios de vacinação (Vasconcelos *et al.*, 2001; Barnett, 2007).

1.5.2 Dengue

Atualmente, as melhores ferramentas de prevenção e controle contra DENV são as políticas públicas que viabilizem o combate ao principal vetor das áreas urbanas, que é o *Aedes aegypti* (Mackenzie *et al.*, 2004).

No Brasil, a dengue e a febre amarela urbana foram objetos de alguma das maiores campanhas de saúde pública realizadas no país. O combate ao vetor estabeleceu-se no país a partir do século XX, sendo as brigadas sanitárias, organizadas por Oswaldo Cruz, as primeiras campanhas públicas institucionalizadas contra a febre amarela urbana (Braga & Valle, 2007). Atualmente as políticas públicas visam o controle do *Ae. aegypti*. Sendo assim, em 2002 foi criado o Programa Nacional de Controle da Dengue, que envolve não apenas medidas efetivas de controle vetorial, mas também reformulação de planos anteriormente criados, bem como envolvimento da sociedade através de campanhas de conscientização ambiental (Braga & Valle, 2007).

O desenvolvimento de uma vacina contra a dengue seria a melhor medida preventiva contra a doença, a exemplo da prevenção contra VFA. Até o momento, vários candidatos vacinais encontram-se em diferentes estágios de desenvolvimento. A eficácia da vacina estará na capacidade da mesma em oferecer proteção contra os 4 sorotipos virais em uma mesma vacina, com a finalidade de se prevenir o desenvolvimento de DHF/DSS, e também na capacidade em promover uma imunidade duradoura (Mackenzie *et al.*, 2004; Whitehead *et al.*, 2007)

1.6 – Epidemiologia

1.6.1 Febre amarela

A doença se mantém endêmica nas florestas de áreas tropicais das Américas Central e do Sul e da África causando, periodicamente, surtos isolados ou epidemias de maior ou menor impacto para a saúde pública (Vasconcelos, 2003) .

Aproximadamente 200.000 casos de febre amarela são relatados, anualmente, à Organização Mundial da Saúde (OMS), porém 90% deles ocorrem na África (Barnett, 2007; Monath, 2008). No entanto, observa-se uma acentuada ressurgência da forma silvestre da doença desde o início da década de 1980 em países da América do Sul, incluindo o Brasil (Vasconcelos et al., 2001; Vasconcelos, 2003). Os maiores números de casos notificados da forma silvestre da doença no país foram: nos anos 1980, os estados do Pará e Maranhão; em 1999 e 2000, o estado de Goiás e nos anos 2001, 2004 e 2005, o estado de Minas Gerais (Vasconcelos et al., 2001; Figueiredo, 2007).

A febre amarela tem sido objeto de preocupação das autoridades sanitárias do Brasil, com vigilância intensa da ocorrência de epizootias e com a definição das áreas de risco de acordo com a circulação viral nas diversas regiões do Brasil. Estas áreas são definidas como: 1) áreas endêmicas – áreas que sempre apresentaram circulação viral, seja pela ocorrência de epizootias ou pela ocorrência de casos humanos; 2) área de transição – áreas com evidências de circulação viral esporádica de forma epizootica, entre primatas não humanos 3) área indene de risco potencial – áreas contíguas às áreas de transição, que apresentam ecossistemas semelhantes 4) Área livre da circulação viral (Vasconcelos, 2003; SVS, 2007). Com relação à cobertura vacinal nesses locais acredita-se que, na área endêmica, 95% da população esteja

vacinada, o mesmo ocorrendo com a população da área de transição. Há, porém baixa cobertura vacinal na área indene (Vasconcelos, 2003).

Até o momento, de acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do país, a situação epidemiológica inclui 77 notificações de casos suspeitos da doença, sendo 45 deles confirmados, dos quais 32 evoluíram para óbito. As prováveis áreas de infecção incluem áreas silvestres dos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal, Mato Grosso, Paraná, São Paulo, Pará e Minas Gerais (Ministério da Saúde, 2008).

Os casos de febre amarela que ocorrem atualmente no país têm acometido indivíduos susceptíveis que adquiriram a doença após invasão a ambientes silvestres, por motivos de trabalho ou lazer (Barnett, 2007,).

1.6.2 Dengue

A distribuição global da dengue se concentra principalmente nas áreas tropicais e sub-tropicais da América, África, Ásia, bem como Oceania e Austrália (Gubler, 2007). Atualmente, a dengue representa a doença viral transmitida por mosquito mais importante do mundo, sendo reconhecida em mais de 100 países, com aproximadamente 50—100 milhões de indivíduos infectados anualmente. Dentre esses casos de DF, aproximadamente 250.000-500.000 evoluem para FHD. (Guzman & Kouri, 2003; Malavige *et al.*, 2004; Halstead, 2007).

No Brasil, segundo dados recentes da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde foram registrados, no ano de 2006, 345.922 casos de dengue, dos quais 76% ocorreram entre os meses de janeiro a maio, e no ano de 2007 foram notificados 559.954 casos de dengue, dos quais 79% ocorreram nos cinco primeiros meses do ano, confirmando a manutenção de um padrão de

sazonalidade que acompanha a estação chuvosa (verão). Em 2006, foram confirmados 628 casos de febre hemorrágica e a ocorrência de 67 óbitos. No ano de 2007 foram registrados 1.541 casos de febre hemorrágica e 158 óbitos, com uma taxa de letalidade para FHD de 10,2% (Ministério da Saúde, 2008).

O aumento no número absoluto de casos em 2007 foi diretamente influenciado pelo incremento da transmissão nos Estados de Mato Grosso do Sul, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Pernambuco. Em função da circulação de três sorotipos do vírus da dengue, o número de casos de FHD e a taxa de letalidade vêm aumentando no país. Em 2002, com a introdução do DEN-3, foi registrado o maior pico epidêmico da doença no Brasil e a taxa de letalidade foi duas vezes maior, revelando uma maior gravidade na ocorrência da doença. Em 2007, 86% dos casos de FHD estavam concentrados nos Estados do Ceará, Rio de Janeiro, Maranhão, Pernambuco, Amazonas, Mato Grosso do Sul, Piauí, Goiás, Alagoas, Paraíba e Rio Grande do Norte. Em relação aos óbitos por FHD, 64% aconteceram nesses estados. Em 2008 está ocorrendo uma explosão de casos de dengue no estado do Rio de Janeiro, com um espantoso aumento no número de casos de FHD. No período de janeiro a março de 2008, a SVS havia registrado 120.570 casos, com a ocorrência de 48 óbitos (Ministério da Saúde, 2008).

1.7 – Riscos da reurbanização da febre amarela no Brasil

Na América do Sul, e particularmente no Brasil, a taxa de transmissão de febre amarela é baixa em virtude da alta cobertura vacinal nas áreas endêmicas e da rápida implementação pelo Ministério da Saúde de campanhas de imunização em massa, em resposta ao aumento do número de casos de febre amarela silvestre. Deste modo, o ciclo urbano da doença não tem sido detectado por mais de meio

século, embora todos os elementos necessários para haver uma reurbanização da doença estejam presentes como, por exemplo: 1) o vírus circulante em primatas não-humanos que podem infectar indivíduos susceptíveis (indivíduos que não foram imunizados contra o vírus) que entrem em contato com áreas onde existe a transmissão da febre amarela silvestre, 2) os vetores responsáveis pela a transmissão da febre amarela urbana, como o *Aedes aegypti* e 3) hospedeiros susceptíveis residentes fora da área endêmica (Vasconcelos, 2003). Esse é um perfil epidemiológico muito semelhante ao da Ásia, onde todos os pré-requisitos necessários para se vivenciar, em um futuro próximo, uma epidemia de febre amarela urbana estão presentes e, no entanto, não existem evidências de sua ocorrência.

Historicamente, a febre amarela urbana nunca se estabeleceu na Ásia, apesar de abundante presença de hospedeiros susceptíveis e de seu vetor, *Aedes aegypti*. Algumas hipóteses têm sido investigadas para se tentar explicar essa ausência de epidemias na Ásia e em países do Pacífico (Gubler, 2002). Uma das hipóteses baseia-se em estudos laboratoriais relacionados a susceptibilidade vetorial, porém, um estudo conduzido por pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz envolvendo a susceptibilidade oral ao VFA do *Aedes aegypti* mostrou que as cepas provenientes da Ásia eram mais susceptíveis do que as cepas do Brasil, Venezuela e Estados Unidos (Lourenço-De-Oliveira *et al.*, 2002). Outra hipótese refere-se à possibilidade da ocorrência de imunidade cruzada em seres humanos, que se baseia no fato do vírus da dengue e da febre amarela, por pertencerem ao mesmo gênero e família, compartilharem antígenos relacionados. Desta maneira, como na Ásia a infecção pelos quatro sorotipos de DENV e pelo vírus da encefalite japonesa (JEV) é prevalente, a infecção da população com algum dos tipos de DENV e JEV

produziria anticorpos grupo-específicos que, de alguma maneira, induziriam a neutralização do VFA (Theiler & Anderson, 1975). No entanto, infecções heterólogas envolvendo os diferentes sorotipos, como no caso da dengue, ao contrário de proteção, resultam em um aumento da possibilidade de desenvolvimento da FHD/SCD, resultante da infecção seqüencial por diferentes sorotipos, em um processo conhecido como aumento da infecção mediada por anticorpo (ADE – “antibody dependent enhancement of infection”). Esses anticorpos adquiridos em infecções prévias por um determinado sorotipo do vírus do dengue não teriam capacidade de neutralizar um sorotipo diferente responsável pela infecção atual (Halstead, 1989; Rothman & Ennis, 1999). Porém, alguns resultados de trabalhos recentes parecem corroborar com a teoria da proteção desenvolvida por infecções heterólogas. Tesh e colaboradores mostraram que a imunização prévia de hamsters com três *flavivirus* heterólogos, vírus vacinal da JEV, cepa selvagem da encefalite de St. Louis (SLEV) e cepa 17D VFA, proviam proteção em um ensaio de desafio com WNV (Tesh *et al.*, 2002).

Com relação ao Brasil, a hipótese da competência vetorial diminuída é objeto de investigação por vários grupos de pesquisa e trabalhos envolvendo a susceptibilidade oral do vetor para o VFA mostram evidências laboratoriais e de campo, que *Ae. aegypti* é capaz de transmitir o vírus da febre amarela com a mesma competência que o DENV, como foi observado por Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 2004. Em um estudo recente, este grupo analisou a susceptibilidade do *Ae. aegypti* à infecção ao DENV e VFA separadamente. Foram coletadas 23 amostras em 13 estados brasileiros, verificando-se que a taxa de infecção tanto para o DENV quanto para VFA era elevada e heterogênea e as amostras vetoriais coletadas nas áreas de

transição e endêmica eram altamente susceptíveis ao VFA (Lourenço-De-Oliveira *et al.*, 2004).

Para o entendimento da ausência da transmissão da YF urbana, apesar da elevada infestação do vetor, várias investigações devem ser realizadas, além da competência vetorial do *Ae. aegypti*. Investigações envolvendo densidade vetorial, sobrevivência diária do vetor, taxa de picada do mosquito, duração da viremia, *background* imune da população exposta são fatores que podem se somar para o entendimento dessa característica epidemiológica peculiar (Lourenço-De-Oliveira *et al.*, 2002; Vasconcelos, 2003).

Em nosso estudo, uma outra proposta foi sugerida para somar à gama de investigações que envolvem o silêncio epidemiológico da febre amarela urbana. A análise “*in vitro*” de um fenômeno conhecido como interferência viral, uma situação em que a infecção por um determinado tipo viral impede a infecção das mesmas células por um vírus diferente. No ensaio foi estudada a influência do DENV e VFA em uma mesma cultura de células (células provenientes de *Aedes albopictus*), por meio da análise das dinâmicas de replicação virais, utilizando ensaios de imunofluorescência indireta e reações de detecção da carga viral por PCR em tempo real.

1.8 – Interferência Viral

O fenômeno de interferência viral, segundo Johnston e colaboradores (1974), pode ser conceituado como uma inabilidade de um vírus em replicar em célula ou animal previamente infectados (Johnston *et al.*, 1974). Neste fenômeno, uma célula infectada com um vírus freqüentemente torna-se resistente a uma infecção secundária com o mesmo vírus ou um vírus relacionado (interferência homóloga),

enquanto a infecção celular com um vírus não relacionado (interferência heteróloga), geralmente não é afetada (Schaller *et al.*, 2007).

Historicamente, a interferência durante uma infecção viral foi inicialmente descrita por Hoskins e colaboradores (1935) em um experimento envolvendo a infecção de *Macaca mulatta* com duas cepas de VFA. Foi observado que infecções simultâneas pela cepa neurotrópica do VFA (cepa francesa) protegia os macacos contra infecções pela cepa viscerotrópica letal (cepa *Asibi*) (para revisão – Johnston *et al.*, 1974). Subseqüentes a esses experimentos, muitos outros envolvendo a interferência viral, foram descritos com abordagens *in vivo* e *in vitro*.

Atualmente, a interferência homóloga, também conhecida por exclusão da superinfecção, é definida como a habilidade de uma infecção viral previamente estabelecida interferir com uma segunda infecção de um vírus homólogo (vírus superinfectante – mesmo vírus ou vírus relacionados) (Singh *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2005). Do ponto de vista evolucionário, essa exclusão pode ser vantajosa para um vírus uma vez que, dessa maneira, as novas partículas virais que forem produzidas pelas células infectadas seriam favorecidas a infectarem células *naives* favorecendo a disseminação viral. Além disso, os vírus que infectaram as células primeiramente estariam protegidos de um competidor, no caso o vírus homólogo ou vírus superinfectante. Portanto, pode-se especular que a exclusão da superinfecção é uma poderosa estratégia para a manutenção da diversidade genética de uma população viral, pois permite a ocorrência da replicação de uma ampla gama de variantes virais, distintas em suas capacidades (Lee *et al.*, 2005).

Os mecanismos da superinfecção, para uma grande maioria dos vírus, permanecem desconhecidos, mas para alguns deles, têm sido identificados em vários estágios: 1) durante o ciclo de replicativo viral, incluindo a ligação mediada via

receptor; 2) durante a penetração do core viral no interior das células hospedeiras 3) durante os passos da replicação viral. A investigação de tal fenômeno também se direciona para a investigação da produção de substâncias semelhantes ao interferon pela célula infectada e para a produção de uma protease pelo vírus inicial (Karpf *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2005).

Alguns trabalhos pioneiros no estudo dos mecanismos envolvidos na superinfecção conseguiram evidenciar a interferência através do primeiro mecanismo, como: trabalhos realizados por Steck e colaboradores utilizando o vírus da leucocitose aviária e por Bratt e colaboradores, utilizando as cepas do vírus da doença de Newcastle (Steck & Rubin, 1966b; a; Bratt & Rubin, 1968a; b). Com relação ao terceiro mecanismo Johnston e colaboradores, avaliando a interferência homóloga por infecção prévia com o *alphavirus* Sindbis em células BHK e fibroblastos embrionários de galinhas, observaram a redução da produção das progêneses virais relacionadas a um bloqueio no nível da replicação viral (Johnston *et al.*, 1974). No entanto, alguns trabalhos conseguiram evidenciar a interferência homóloga ocorrendo através de múltiplos mecanismos. Singh e colaboradores, através da infecção com o Semliki Forest vírus (SFV) em células BHK evidenciaram que, além de interferência com a inibição da replicação viral, 3 a 6 horas após a infecção, outros modos de interferência se tornaram aparentes, incluindo a inibição da ligação viral e o bloqueio do desnudamento do nucleocapsídeo (Singh *et al.*, 1997).

Vários trabalhos mostram a interferência viral em células C6/36, uma linhagem celular proveniente de *Aedes albopictus*. Em um trabalho de 1973, Stollar e colaboradores em cultura de células de *Ae. albopictus* cronicamente infectadas com o vírus Sindbis selvagem (SV-W) e observaram que a interferência com a

replicação do vírus homólogo superinfectivo é completa. Porém a superinfecção com o vírus heterólogo da encefalite eqüina (EEEV) levava à produção normal de vírus (Stollar & Shenk, 1973). Mas algumas publicações também relatam a resistência à superinfecção tanto para vírus homólogos quanto para heterólogos da mesma família, embora estas outras permaneçam susceptíveis à infecção heteróloga com vírus de famílias diferentes. Essa constatação foi feita em um trabalho realizado por Eaton em 1979 utilizando os *Alphavirus* Sindbis, Semliki Forest, Una e Chikungunya, assim como um *Bunyavirus* conhecido como vírus "Snowshoe Hare" (Eaton, 1979).

Os *flavivirus* também são objeto de investigação com relação à interferência viral. Dittmar e colaboradores demonstraram em células C6/36 infectadas com um único sorotipo do vírus dengue a ocorrência da resistência à superinfecção quando se utilizava os outros sorotipos do vírus dengue (infecção heterotípica), ao contrário dos trabalhos que relataram a ausência de interferência em infecções heterotípicas (Dittmar *et al.*, 1982).

Dessa forma, o presente trabalho buscou dar sua contribuição ao estudo da interferência entre dois dos principais arbovírus que ocorrem no país, os vírus dengue e o da febre amarela. A investigação de tal interferência visou suportar uma hipótese, até então não investigada, sobre as causas da ausência da febre amarela urbana no país, relacionada à uma possível ocorrência de interferência viral no transmissor da doença.

II – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a possível ocorrência de interferência viral durante a infecção com os vírus dengue e febre amarela em um mesmo sistema celular.

2.2 – Objetivos específicos

- Padronização das curvas de PCR em Tempo Real para DENV-2 e VFA17D visando a quantificação absoluta dos RNAs virais.

- Analisar o processo de interferência em células C6/36 provenientes de *Aedes albopictus* utilizando uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1.

- Analisar a interferência viral em células U937 – linhagem derivada da leucemia mielóide utilizando MOI 0,1.

III – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Cultura celular

3.1.1 Cultura de células C6/36

Célula de linhagem contínua, originária de larvas de mosquito *Aedes albopictus*. Essas células foram mantidas em frascos de 25 cm² (Corning Incorporated[®]) em meio de cultura Leibovitz-15 (L-15) (Invitrogen[®]) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (Nutricell[®] BRL), 1% L-glutamina 200Mm (Invitrogen[®]), 1% antibiótico (penicilina 100U/mL, estreptomicina 1mg/mL) (Invitrogen[®]), 10% fosfato de triptose (Nutricell[®] BRL), e mantidas a 28° C. Estas células foram utilizadas na produção de estoques virais assim como nos ensaios relacionados à análise da interferência viral.

3.1.2 Cultura de células Vero

Estas células, derivadas de rim de macaco verde *Cercopithecus aetiops*, foram mantidas em frascos de 75 cm² (Corning Incorporated[®]) em meio Leibovitz-15 (L-15) (Invitrogen[®]), suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (Nutricell[®] BRL), 1% L-glutamina 200Mm (Invitrogen[®]), 1% antibiótico (penicilina 100U/mL, estreptomicina 1mg/mL) (Invitrogen[®]), 10% fosfato de triptose (Nutricell[®] BRL). As células foram mantidas a 37°C e utilizadas na titulação dos estoques virais.

3.1.3 Cultura de células U937

Células derivadas de leucemia mielóide. Estas células foram cultivadas em meio RPMI (Invitrogen[®]), contendo 10% SFB gentamicina (20µg/mL), anfotericina B (5µg/mL) e penicilina (100 u/mL) em ambiente com 5% de CO₂ a 37°C. Essas células foram utilizadas nos ensaios de interferência viral.

3.2 – Produção de estoques virais

3.2.1. Estoques produzidos em cultura celular

Garrafas de 75 cm³ cultura de células (Corning Incorporated) foram semeadas com células C6/36, crescidas a 28 °C e mantidas em meio Leibowitz L15 modificado (GIBCO-INVITROGEN-BRL) suplementado com soro fetal bovino (2-10%), triptose fosfato (10%) e antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 1 mg/mL) (Gubler *et al.*, 1984).

Os estoques dos vírus DENV-2 (linhagem *New Guinea C*), febre amarela (linhagem 17D vacinal) e febre amarela selvagem (linhagem BeH111) foram obtidos infectando as monocamadas contínuas das células C6/36 com os respectivos vírus. Uma reação de imunofluorescência indireta (IFI) foi realizada (Tesh, 1979) após sete dias de incubação, para confirmar a presença de 90 a 100% de infecção celular, e os vírus presentes no sobrenadante foram aliqüotados em criotubos em meio L15 suplementado com 10% de soro bovino fetal e congelados em freezer a -80°C para posterior utilização.

Amostras do vírus da febre amarela selvagem, cepa BeH111, foram gentilmente cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz (São Paulo) e pelo Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos do Instituto Evandro Chagas (Belém do Pará). Amostras dos vírus DENV-2 linhagem (*New Guinea C*) foram gentilmente cedidas ao pelo Dr. Robert E. Shope.

3.2.2. Estoques produzidos em cérebro de camundongos

A produção dos estoques virais em cérebro de camundongos *Swiss* recém-nascidos de foi realizada inoculando-se aproximadamente 20µl de vírus

intracerebralmente com DENV-2 ou VFA, cepas BeH111 e 17D. Após o inóculo, esses camundongos foram acompanhados diariamente até o desenvolvimento dos sinais relacionados à encefalite como paralisia das patas traseiras e tremores. Nesse momento, os animais foram sacrificados, os cérebros foram extraídos com seringa de insulina (1,0 mL), macerados em soro albumina bovina a 7,5%, submetidos à centrifugação por 10.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante, límpido, aliquotado e armazenado a - 70° C.

3.3 – Titulação viral

O protocolo descrito a seguir foi utilizado na quantificação dos estoques virais previamente descritos, assim como nos sobrenadantes das culturas celulares coletadas durante os ensaios de interferência viral que serão descritos posteriormente.

O ensaio de placa utilizou células Vero. Para isso, garrafas de T-75 cm² (Corning Incorporated), apresentando monocamadas de células Vero confluentes, após serem lavadas com 10mL de solução de PBS (solução tampão fosfato salina), foram incubadas com 5 mL de tripsina-EDTA (Invitrogen[®]), que promove o descolamento das células da parede da garrafa. As células descoladas foram ressuspensas com 19 mL do meio de cultura Leibovitz-15 (L-15) (Invitrogen[®]) suplementado com 10% de SFB (Nutricell[®] BRL), 1% L- glutamina 200mM (Invitrogen[®]), 1% antibiótico (penicilina 100U/mL, estreptomicina 1mg/mL) (Invitrogen[®]) e 10% fosfato de triptose (Nutricell[®] BRL). Após homogeneização foram dispensados 1mL da suspensão meio/células em cada poço da placa de 24 poços (Corning Incorporated), correspondendo a 1×10^6 células/mL/poço e, posteriormente, incubadas a 37°C por 3 dias.

Os estoques virais foram descongelados lentamente no gelo. Foram realizadas 10 diluições decimais seriadas (1:10) de cada um dos vírus em PBS (solução tampão fosfato salina – Invitrogen[®]) e, em seqüência, 100µL de cada diluição foram aplicadas em duplicata nas monocamadas de células Vero confluentes, previamente lavadas com PBS. Após uma hora de incubação a 37⁰C, para permitir a ocorrência da adsorção viral, as monocamadas foram lavadas com 1mL de PBS e, após o descarte, cobertas com 1 mL de uma camada superior de carboximetilcelulose a 3% (SIGMA[®]) contendo meio L-15, 2% de soro bovino fetal, antibióticos e L-glutamina 200mM) para interromper o processo da infecção. As placas foram incubadas a 37°C durante 7 dias para, posteriormente, após descarte da camada superior de carboximetilcelulose e nova lavagem com PBS, serem coradas com solução de meio L-15 a 2% com 0,5% de vermelho neutro (GIBCO-BRL, New York, USA) a fim de se determinar o número de unidades de placa formadas (PFU) por mililitro.

O cálculo da concentração viral em PFU/mL foi realizado baseado na maior diluição onde as placas foram visíveis levando em conta a diluição e o volume total do inóculo.

$$\text{PFU/mL} = \frac{\text{número de placas}}{\text{Diluição} \times \text{volume inóculo (mL)}}$$

3.4 – Otimização da reação: transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

3.4.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers)

Os pares de oligonucleotídeos para o vírus da febre amarela foram desenhados manualmente, após o alinhamento da região 3'NC do genoma do VFA17D e as regiões 3'NC dos 4 sorotipos do vírus dengue, de forma a obter um par de oligonucleotídeos específicos para o VFA17D. O fragmento amplificado utilizando os oligonucleotídeos sintetizados apresenta 75 pares de bases, conforme apresentado na figura 5. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação do DENV-2 amplificam um fragmento de 151 pares de bases também presentes da região 3'NC, conforme figura 4 (Houng *et al.*, 2001) (tabela 1). Embora as seqüências genômicas amplificadas por ambos os primers dos diferentes vírus tenham sido alinhadas e não apresentam quaisquer homologias, escolhemos desenhar os oligonucleotídeos na mesma região do genoma de ambos os vírus para que os experimentos de PCR em tempo real fossem comparáveis.

Os oligonucleotídeos escolhidos para a amplificação de cada um dos vírus foram analisados quanto à especificidade pelo Basic Local Alignment Search Tool - NCBI (BLAST) para os vírus DENV-2 *New Guinea C*, VFA17D e VFA BeH111.


```

1 AAGGCGAAACTAACATGAAACAAGGCTGAAAGTCAGGTCGGATTAAGCCATAGTACGGGA
61 AAAACTATGCTACCTGTGAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAAAGAAGTCAGGCCATCACAAA
121 TGCCACAGCTTGAGTAAACTGTGCAGCCTGTAGCTCCACCTGAGGAGGTGTAAAAACCC
181 GGGAGGCCACAAACCATGGAAGCTGTACGCATGGCGTAGTGGACTAGCGTTAGAGGAGA
241 CCCCTCCCTTACAAATCGCAGCAACAACGGGGGCCCAAGGTGAGATGAAGCTGTAGTCTC S
301 ACTGGAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCCCAAACAAAAACAGCATATTGACGCT
361 GGGAAACACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTCAGCATCATTCAGGCACAGAACGCCAGAAA AS
421 ATGGAATG

```

Figura 4: Seqüência completa da 3'NCR do DENV-2: GeneBank, gi| 180164973. Representação da localização dos oligonucleotídeos S e AS, sublinhado em azul, na região 3'NC e o produto esperado da amplificação com 151 pares de bases amplificados representado em azul.

```

10381 ATACAAACCACGGGTGAGAAACCGGACTCCCCACAACCTGAAACCGGGATATAAACACG
10441 GCTGGAGAACCGGACTCCGCACTTAAAAATGAAACAGAAACCGGGATAAAAACTACGGATG
10501 GAGAACCGGACTCCACACATTGAGACAGAAGAAGTTGTCAGCCCAGAACTCCACACGAGT
10561 TTTGCCACTGCTAAGCTGTGAGGCAGTGCAGGCTGGGACAGCCGACCTCCAGGTTGCGAA S
10621 AAACCTGGTTTCTGGGACCTCCACCCAGAGTAAAAAGAACGGAGCCTCCGCTACCACC AS
10681 CTCCCACGTGGTGGTAGAAAGACGGGGTCTAGAGGTTAGAGGAGACCCTCCAGGGAACAA
10741 ATAGTGGGACCATATTGACGCCAGGGAAAGACCGGAGTGGTTCTCTGCTTTTCTCCAGA
10801 GGTCTGTGAGCACAGTTTGCTCAAGAATAAGCAGACCTTTGGATGACAAAACAAAAACCA
10861 CT

```

Figura 5: Seqüência completa da 3'NCR do YFV17DD: GeneBank, gi|70724977|gb|DQ100292.1. Representação da localização dos oligonucleotídeos S e AS, sublinhado em azul, na região 3'NC e o produto esperado da amplificação com 75 nucleotídeos em azul.

Tabela 01: Seqüência dos oligonucleotídeos senso e anti-senso amplificadores de VFA e DENV2 e a região de amplificação.

| OLIGONUCLEOTÍDEOS | SEQÜÊNCIA | REGIÃO | REFERÊNCIAS |
|-------------------|------------------------------|--------|----------------------------|
| | Senso | | |
| VFA* | 5'TTTGCCACTGCTAAGCTGTAG3' | | Desenho manual |
| | Anti-senso | 3'NCR | |
| | CCCAGAAACCAGGTTTTTCG3' | | |
| | Senso | | |
| DENV-2** | 5'AAGGTGAGATGAAGCTGTAGTCTC3' | 3'NCR | Houng <i>et al.</i> , 2001 |
| | Anti-senso | | |
| | 5'CATTCCATTTTCTGGCGTTCT3' | | |

* Invitrogen Life Technology, USA ** Inova

3.4.2 One-Step RT-PCR e avaliação da especificidade dos primers

A padronização da RT-PCR convencional foi realizada previamente à utilização da PCR em tempo real para se obter as concentrações e temperaturas de anelamento ideais dos primers dos respectivos vírus. Esse passo é requerido para se alcançar a máxima eficiência e especificidade da reação. Foram utilizados os Kits Qiagen® OneStep RT-PCR. O processamento das reações foi realizado em uma mistura de reação contendo 5µl do tampão 5X OneStep RT-PCR, 1µl de dNTPs 10mM, 10 pmol/µl dos oligonucleotídeos senso e antisenso, 1µl da enzima e 5µl do RNA molde, em um volume final de 25µl. As amplificações foram realizadas a 50°C por 30 minutos e 95°C por 15 minutos para a transcrição reversa, seguida de 40 ciclos 95°C x 1 minuto, 60°C x 1 minuto, 72°C x 1 minuto e um ciclo final de 10 minutos a 72°C para o vírus DENV-2 e para o VFA17D.

A avaliação da especificidade dos oligonucleotídeos foi realizada utilizando as condições descritas anteriormente, porém com a inclusão dos oligonucleotídeos desenhados para DENV-2 nas misturas de reações contendo moldes de VFA17D e vice-versa.

3.5 – PCR em tempo real

A reação de PCR em tempo real foi eleita a metodologia para realizar a quantificação viral absoluta nos sobrenadantes celulares durante as reações de análise da interferência viral. O sistema de marcação utilizado foi o SYBRGreen e também optamos pela realização da transcrição reversa do genoma viral e reação em cadeia da Polimerase (PCR) em um único passo de reação, também chamado *one step*, utilizando o kit “One-Step RT-PCR Master Mix”.

As reações foram processadas no aparelho ABI5700 (Applied Biosystems) que realiza as ciclagens e monitora a emissão de fluorescência decorrente da amplificação em tempo real. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (*cycle threshold*); este ponto corresponde ao número de ciclos no qual a amplificação das amostras atinge um limiar que é determinado pelo nível de fluorescência emitida por incorporação do corante SYBR Green nas duplas fitas de DNA que são geradas por amplificação das amostras.

Os RNAs dos vírus DENV-2 e VFA17D foram amplificados utilizando-se o reagente SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®), composto pelo fluoróforo SYBRGreen 1; o fluoróforo ROX, utilizado como referência passiva para a normalização dos níveis de fluorescência; a enzima AmpliTaq Gold® DNA Polimerase 1,25 U e os demais componentes do tampão devidamente otimizados. A mistura de reação foi preparada utilizando-se 12,5µl de solução tampão

SYBRGreen, 1,0 μ l de inibidor de RNase, 0,13 μ l de Multiscribe (50 U/ μ l), 1 μ l do oligonucleotídeo *sense* e 1,0 μ l do oligonucleotídeo *anti-sense* (10pM), 4,87 μ l de água MilliQ tratada com DEPC (dietilpirocarbonato), e 5 μ l de RNA, totalizando um volume final de 25 μ l. Esse protocolo foi utilizado nas ampliações dos dois vírus. As condições de amplificação compreenderam: 48°C por 20 min e 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segs e 60°C por 1 min. A avaliação da especificidade das reações foi realizada utilizando-se as curvas de dissociação obtidas em um ciclo final de 20 minutos com temperatura crescente de 60°C a 95°C, para obtenção da curva de dissociação dos produtos gerados pela amplificação.

3.5.1 Padronização das curvas-padrão

O ensaio de quantificação absoluta utiliza uma curva padrão que permite quantificar uma seqüência-alvo oriunda de amostra desconhecida. As curvas foram construídas a partir de estoques virais previamente titulados e a partir dos mesmos foram realizadas 5 ou 6 diluições seriadas. A partir das diluições realizava-se a extração do RNA viral para posterior uso nas reações de PCR em tempo real. Inserindo a amostra em teste nesta curva, estimava-se o número de cópias presentes em cada diluição. Portanto, os resultados dos ensaios de quantificação absoluta foram gerados nas mesmas unidades de medida daquela utilizada na curva padrão.

3.5.2 Extração do RNA viral

A extração do RNA viral das diluições dos padrões e das amostras coletadas nos ensaios de interferência viral foi realizada utilizando o kit QIAMP Viral RNA (QIAGEN, USA), e é aqui descrita brevemente. Esta técnica utiliza uma coluna com

sílica gel com afinidade para RNA. Deste modo, após a lise das amostras por um tampão denominado AVL, as amostras foram aplicadas em uma coluna de afinidade para RNA e submetidas a uma centrifugação de 6797g por 1 minuto. Após centrifugação, as amostras foram lavadas duas vezes, utilizando tampões de lavagens com diferentes estringências, AW1 e AW2. Terminadas as lavagens, os RNAs foram eluídos das colunas em tampão de eluição AVE e estocados a -70°C até o momento do uso.

3.6 – Clonagem dos vírus DEN-2 e YF 17D

Em dado momento deste trabalho encontrou-se dificuldade em obter estoques virais com títulos suficientes para a construção da curva para PCR em tempo real. Por isso, paralelamente às tentativas de aumentar os estoques virais, estabeleceu-se outra estratégia visando obter uma curva padrão para PCR com material mais estável do que aquelas curvas envolvendo moléculas de RNA. Clonamos os fragmentos amplificados dos vírus DEN-2 e YF17D, no vetor pDrive contido no kit QIAGEN PCR Cloning (QIAGEN). Com essa estratégia, as curvas-padrão foram geradas a partir de diluições seriadas dos clones recombinantes.

3.6.1 One-Step RT-PCR

Foram realizadas RT-PCRs One Step para os dois vírus como descrito no item 3.4.2. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose a 2,0%, corado em solução de brometo de etídeo 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e visualizado em um transluminador de U.V. As bandas de mobilidade aparente compatível com 75 pares de bases e 151 pares de bases foram recortadas do gel para posterior purificação.

3.6.2 Purificação do Produto da PCR

Antes de dar início ao experimento de ligação entre o vetor e o amplicon de 75 pares de bases foi purificado utilizando o sistema Wizard plus Megapreps (Promega Corporation, USA).

Foram adicionadas as mesmas quantidades, em volume, da solução de ligação presente no kit e do amplicon. O volume total foi adicionado em uma minicoluna no tubo de coleta e incubado à temperatura ambiente (TA) por 1 minuto. Após centrifugação, a 20817g por 1 minuto, o filtrado foi descartado e procedeu-se a sucessivas lavagens da coluna com 700 e 500 μ l da solução de lavagem. Para eluir o DNA purificado a minicoluna foi transferida para um novo tubo onde adicionou-se 50 μ l de água livre de nuclease, incubou-se à T.A. por 1 minuto e realizou-se a centrifugação a 20817g por 1 minuto. O DNA eluído foi estocado a -20°C até o momento do uso.

3.6.3 Reação de ligação vetor/inserto

Antes de realizar a reação de ligação do inserto com o vetor de clonagem pDrive (QIAGEN), o produto purificado foi quantificado para cálculo da razão molar inserto:vetor ideal à reação. De acordo com as especificações do fabricante (QIAGEN PCR Cloning kit ligation), recomendava-se uma razão molar de 5 – 10:1 (inserto: vetor).

Foram adicionados em um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL, 1 μ l do vetor de clonagem pDrive (50ng/ μ l), 1 μ l do produto da PCR (previamente calculado conforme as instruções do protocolo), 5 μ l de *ligation master mix* para a ligação e água milli-Q autoclavada suficiente para 10 μ l de volume final. Esse volume foi incubado por 2

horas à temperatura de 4^oC. Após esse período 3µl do produto obtido foi utilizado para a transformação em bactérias competentes.

3.6.4 Preparo das Bactérias Competentes

Bactérias competentes *Escherichia coli* DH5α foram inoculadas em 5mL de Meio LB 1X sem antibióticos e incubadas sob agitação de 3g a 37°C durante 16h (C24 Incubator Shaker, EDISON, NJ USA). A cultura foi transferida para 500mL de LB e incubada a 37°C sob agitação (3g). As culturas foram colhidas em fase exponencial de crescimento determinada quando a absorbância a 550 nm estava entre 0.35 e 0.45. As bactérias foram centrifugadas a 2800g durante 10 min a 4°C e o sedimento foi homogeneizado em 150mL da solução de 75mM CaCl₂, 10mM Tris-HCl pH 8.0. A suspensão bacteriana foi incubada em gelo por 20min e centrifugada, como anteriormente descrito. O sedimento celular foi homogeneizado com 30mL da mesma solução acrescida de 15% de glicerol, distribuído em alíquotas, e foi congelada rapidamente em álcool previamente resfriado a -70°C. Os tubos foram então congelados a -70°C.

3.6.5 Transformação Bacteriana

Após a reação de ligação vetor-inserto, foi realizado a transformação bacteriana, ou seja, a inserção do plasmídeo recombinado em *E. coli* através do processo de choque térmico. Para isso, 3 µl da reação foi adicionada a 200 µl de bactérias competentes (*E. coli* DH5α), e incubada em gelo durante 15 minutos. Após essa primeira incubação, a solução contendo bactérias e plasmídeo recombinante foi novamente incubada a 42°C por 30 segundos para, em seguida, ser adicionada de 800 µl de SOC. A solução foi submetida a uma agitação constante de 5g por

minuto, durante 1 hora a 37°C. Após agitação, 50 µl da reação foi aplicada em uma placa contendo meio sólido 2XYT, contendo 100 µg/mL de ampicilina, IPTG/XGal e incubada a 37°C por 18 horas. As colônias brancas, que representam as bactérias transformadas com o plasmídeo, foram processadas para isolar o DNA plasmidial.

3.6.6 Extração do DNA plasmidial

Após a incubação das placas, as colônias de interesse foram selecionadas. Essas colônias foram cultivadas em 3 mL de meio 2XYT/ampicilina, a 37°C, por 18 horas, sob agitação constante, a 5g por minuto. Após esse período, os plasmídeos foram extraídos sedimentando-se as bactérias por centrifugação a 10.621g por 1 minuto. Após descarte do sobrenadante, ressuspendeu-se o precipitado em 400µl da solução tampão de lise (50mM de glicose, 25mM de Tri-HCL (pH=8.0), 10mM de EDTA e 4mg/ mL de lisozima). Após 5 minutos no gelo, 300µl de acetato de amônio 7,5M foram adicionados e os tubos de microcentrífuga foram mantidos a -20°C, por 10 minutos e submetidos a uma centrifugação final de 3 minutos, a 10.621rpm, a 4°C. O precipitado resultante foi ressuspenso em 50µl de H₂O destilada.

3.6.7 Confirmação da clonagem

Para confirmar a clonagem do fragmento amplificado no plasmídeo, foi realizada uma digestão enzimática utilizando a enzima de restrição *Eco RI*. Esta enzima cliva especificamente no sítio de clonagem do plasmídeo, permitindo a liberação do fragmento de 75 pares de bases. Previamente à clivagem, foi realizada uma pesquisa sobre os sítios de restrição também presentes no produto inserido (programa webcutter) para evitar a atuação da enzima neste local. Os produtos da

digestão dos DNAs plasmidiais foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

3.6.8 Curva-padrão a partir do plasmídeo

Após a confirmação da clonagem os plasmídeos recombinantes foram quantificados em espectrofotômetro a 260nm. Com o resultado obtido, foram realizadas as diluições sugeridas pelo protocolo da Applied Biosystems para confecção das curvas padrão a partir de DNAs plasmidiais. As diluições foram realizadas tomando por base o cálculo sugerido para a obtenção em gramas do peso molecular (M) do plasmídeo somado ao inserto. Portanto, a concentração obtida espectrofotometricamente é convertida em números de cópias utilizando-se o peso molecular do DNA plasmidial.

$$M=(n) \times (1,096 \text{ e-}21\text{g/pb})$$

n = tamanho do genoma em pb

M = massa

$$\text{e-}21 = 10^{-21}$$

3.7 – Padronização da Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) para VFA17D

Com o objetivo de detectar VFA17D em células cronicamente infectadas, assim como de diferenciar os vírus nas reações de interferência viral, padronizou-se a imunofluorescência indireta para vírus da febre amarela.

3.7.1 Produção de anticorpos anti-VFA17D em coelhos

A inoculação em coelhos para a produção de anticorpos anti-VFA17D foi realizada a partir do estoque do vírus VFA17D, em solução de albumina a 7,5%. A

vacina, fornecida pelo laboratório Biomanguinhos, Fiocruz, foi obtida por inoculação intracerebral do vírus em camundongos Swiss recém-nascidos.

Uma emulsão com proporção 1:1, com relação ao VFA17D e ao adjuvante completo de Freund (Sigma), foi preparada em capela de fluxo laminar. A emulsão foi preparada homogeneizando-se um volume de 1,0mL do estoque viral e 1,0mL do adjuvante até a formação de uma emulsão estável. A estabilidade da emulsão foi avaliada por sua dispersibilidade em água (Herbert, 1978). Imediatamente após o preparo da emulsão, 0,10mL da mesma foi aplicado por via subcutânea no coelho 1 e 0,50mL no coelho 2. Um reforço foi aplicado 14 dias após a aplicação inicial e, posteriormente, dois outros em intervalos de sete dias. A partir da segunda aplicação, a emulsão foi preparada com adjuvante incompleto de Freund (Herbert, 1978). Ao final do processo de imunização, o soro do animal foi coletado por punção cardíaca e estocado a -70°C até o momento do uso.

3.7.2 Determinação do título de anticorpos anti-VFA17D

A determinação do título do anticorpo anti-VFA17D no soro produzido foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA). O antígeno, VFA17D, foi diluído em solução tampão de carbonato de sódio 0,1M pH 9,5, a uma concentração final de $1,0\mu\text{g}/100\mu\text{L}$. Após a diluição, $100\mu\text{L}$ do material foram adicionados a cada cavidade da placa de 96 orifícios, para sensibilização da mesma. A adsorção foi realizada a 4°C durante a noite.

Após o período de adsorção, a solução de antígeno foi desprezada e cada cavidade da placa lavada com $200\mu\text{L}$ de solução contendo 0,05% de Tween em PBS. Essa etapa foi repetida quatro vezes, com intervalo de 1 minuto entre cada lavagem.

O bloqueio da placa foi realizado com solução de 0,05% Tween-gelatina 3% em PBS. Em cada cavidade foram adicionados 200µL da solução e, posteriormente, a placa foi mantida a 37 °C por 1 hora. A placa foi lavada com solução tampão PBS-Tween 0,05% conforme descrito anteriormente.

Os soros coletados dos coelhos controle e dos imunizados foram diluídos em solução tampão Tween 0,05%-gelatina 1% em PBS. Para cada soro, foram testados 100uL de diluição entre 1:50 e 1:25600. Os soros dos mesmos foram distribuídos na placa incubada por 1 hora, a 37 °C, e posteriormente lavada com solução tampão Tween 0,05% em PBS. Finalmente adicionou-se 100µL do conjugado de imunoglobulina caprina anti IgG de coelho, marcado com peroxidase, diluída 1:3.000 em glicerol, durante 1 hora, a 37°C. Em seguida, foram feitas as lavagens com solução tampão Tween 0,05% em PBS, e adicionou-se aos orifícios a solução reveladora OPD (0,1M ácido cítrico, 0,2M Na₂HPO₄, H₂O destilada e H₂O₂ 30 volumes). A placa foi incubada e protegida da incidência direta de luz durante 30 minutos. Um volume de 50µL da solução de parada da reação (2N H₂SO₄) foi adicionado e a leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 490nm.

Como controles foram utilizados: 1- O branco da reação, correspondente à um poço sensibilizado, que recebeu tratamento com todos os reagentes, porém que não recebeu o anticorpo primário 2- O controle do substrato (CS), correspondente ao poço sensibilizado que recebeu o tratamento com os anticorpos primários, porém não recebeu o tratamento com os anticorpos secundários.

3.7.3 Purificação dos anticorpos produzidos

Os soros dos coelhos imunizados foram purificados utilizando resina acoplada a proteína G, previamente equilibrada com solução tampão PBS. O soro foi

previamente centrifugado a 3213g durante 5 minutos, filtrado em filtros de 0,22 μ m (COSTAR) para, e em seguida, ser diluído da quantidade de 8 mL em 50mL de PBS. Esta solução foi aplicada na coluna a um fluxo constante. Posteriormente, a coluna foi lavada com 50mL de PBS e a eluição do anticorpo foi realizada com a solução tampão glicina (0,1M; pH2,7). A coleta do material foi realizada enquanto se observava um aumento na leitura da absorbância e o eluente foi sendo aliqotado em tubos de microcentrifugas juntamente com uma solução tampão de neutralização (Tris 1M, pH9,0). A coluna foi lavada com 50mL da solução tampão glicina de eluição e PBS e equilibrada com etanol a 20% antes da estocagem a 4^oC.

3.7.4 Cultivo e Infecção das células

As células C6/36 foram cultivadas a 28 °C em frascos de 25cm² utilizando meio L15 modificado (GIBCO-INVITROGEN-BRL), suplementado com soro fetal bovino (2-10%), triptose fosfato (10%) e antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 1 mg/mL) (Gubler *et al.*, 1984). Aproximadamente 2,0x10⁴ células foram transferidas para cada poço de uma lâmina de microscópio contendo 8 micropoços (LAB-TEK, SIGMA) e mantidas com 0,5 mL de L15 a 2% de soro fetal bovino por poço. As células foram mantidas a 28°C por 24 horas sendo em seguida infectadas com VFA17D, a 0,1 multiplicidade de infecção (MOI) e incubadas por 7 dias, antes da realização da reação de imunofluorescência.

3.7.5 Reação de Imunofluorescência Indireta para detecção de VFA17D

As células foram primeiramente lavadas por 2 vezes utilizando-se PBS sendo em seguida, fixadas em paraformaldeído 2%, por 20 min. Após 3 lavagens com PBS, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,3% em PBS, por 10min,

à TA. Após 3 lavagens de 5 minutos com PBS, os grupos hidroxila do paraformaldeído foram bloqueados com glicina 250mM em PBS acrescido de solução a 1% de soroalbumina bovina (BSA), por 5 minutos. Sítios inespecíficos foram bloqueados com BSA 1% em PBS por, 1 hora após 2 lavagens com PBS. As células foram então incubadas com imunoglobulinas de coelho anti-VFA (1:50), em PBS e 1% de BSA, por 1 hora. Após 3 lavagens com PBS, as células foram incubadas com IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugada do fluoróforo TRITC (Sigma), numa diluição de 1:600, em PBS, por 1 hora, à TA e protegidas da luz. As células foram lavadas 10 vezes com PBS, a lâmina foi mergulhada em água destilada, rapidamente seca em papel toalha e montada para microscopia com meio Fluormount (Southern Biotechnology Associates), sendo seladas com esmalte convencional. As imagens das células C6/36 foram registradas usando um microscópio Olympus BX40 equipado com filtros ópticos para capturar fluorescência verde e vermelha, acoplado a uma câmera Q-Color 5 (Olympus) com o software Q-Capture 2.68.6.

3.8 – Ensaio de Interferência Viral

3.8.1 Interferência viral em C6/36: DENV-2 e VFA17D / DENV-2 e VFABeH111

Esses ensaios para análise de interferência viral foram realizados utilizando, inicialmente, os vírus DENV-2 *New Guinea C* e VFA17D e posteriormente, DENV-2 *New Guinea C* e VFA BeH111. As infecções celulares foram realizadas utilizando MOI de 0,1 com o intuito de avaliar o perfil de replicação específico de cada vírus.

Os ensaios de interferência foram divididos em dois grupos: grupos controles, e os grupos das co-infecções.

Os grupos controles, garrafas de 25 cm² (Corning Incorporated[®]) contendo monocamadas confluentes de 4,5 X 10⁶ de C6/36, foram infectadas com DENV-2, VFA17D, VFABeH111, separadamente, com o intuito de observar o perfil replicativo de cada vírus. As infecções foram realizadas, após descarte do meio presente nas garrafas e breve lavagem das células com 5mL de PBS, por meio de incubação da monocamada celular com os vírus por 1hora a TA sob agitação constante. Diariamente, 0,28 mL de sobrenadante eram coletados das garrafas infectadas, aliqotados em tubos Eppendorf e estocados a -20⁰C até o momento do uso. Ao sétimo dia foram realizadas reações de IFI visando detectar a infecção viral na cultura celular.

No segundo grupo, foram realizados os experimentos de interferência viral propriamente dita, através da co-infecção viral, como descrito a seguir.

Garrafas de 25cm² (Corning Incorporated[®]) contendo monocamadas confluentes de 4,5 X 10⁶ células C6/36, foram inoculadas com quantidade suficiente do estoque de DENV-2 e VFA17D ou DENV-2 e VFABeH111 a um MOI de 0,1 para cada vírus. A infecção foi realizada após descartado meio inicial de crescimento com posterior lavagem utilizando 5 mL de PBS concentrado. As garrafas foram mantidas sob agitação por 1h/TA para que ocorresse a adsorção das partículas virais na superfície celular. Em seguida, após remoção do inóculo viral, foram adicionados aos frascos 5mL de meio L-15 com 2% de soro bovino fetal (SBF) e incubando-se os frascos a temperatura de 28 °C. No grupo 2, após incubação por 7 dias, a cronicidade da infecção viral foi detectada através de reações de IFI para DENV-2, VFA17D e VFABeH111. Somente as infecções confirmadas por resultado positivo da

IFI foram selecionadas para a co-infecção. Sendo assim, os meios das garrafas comprovadamente infectadas com DENV-2 e VFA17D foram vertidos em recipiente estéril. As garrafas infectadas com DENV-2 foram co-infectadas com VFA17D ou VFABeH111 e as garrafas infectadas com VFA17D ou VFABeH111 foram co-infectadas com DENV-2, de acordo com o protocolo descrito anteriormente para a infecção com apenas um vírus. A co-infecção foi realizada utilizando o mesmo MOI da infecção inicial. Após 24 horas, foram iniciadas as coletas diárias do meio de cultivo, durante 8 dias. Estes sobrenadantes foram aliquotados e estocados a -20°C até o momento do uso.

Para os dois grupos uma garrafa controle foi utilizada, contendo somente monocamadas confluentes de C6/36 em meio L15 com 2% de soro bovino fetal.

3.8.1.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI)

A reação de IFI para detecção da infecção por VFA17D ou VFABeH111, no sétimo dia da infecção, foi descrita no item 3.7.5. A reação de IFI para a detecção de infecção por DENV-2 foi realizada agitando-se levemente a garrafa infectada e depositando, $25\mu\text{l}$ de meio contendo as células do sobrenadante sobre uma lâmina de microscópio. As lâminas foram incubadas a 37°C durante 30 minutos, fixadas em acetona e lavadas em PBS contendo 2% de SBF entre cada passo, a fim de neutralizar os sítios inespecíficos. Em seguida, foi adicionado um “pool” de fluido ascítico de camundongos imunizados contra os DENV-2 (Henchal *et al.*, 1985), e um conjugado contra IgG de camundongo ligado a isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich®). As lâminas foram incubadas durante 30 minutos a 37°C , lavadas, secas e analisadas em um microscópio de fluorescência para determinar a presença ou ausência de infecção com base na fluorescência característica.

3.8.1.2 Extração do RNA viral

Extraíram-se os RNAs dos sobrenadantes coletados visando quantificar a produção diária de vírus. Os RNAs foram extraídos utilizando o kit QIAMP Viral RNA Kit (Qiagen, USA), como descrito previamente.

3.8.1.3 Quantificação absoluta – PCR Tempo Real

Os títulos virais produzidos nos grupos controle e de co-infecção foram determinados por ensaios de PCR em tempo real descritos no item 3.5.

3.8.1.4 Análise da morfologia celular: microscopia óptica comum

Foram realizados registros diários das células infectadas com os vírus DENV-2, VFA17D, assim como das células co-infectadas com os vírus nos ensaios de interferência viral com o objetivo de analisar possíveis alterações morfológicas provenientes da co-infecção viral. As garrafas foram observadas em microscópio de campo claro da marca CK2 e imagens foram capturadas.

3.8.2 Ensaios de interferência viral C6/36 utilizando reação de IFI

Objetivando-se distinguir pela cor a infecção por cada um dos vírus em uma mesma cultura durante a reação de interferência viral foram gerados anticorpos anti-VFA em coelho (item 3.7) revelados com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo TRITC (Sigma-Aldrich[®], USA), que emite coloração vermelha. Os anticorpos secundários utilizados nas reações de IFI para detecção de infecção de DENV-2 reconhecem IgG de camundongo e são conjugados ao fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich[®], USA), que emite coloração verde.

Aproximadamente $2,0 \times 10^4$ células foram transferidas para cada poço de uma lâmina de microscópio específica para cultivo celular seguido por realização de imunofluorescência, contendo 8 poços (Lab-Tek Chamber Slide System, SIGMA). As células foram mantidas com 0,5 mL de meio L15 com 2% de soro fetal bovino nos poços. As células foram infectadas inicialmente com o DENV-2 a um MOI de 1 e, após 7 dias de infecção, realizou-se a co-infecção com VFA17D, utilizando a mesma MOI. Também foram utilizados poços-controle com células não infectadas. Após 4 dias foi realizada a reação de IFI com dupla marcação seguindo o protocolo descrito no item 3.7.5, porém com as seguintes incubações referentes aos anticorpos primário e secundário: incubação das células co-infectadas, com IgGs de coelho anti-VFA (1:50) e IgGs de camundongos anti-DENV-2 (1:100) em PBS e 1% de BSA por 1 hora. Após 3 lavagens com PBS, foi realizada a incubação com IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugadas com o fluoróforo TRITC (Sigma) e com IgG de cabra anti IgG de camundongos conjugada com FITC (Sigma) numa proporção de 1:600 e 1:300 em PBS, respectivamente, por 1 hora a TA e ao abrigo da luz. As células foram lavadas por 10 vezes, durante 5 minutos cada, com PBS, a lâmina foi mergulhada em água destilada, rapidamente seca em papel toalha. As imagens das células C6/36 foram registradas usando microscópio Olympus BX40 equipado com filtros ópticos que permitem capturar fluorescência verde e vermelha, e acoplado a uma câmera Q-Color 5 (Olympus) com o software Q-Capture 2.68.6.

3.9 – Ensaio de competição

Foram realizados ensaios de competição, em que os vírus DENV-2 e VFA17D ou DENV-2 e VFABeH111 foram adicionados às células C6/36 simultaneamente. Dessa forma, garrafas de 25cm^2 (Corning Incorporated®) contendo monocamadas

confluentes com aproximadamente $4,5 \times 10^6$ células C6/36, foram inoculadas, ao mesmo tempo, com 0,1 MOI de DENV-2 e VFA17D ou DENV-2 e VFABeH111. A infecção foi realizada após descarte do meio inicial de crescimento com posterior lavagem utilizando 5 mL de PBS concentrado. As garrafas ficaram sob agitação por 1h/TA para que ocorresse a adsorção das partículas virais na superfície celular e, em seguida, após a retirada do inóculo viral, foram adicionados 5mL de meio L-15 com 2% de soro bovino fetal (SBF). Os frascos foram incubados a 28 °C. Coletas de 0,28µl do sobrenadante foram realizadas 24 horas após a infecção.

3.10 – Ensaio de Interferência viral em U937

Assim como em células C6/36, a interferência viral foi analisada na linhagem monocítica U937. Foram realizados os ensaios de interferência viral utilizando-se, inicialmente, os vírus DENV-2 *New Guinea C* e VFA17D. As infecções celulares foram realizadas utilizando-se MOI de 0,1 com o intuito de se avaliar o perfil específico de replicação de cada vírus. Assim, como no ensaio em C6/36, foram utilizados grupos controle e grupo das co-infecções.

Nos dois grupos, duas garrafas de 25 cm² (Corning Incorporated®) correspondentes a cada grupo, apresentando células em suspensão, foram infectadas com o vírus DENV-2 e VFA17D, separadamente, com MOI de 0,1. Para a infecção, as células em suspensão foram centrifugadas a 239g durante 5 minutos e o precipitado celular ressuspendido com o vírus e incubado durante 1 hora, a 37°C, para a adsorção viral. Posteriormente à adsorção, as células foram lavadas com PBS, conforme descrito acima, para retirada dos vírus restantes no sobrenadante, foi adicionado 1 mL de meio RPMI suplementado com 0,5% de SFB e antibióticos a cada poço (Invitrogen®), sendo mantidas a 37°C. No grupo controle as coletas de

1mL do sobrenadante celular foram realizadas 24 horas após a infecção. Após 4 dias, fez-se uma reação de IFI para avaliar a presença de infecção viral e posteriormente, realizou-se o ensaio de co-infecção viral, de uma maneira cruzada, ou seja, células inicialmente infectadas com DENV-2 foram co-infectadas com VFA17D e vice-versa.

Foram utilizados os mesmos vírus das infecções iniciais no MOI de 0,1 e as coletas foram realizadas 24 horas após a infecção. Os sobrenadantes coletados nos dois grupos foram centrifugado a 106g, durante 4 minutos, aliquotados e congelados a -70°C até o momento do uso. Para os dois grupos uma garrafa controle foi utilizada contendo somente células em suspensão em meio RPMI suplementado com 0,5% de SFB e antibióticos.

3.10.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI)

A reação de IFI para a confirmação da infecção com DENV-2 e VFA17D foi realizada como descrito no item 3.8.1.1.

3.10.2 Extração do RNA viral

A extração do RNA viral do sobrenadante celular foi realizada como no item 3.8.1.2.

3.10.3 PCR em Tempo Real

A reação de quantificação absoluta realizada utilizando PCR em Tempo Real foi realizada como na descrição em 3.8.1.3.

3.11 – Análise estatística

As diferenças entre as médias dos grupos experimentais foram realizadas por análise de variância (Two-Way ANOVA), seguida pelo pós-teste de comparação de Bonferroni, utilizando o programa GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Software, San Diego, EUA). Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

IV – RESULTADOS

4.1 – Titulação viral por unidades formadores de placas (PFU)

Utilizando ensaios de placa, foi possível titular os estoques de DENV-2 e VFA17D e VFABeH111 (tabela 02).

Tabela 02: Títulos dos estoques dos vírus DENV-2 *New Guinea C* e VFA cepas 17D e BeH111.

| Vírus | Cepas | PFU/ml |
|---------------|---------------------|-------------------|
| DENV-2 | <i>New Guinea C</i> | $6,5 \times 10^6$ |
| VFA | <i>17D</i> | $6,0 \times 10^7$ |
| VFA | <i>BeH111</i> | $1,0 \times 10^8$ |

4.2 - Otimização da Reação: Transcrição Reversa seguida por reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e avaliação da especificidade dos oligonucleotídeos

Após as otimizações das reações de RT-PCR para se estabelecer as concentrações ideais assim como temperaturas ideais de anelamento dos primers, avaliou-se a especificidade dos mesmos para os respectivos vírus.

Foram obtidos amplicons específicos para os vírus quando testamos moldes de RNAs de DENV-2 com oligonucleotídeos tanto para DENV-2 quanto para VFA, e da mesma maneira para os moldes para VFA (figura 6).

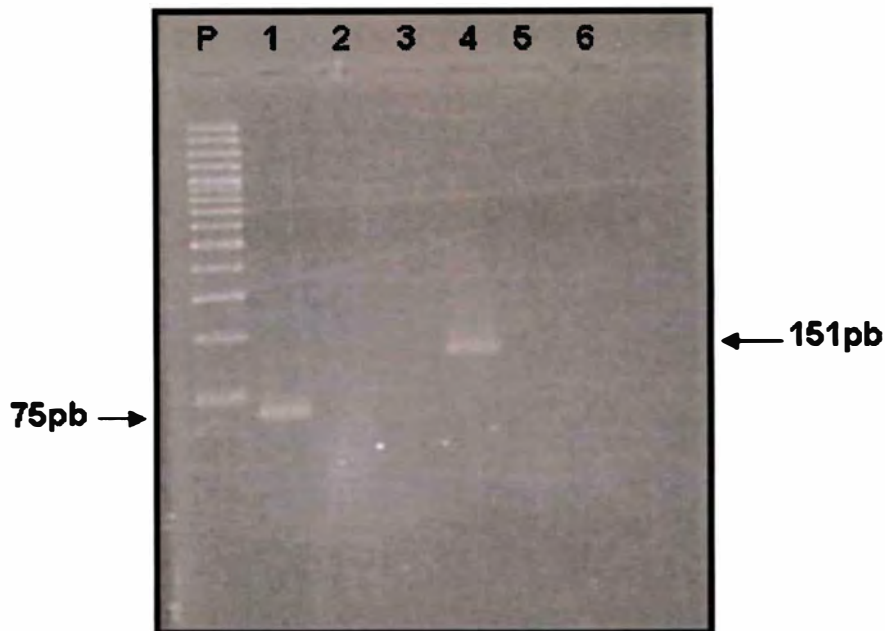


Figura 6: Reação de PCR para análise de especificidade do oligonucleotídeos: Eletroforese realizada em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo 1,0 μ g/ml (P) Mobilidade relativa das bandas do padrão de peso molecular de 100pb. (1) Produto da RT-PCR de 75pb resultante da reação com RNA molde VFA17D e oligonucleotídeos desenhados para VFA – controle positivo (2) Produto da RT-PCR resultante da reação com RNA molde DENV-2 e oligonucleotídeos para VFA (3) Controle negativo da reação. (4) Produto da RT-PCR de 151pb resultante da reação com RNA molde DENV-2 e oligonucleotídeos desenhados para DENV-2 – controle positivo (5) Produto da RT-PCR resultante da reação com RNA molde VFA17D e oligonucleotídeos desenhados para DENV-2. (6) Controle negativo da reação.

4.3 – PCR em Tempo Real

4.3.1 Padronização das curvas-padrão

A partir de estoques virais de DENV-2 e VFA17D previamente titulados foram realizadas seis diluições decimais seriadas para cada estoque viral. Foram realizadas as extrações de RNA em cada diluição e estes foram utilizados na PCR em Tempo Real utilizando-se o Kit Sybr Green One-Step. O objetivo era obter uma curva padrão com adequado coeficiente de correlação entre concentração da amostra e número de ciclos. A obtenção de curvas padrão, com coeficientes de correlação adequados, possibilita a realização de uma acurada quantificação da produção viral em amostras coletadas nos ensaios de interferência viral. A figura 7

exibe uma curva padrão considerada adequada para a análise das amostras. A figura 8 representa o gráfico da emissão de fluorescência dos padrões obtidos e a figura 9 exibe a curva de dissociação fornecida pelo programa avaliando a especificidade da reação.

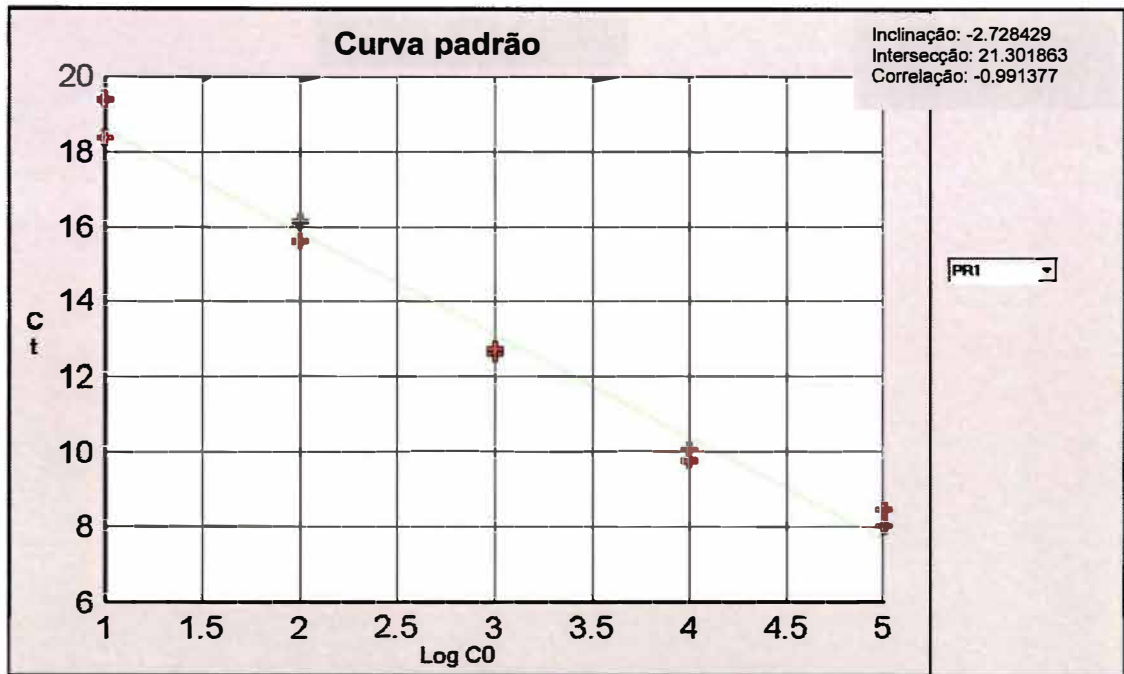


Figura 7: Representação de uma curva padrão obtida a partir da diluição de estoques virais previamente titulados:. A curva padrão é expressa com o valor de Ct (*cycle threshold*) versus log Ct. Os números expressos no lado direito superior representam os valores de inclinação da reta, intersecção, assim como o coeficiente de correlação.

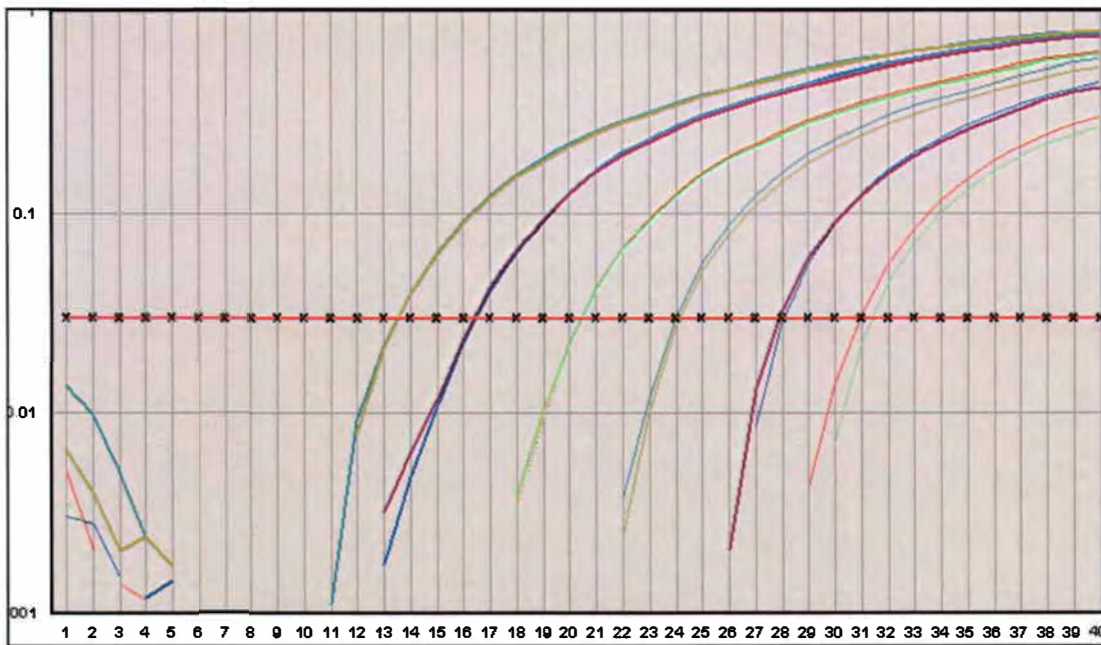


Figura 8: Gráfico da emissão de fluorescência gerado por incorporação de corante fluorogênico SYBR Green em dupla fita de DNA resultante da amplificação do alvo. A técnica empregada realiza etapas de amplificação, detecção e quantificação dos produtos gerados em tempo real. Após amplificação do alvo o corante SYBR Green se incorpora na dupla fita recém-sintetizada e emite fluorescência que o sistema de monitoramento detecta. Durante as etapas de ciclagem, a fluorescência emitida é usada na construção de um gráfico de quantidade de produtos gerados. Os resultados são analisados com base no valor de Ct (cycle threshold – ciclo limiar), que corresponde ao número de ciclos onde a amplificação das amostras atinge um limiar de detecção. A figura demonstra os resultados obtidos da amplificação dos RNAs de seis amostras diluídas de forma decimal a partir de um estoque de $6,5 \times 10^6$ vírus/ml. A amostra com o menor Ct (entre os ciclos 13 e 14) corresponde àquela com maior concentração de RNA viral, ao contrário da amostra mais diluída que apresenta o maior Ct.

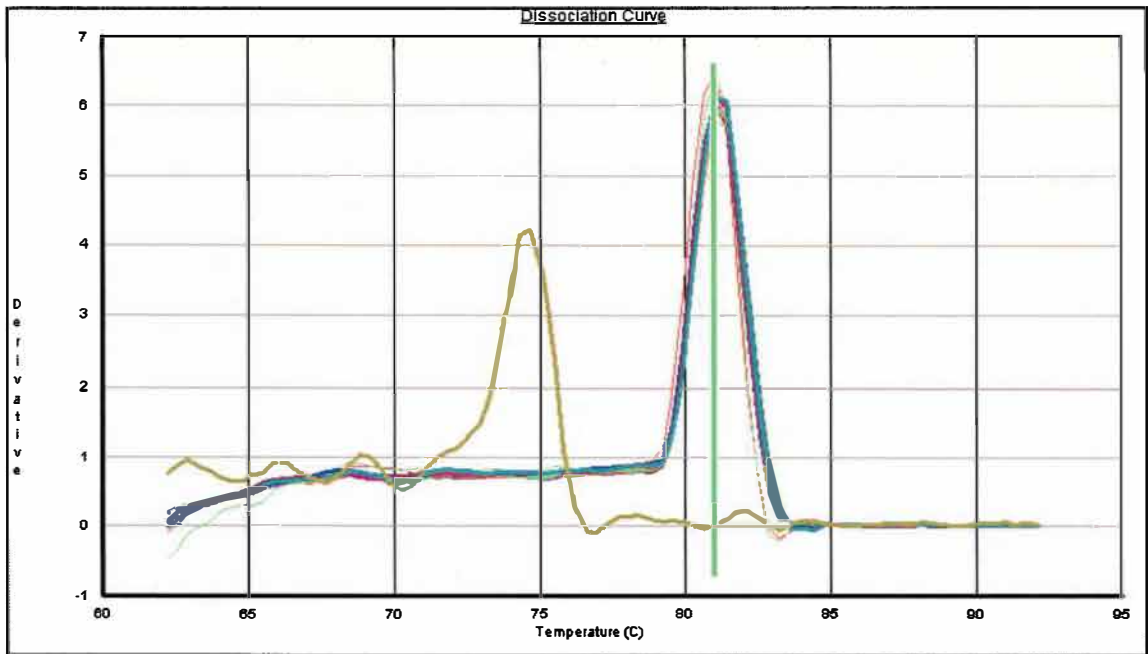


Figura 9: Representação de curvas de dissociação para análise de especificidade da reação. A amplificação específica da molécula-alvo foi analisada através da curva de dissociação, comparando os picos obtidos da dissociação do produto amplificado à temperatura de *melting* do fragmento de amplificação esperado. A figura demonstra os resultados obtidos da dissociação de duas temperaturas de *melting* diferentes. Em 1 T_m da amostra controle negativo, 2 pico de fluorescência das amostras diferindo do controle negativo.

T_m -Temperatura de *Melting*. – A temperatura de *melting* é definida como a temperatura na qual 50% das moléculas de uma dada população de DNA dupla fita encontram-se dissociadas, em forma de fita simples. A temperatura de *melting* para uma dada molécula de DNA depende exclusivamente do sua extensão e de sua composição nucleotídica.

4.4 – Clonagem do vírus da febre amarela e dengue

A estratégia de clonagem dos vírus dengue e febre amarela foi delineada como uma segunda opção para se confeccionar curvas-padrão para PCR em tempo real. Após a realização da clonagem conforme descrito no item 3.6 de materiais e métodos, obtivemos resultados satisfatórios para os dois vírus em estudo. Os resultados estão nas figuras 10 e 11 que mostram a análise de restrição do plasmídeo recombinante com *EcoRI* e a liberação dos fragmentos de 75pb para VFA e 151pb para DENV.

Porém, como comentado anteriormente, essa foi uma estratégia delineada paralelamente às tentativas para obtenção de um estoque com altos títulos virais, que

possibilitasse a realização de no mínimo 5 diluições em seqüência para a construção da curva, o que no decorrer do trabalho foi obtido com sucesso. Dessa forma não foram utilizadas curvas-padrão obtidas a partir do plasmídeo recombinante.

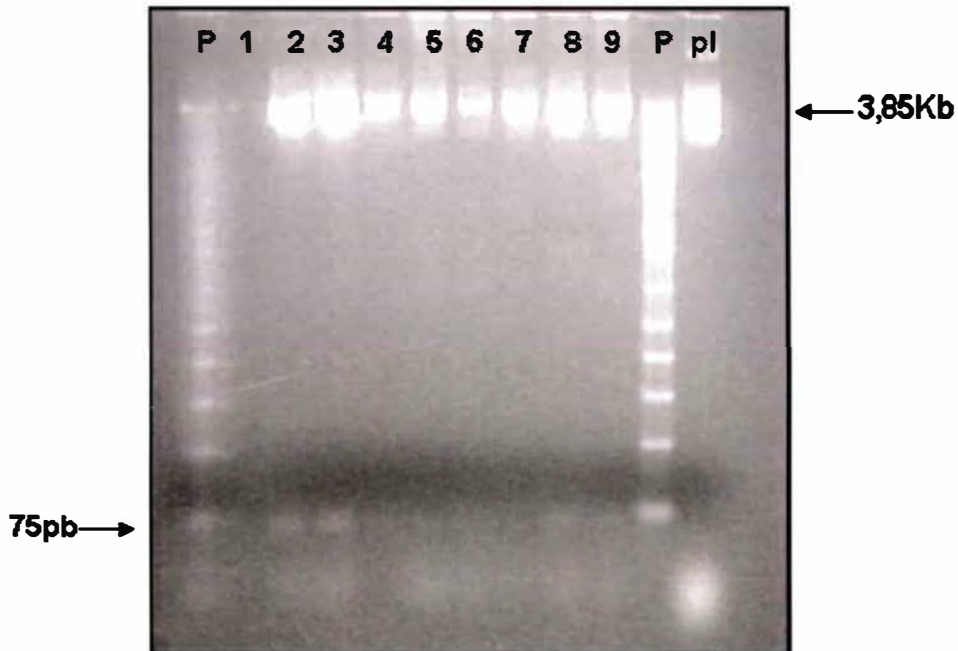


Figura 10: Gel de agarose 0,8% representando a confirmação da clonagem do fragmento de VFA17D via análise de restrição: (P) Marcador de peso molecular de 100 pares de bases; (2, 3, 8 e 9) Plasmídeos recombinantes apresentando o fragmento de 75pb liberado após digestão com *Eco* RI (pl); (5, 6 e 7) plasmídeos com resultados negativos para a clonagem; Controle: pDrive não recombinante.

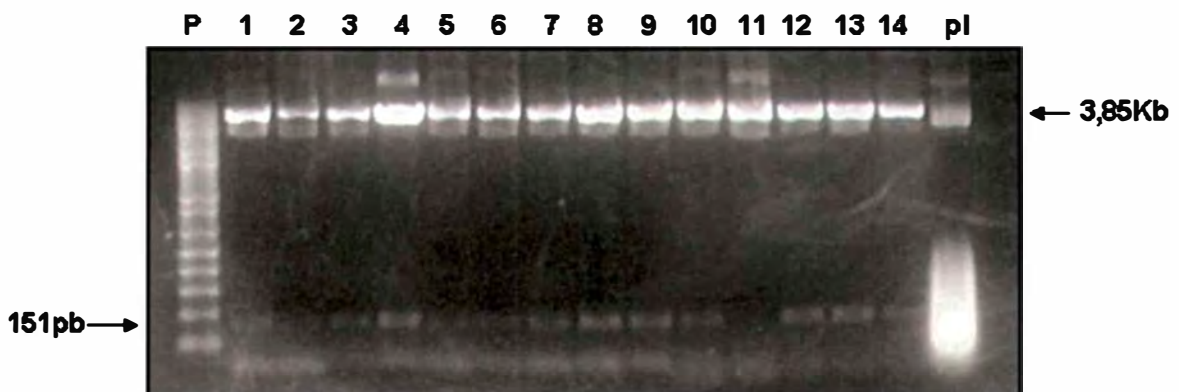


Figura 11: Gel de agarose 0,8% representando a confirmação da clonagem do fragmento de DENV-2 via análise de restrição: (P) Marcador de peso molecular de 100 pares de bases; (1 a 14 – com exceção de 12): Plasmídeos recombinantes apresentando o fragmento de 151pb liberado após digestão com *Eco*RI (pl); Controle: pDrive não recombinante.

4.5 – Padronização da Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) para detecção de infecção por VFA

4.5.1 Determinação do título dos anticorpos anti-VFA17D

A determinação do título dos anticorpos anti-VFA17D obtidos em dois coelhos foi realizada conforme descrita em materiais e métodos, item 3.7.2. Os resultados indicam que os anticorpos mostraram um grande potencial para reconhecimento do antígeno: mesmo na maior diluição testada (1:25.600), foi detectado um sinal de 10-15 vezes maior que do animal controle. Estes resultados são apresentados na tabela 3.

Tabela 03: Valores em absorbância do título dos anticorpos nos coelhos 1, 2 e controle nas diferentes diluições. Os valores correspondem às leituras de absorbância em um teste imunoenzimático – ELISA. (C1- coelho 1; C2 – coelho 2; CC – coelho controle)

| | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:400 | 1:800 | 1:1600 | 1:3200 | 1:6400 | 1:12800 | 1:25600 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|---------|
| C 1 | 0,331 | 0,380 | 0,360 | 0,331 | 0,271 | 0,286 | 0,148 | 0,148 | 0,062 | 0,036 |
| C 2 | 0,358 | 0,396 | 0,348 | 0,304 | 0,234 | 0,228 | 0,194 | 0,143 | 0,072 | 0,042 |
| CC | 0,019 | 0,008 | 0,006 | 0,003 | 0,005 | 0,004 | 0,002 | 0,005 | 0,004 | 0,003 |

4.5.2 Reação de IFI para VFA

A padronização da reação de IFI para VFA se mostrou satisfatória uma vez que a realização da reação de imunofluorescência, utilizando o protocolo descrito no item 3.7.5 em materiais e métodos, permitiu detectar a infecção por VFA nas células previamente infectadas de maneira específica e sensível.

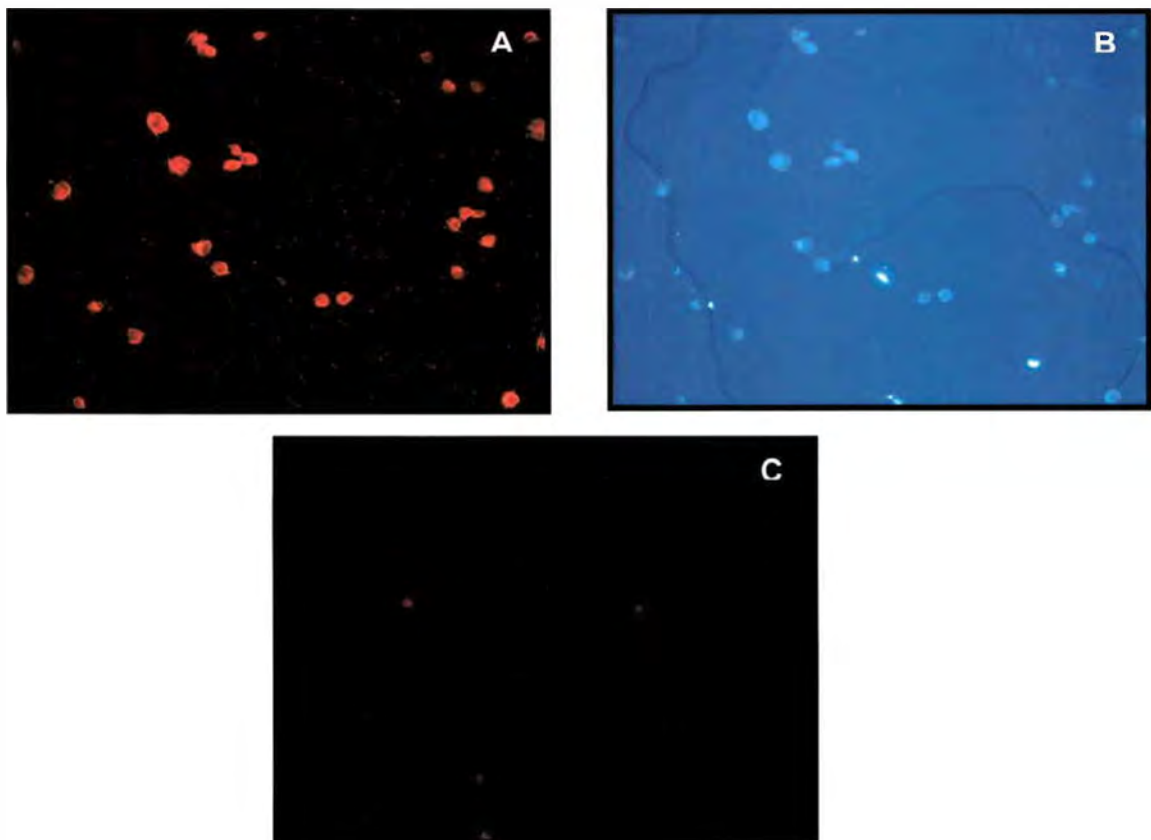


Figura 12: Reação de IFI para detecção do vírus YF. Quadro A – IFI positiva para VFA 17D (aumento 10X). **Quadro B** – Visualização das células por microscopia de campo claro (aumento 10X). **Quadro C** - Controle negativo – células não infectadas (aumento 10X). Como pode ser observado, as células não infectadas (painel C) apresentaram sinais, os quais podem ser diferenciados daqueles obtidos para as células infectadas (painel A) pela diferença da intensidade de emissão de fluorescência.

4.6 – Ensaio de Interferência viral em C6/36

4.6.1 Interferência viral entre VFA17D e DENV-2

Para avaliar a capacidade de infecção e replicação de um vírus em células previamente infectadas pelo outro vírus, foram realizados ensaios de interferência entre os vírus DENV-2 e VFA17D, conforme descrito no item 3.8.

A figura 13 representa os perfis de amplificação dos vírus DENV-2 e VFA17D. Nela estão representados o inóculo inicial e amostras obtidas diariamente por 10 dias a partir do primeiro dia após o inóculo e realizadas em intervalos de 24 horas.

Com relação ao perfil de replicação de DENV-2, observa-se uma queda no título viral após a inoculação do vírus nas células. Esse período corresponde à entrada dos vírus nas células e é descrito como período de eclipse viral, com duração de aproximadamente 48 horas. A partir deste momento, inicia-se a produção de vírus que aumenta até atingir níveis maiores que os do inóculo e se mantém constante (com pequena variação diária) até o décimo dia, mostrando a cronificação da infecção por estes vírus em células C6/36.

O padrão de replicação do VFA17D é semelhante ao do vírus DENV-2, provavelmente, demonstrando uma característica comum aos vírus da família *Flaviviridae*, porém com uma maior queda do número de cópias de RNA nos dois dias iniciais para VFA17D do que para DENV-2.

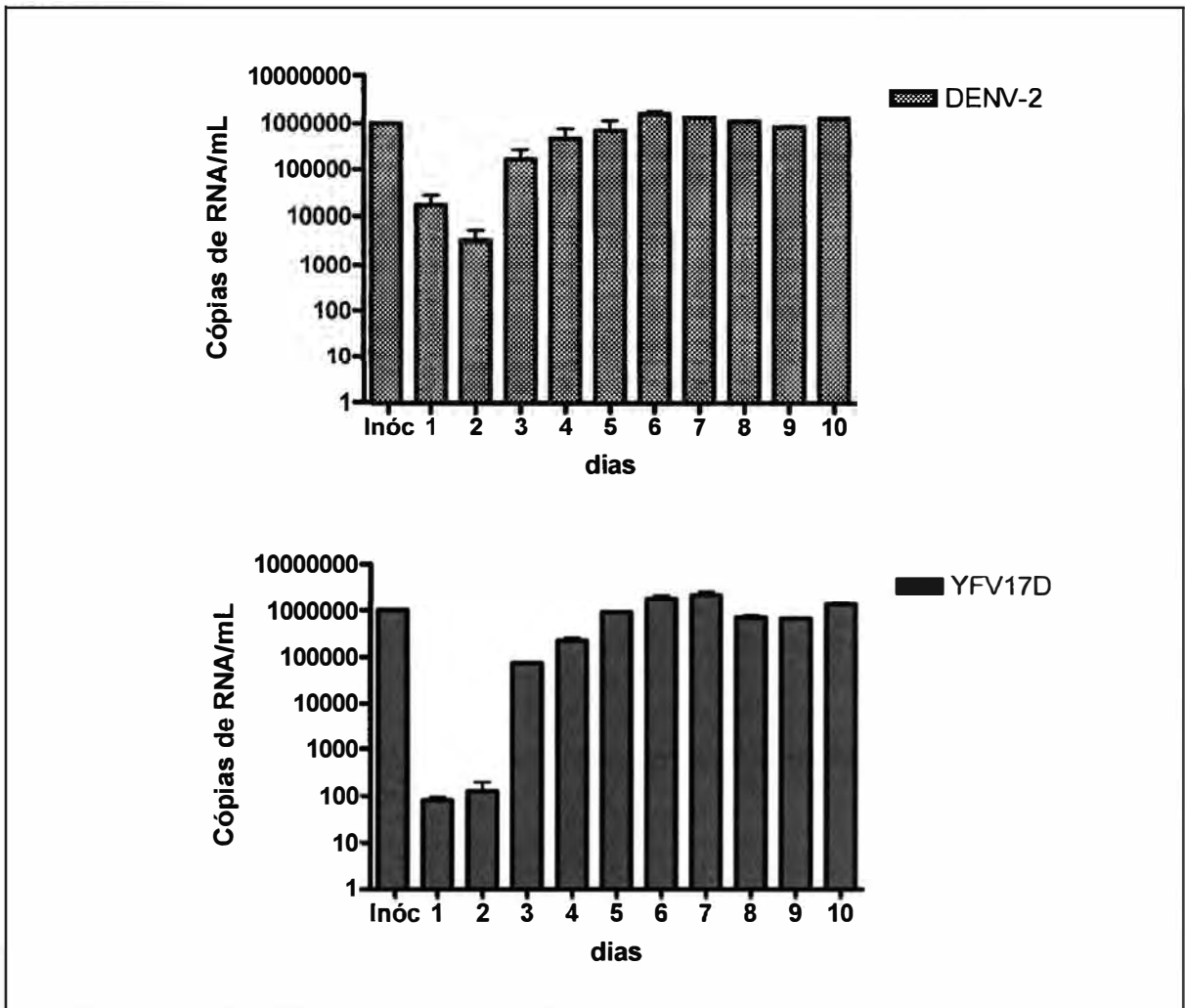


Figura 13: Perfil de replicação de DENV-2 e VFA17D. Os gráficos representam a quantificação diária do RNA viral realizado por PCR em tempo real. A coleta do sobrenadante foi realizada durante 10 dias em intervalos de 24 horas. A primeira barra representa o inoculo viral. Os gráficos apresentam dados representativos da média de N=3 experimentos independentes.

Os experimentos de interferência viral em que as células foram inicialmente infectadas com o VFA17D, e 7 dias depois, com o DENV-2, estão indicados por VFA17D /DENV-2. Os experimentos das infecções iniciais com DENV-2 e 7 dias após com VFA17D estão representados por DENV-2 /VFA17D. As quantificações dos RNAs virais extraídos dos sobrenadantes coletados durante 8 dias após a co-infecção estão representados nos gráficos abaixo.

Nos ensaios DENV-2 /VFA17D (figura 14), podemos observar que houve uma diminuição da replicação do VFA17D quando comparado ao controle positivo. Ou seja, células derivadas de *Ae. albopictus* cronicamente infectadas com DENV-2 se apresentaram menos permissivas à replicação do VFA17D.

Nos experimentos VFA17D /DENV-2, uma infecção prévia com VFA17D também favorece uma diminuição dos níveis de RNA viral de DENV-2 nos sobrenadantes coletados, porém de uma maneira menos acentuada do que aquela observada com VFA17D (figura 15).

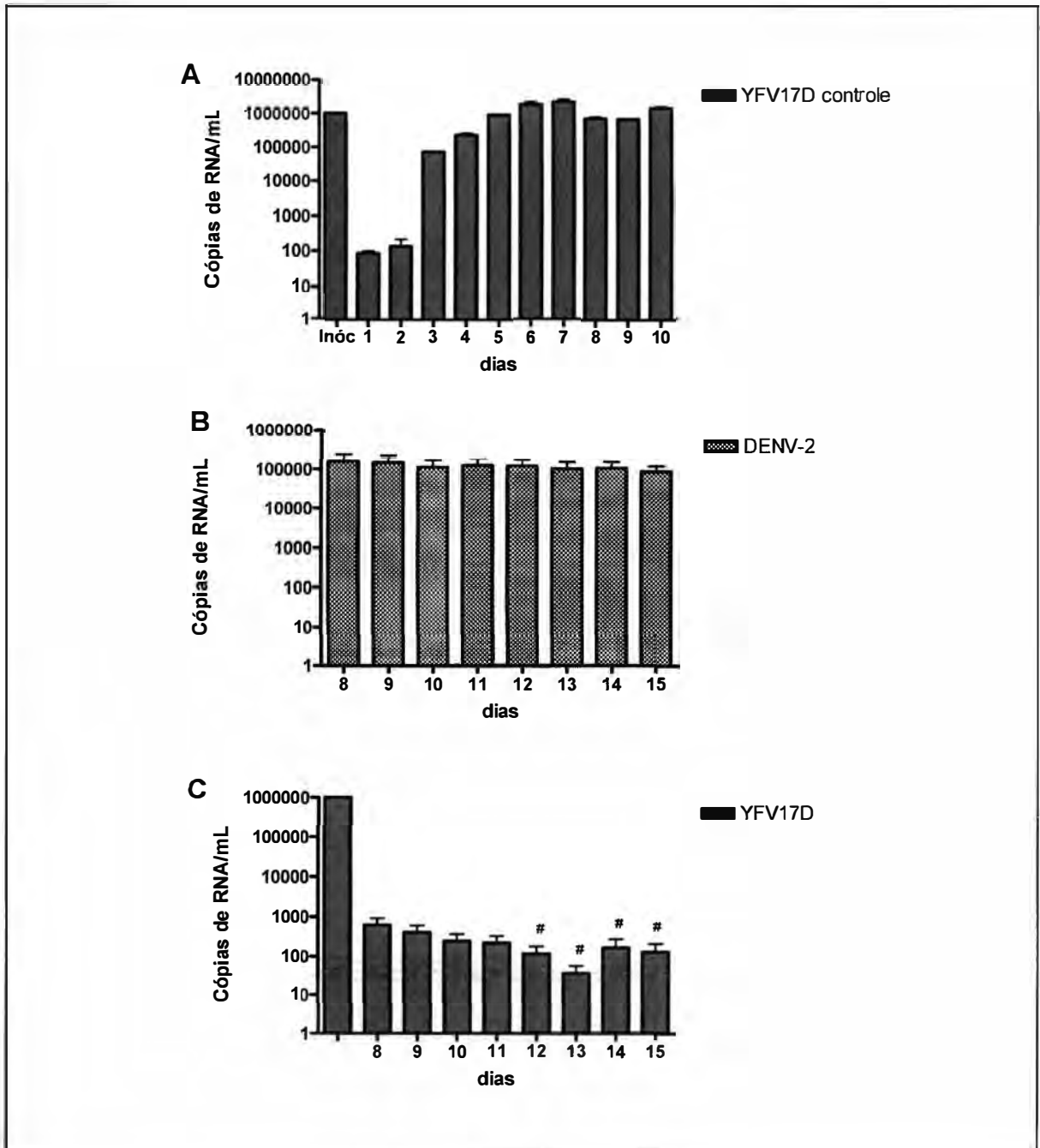


Figura 14: Interferência Viral DENV-2/VFA17D: As células C6/36 foram inicialmente infectadas com o vírus DENV-2 e 7 dias após confirmação da positividade da infecção, co-infectadas com VFA17D e 24 horas p.i (pós-infecção) iniciadas as coletas do sobrenadante. As coletas foram realizadas durante 10 dias em intervalos de 24 horas. A MOI utilizada foi de 0,1. Em A está representado o gráfico controle com o perfil de replicação para o vírus VFA17D. Em B e C estão representados os perfis de replicação de DENV-2 e VFA17D, respectivamente, após a co-infecção com o vírus da febre amarela. Os gráficos representam a média de N=3 experimentos independentes. # $p < 0,001$ vs controle (A) (Teste One-Way ANOVA).

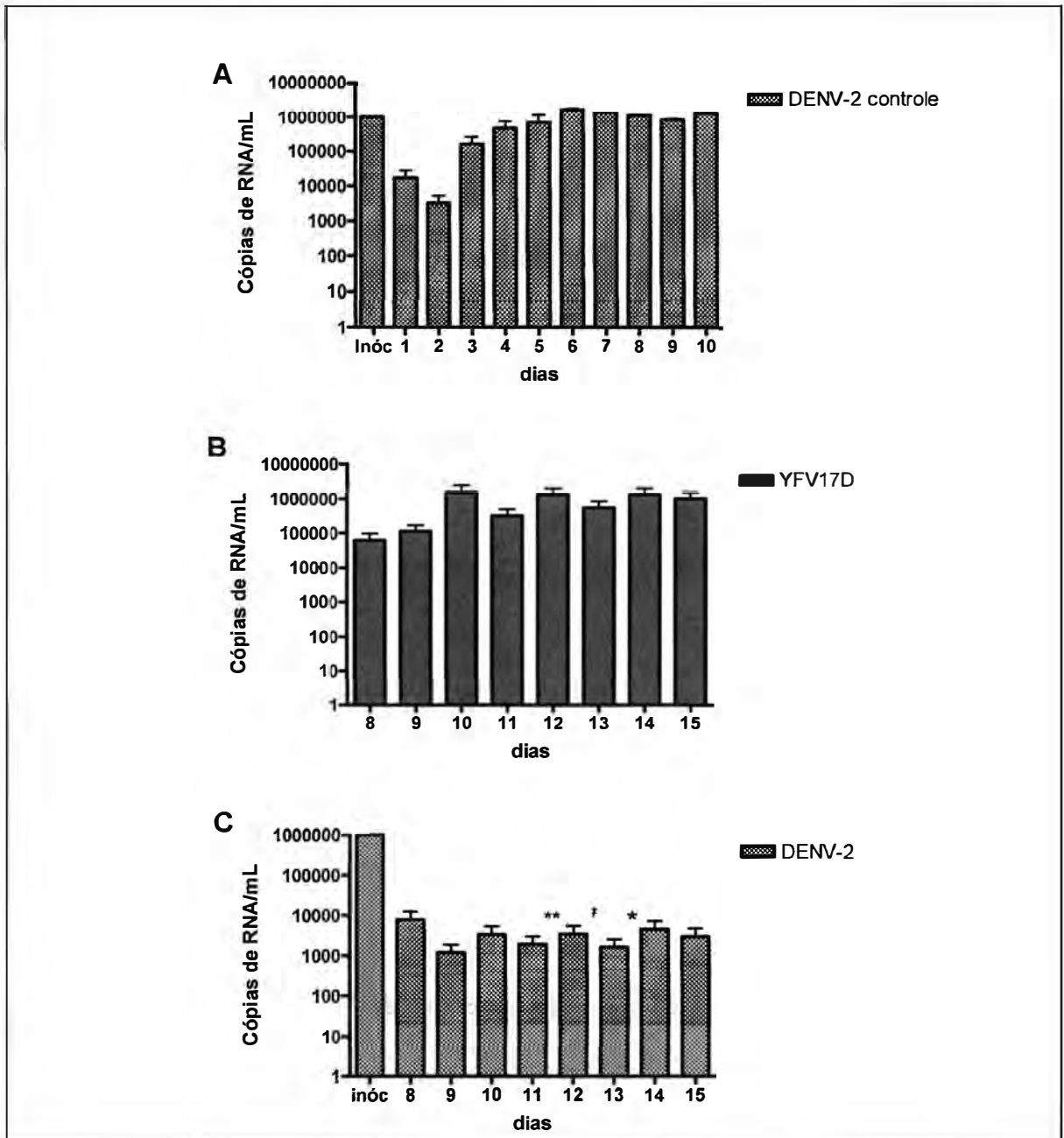


Figura 15: Interferência Viral VFA17D /DENV-2: As células C6/36 foram inicialmente infectadas com o vírus VFA17d e 7 dias após confirmação da positividade da infecção, co-infectadas com DENV-2. As coletas foram realizadas 24 horas após a infecção (p.i.). As coletas foram realizadas durante 10 dias em intervalos de 24 horas. A MOI utilizada foi de 0,1. Em A está representado o gráfico controle com o perfil de replicação para o vírus DENV-2. Em B e C estão representados os perfis de replicação de VFA17D e DENV-2, respectivamente, após a co-infecção com o vírus da febre amarela. Os gráficos representam a média de N=3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ vs controle (A), ** $p < 0,01$ vs controle (A), † $p < 0,001$ (Teste One-Way ANOVA).

4.6.2 Análise da Morfologia Celular

Células C6/36 submetidas aos ensaios de interferência viral com os vírus DENV-2 e VFA17D foram fotografadas diariamente em campo claro a fim de se acompanhar a presença ou ausência de alterações morfológicas visíveis microscopicamente. Ao visualizarmos a morfologia celular diariamente, podemos perceber uma alteração nas células infectadas inicialmente com DENV-2 e após 7 dias com VFA17D quando comparadas ao controle celular, que corresponde a células com o mesmo período de cultura (figura 17). Porém, essas alterações não foram visualizadas nas infecções do tipo VFA17D e 7 dias após DENV-2, também quando comparadas ao controle (figura 17). A figura 16 representa as culturas controles, ou seja, com as infecções com os vírus isoladamente.

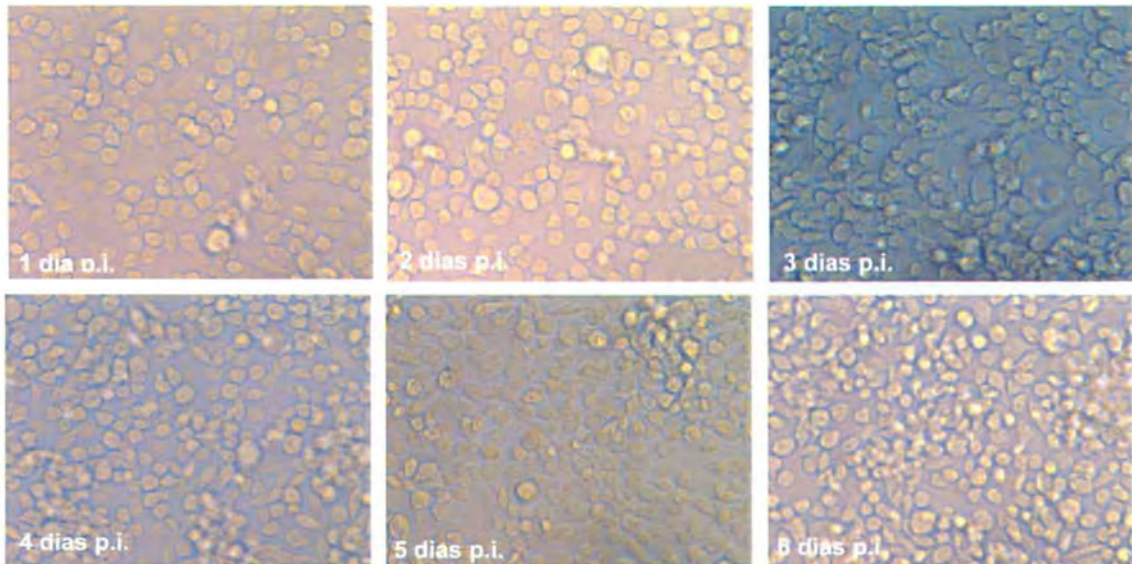
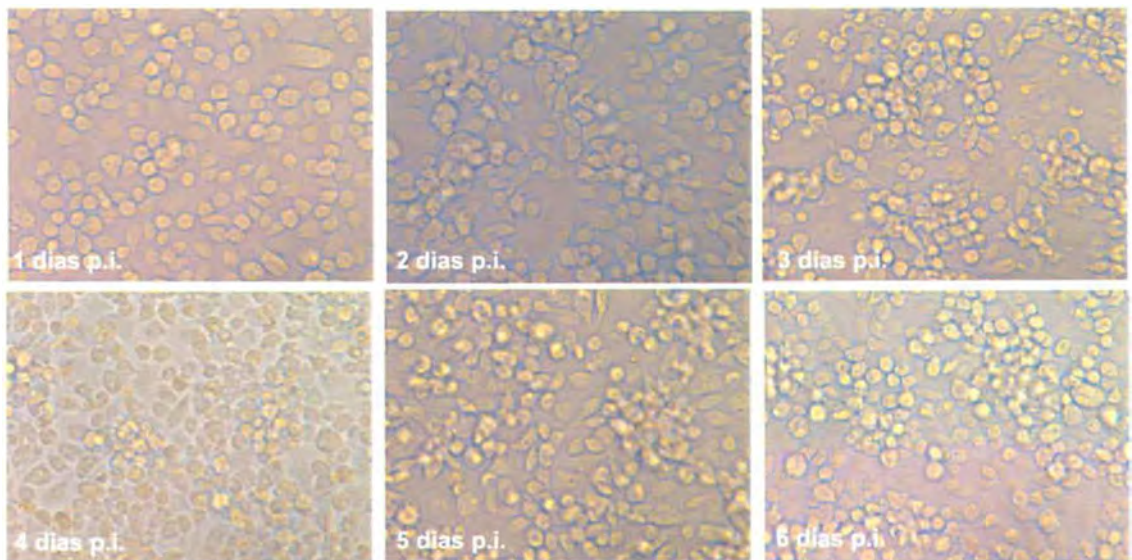
A – C6/36 infectadas com DENV-2**B – C6/36 infectadas com YFA17D**

Figura 16: Morfologia das células C6/36 infectadas somente com DENV-2 e YFV17D, em microscopia de campo claro: (A) Controle de C6/36 infectadas com DENV-2. Estão representados os 6 dias iniciais da infecção, previamente à co-infecção com YFV 17D (B) Controle de C6/36 infectadas com YFV 17D. Estão representados os 6 dias iniciais da infecção, previamente à co-infecção com DENV-2.

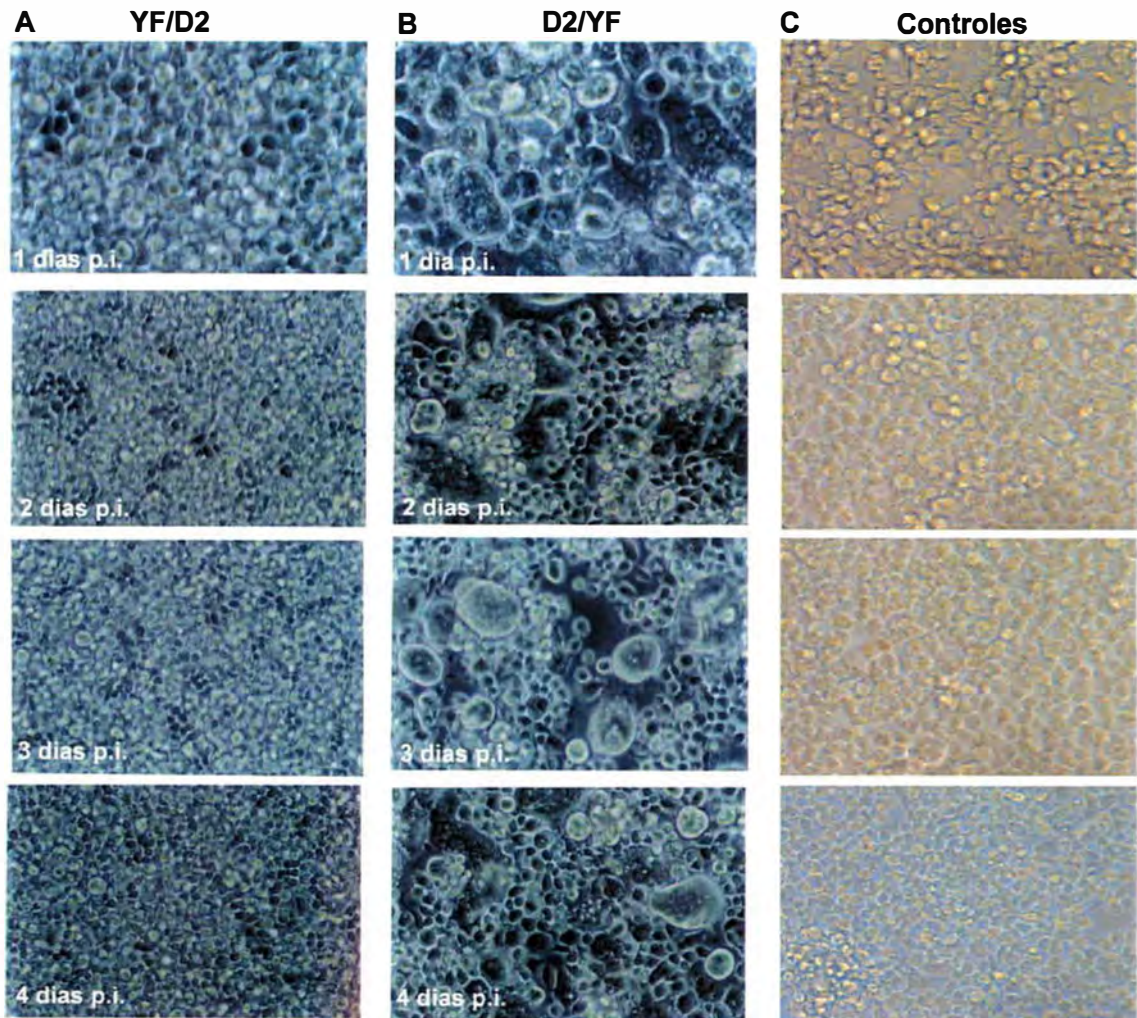


Figura 17: Morfologia das células C6/36 em microscopia de campo claro: (A) Coluna mostrando as células C6/36 inicialmente infectadas com YFV17D e sete dias após com DENV-2. Estão representados os dias 1 a 4, após co-infecção (p.i.) com o segundo vírus. (B) Coluna mostrando as células C6/36 inicialmente infectadas com DENV-2 e sete dias após com YFV17D. Estão representados os dias 1 a 4, após co-infecção (p.i.) com o segundo vírus. (C) As células controles, sem infecção viral, correspondem a células com o mesmo período de cultura.

4.6.3 Visualização da interferência viral utilizando reação de IFI: VFA17D e DENV-2

Com o objetivo de visualizar a ocorrência de interferência viral, foram realizados ensaios de IFI. Os ensaios de interferência viral em C6/36 foram realizados em lâminas para imunofluorescência providas de micropoços (Lab-Tek Chamber Slide System, SIGMA) de acordo com o protocolo descrito em 3.8.2.

As imagens mostraram a infecção preferencial pelo vírus DENV-2 (figura 18 – A e C) comparada ao VFA17D (figura 18 – B e D), como mostram os campos representativos da figura 18. Nesta figura A e B, assim como C e D representam o mesmo campo observados com comprimentos de onda específicos para os fluoróforos TRITC e FITC. Os campos foram observados utilizando-se o mesmo tempo de exposição para os dois fluoróforos.

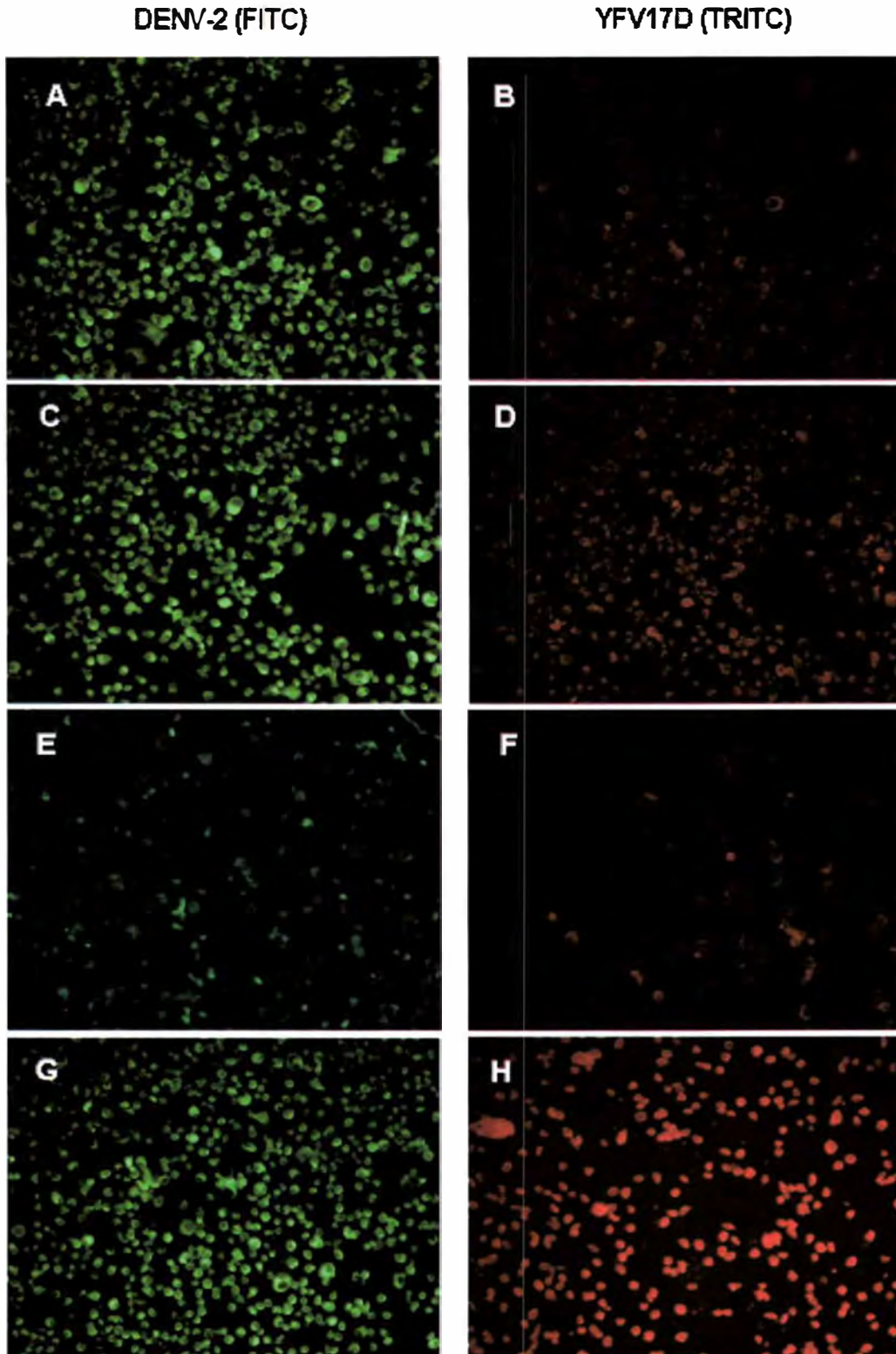


Figura 18: Reação de IFI em ensaio de interferência viral: Os ensaios de interferência viral em C6/36 foram realizados em lâminas para imunofluorescência providas de micropoços. As células foram cultivadas e infectadas inicialmente com DENV-2 e 7 dias p.i. infectadas com YFV17D. A reação foi realizada utilizando-se anticorpos anti-YFV17D e anti-DENV-2 e com os fluoróforos TRITC e FITC para YFV17D e DENV-2, respectivamente. (A) e (C), mostram imunofluorescência positiva para DENV-2 após a realização do ensaio de interferência viral com infecção inicial com DENV-2 e 7 dias após, co-infecção com YFV17D ; (B) and (D), mostram uma imunofluorescência menos positiva para YFV17D após o ensaio de interferência anteriormente descrito; (E) and (F), controles negativos – células sem infecção. (G) e (H), controles positivos – células infectadas somente com DENV-2 e YFV17D, respectivamente. No momento da leitura da IFI todos os campos foram submetidos ao mesmo tempo de exposição.

4.6.4 Interferência viral entre VFABeH111 e DENV-2

Após a observação da interferência viral entre DENV-2 e VFA17D, com uma acentuada redução da replicação de VFA17D nos experimentos DENV-2 /VFA17D, nos questionamos se os resultados observados estariam condicionados à utilização de uma cepa vacinal nos experimentos. Dessa forma, seguindo a mesma linha de raciocínio anterior, delineamos um experimento de interferência utilizando a cepa selvagem de VFA denominada BeH111.

Os resultados confirmam os dados anteriores com a observação da ocorrência de interferência quando as células são inicialmente infectadas com DENV-2 e, posteriormente, com VFABeH111, com uma redução da replicação de VFABeH111 (figura 20) quando comparado ao controle (figura 19). No entanto, nos experimentos envolvendo a infecção inicial de C6/36 com o vírus selvagem e posteriormente com DENV-2, não foi possível realizar a quantificação dos dois vírus. Averiguamos neste ensaio que as células infectadas com a cepa selvagem do VFA no experimento controle permaneciam viáveis até o máximo de 8 dias assim, quando adiantamos a co-infecção com DENV-2 para o 3^o ou 4^o dia a morte celular ocorreu no dia seguinte à co-infecção. Dessa forma, podemos supor que a co-infecção viral se mostrou apenas como um fator acelerador do processo de morte celular. Essa observação se confirmou em todos os 3 experimentos realizados.

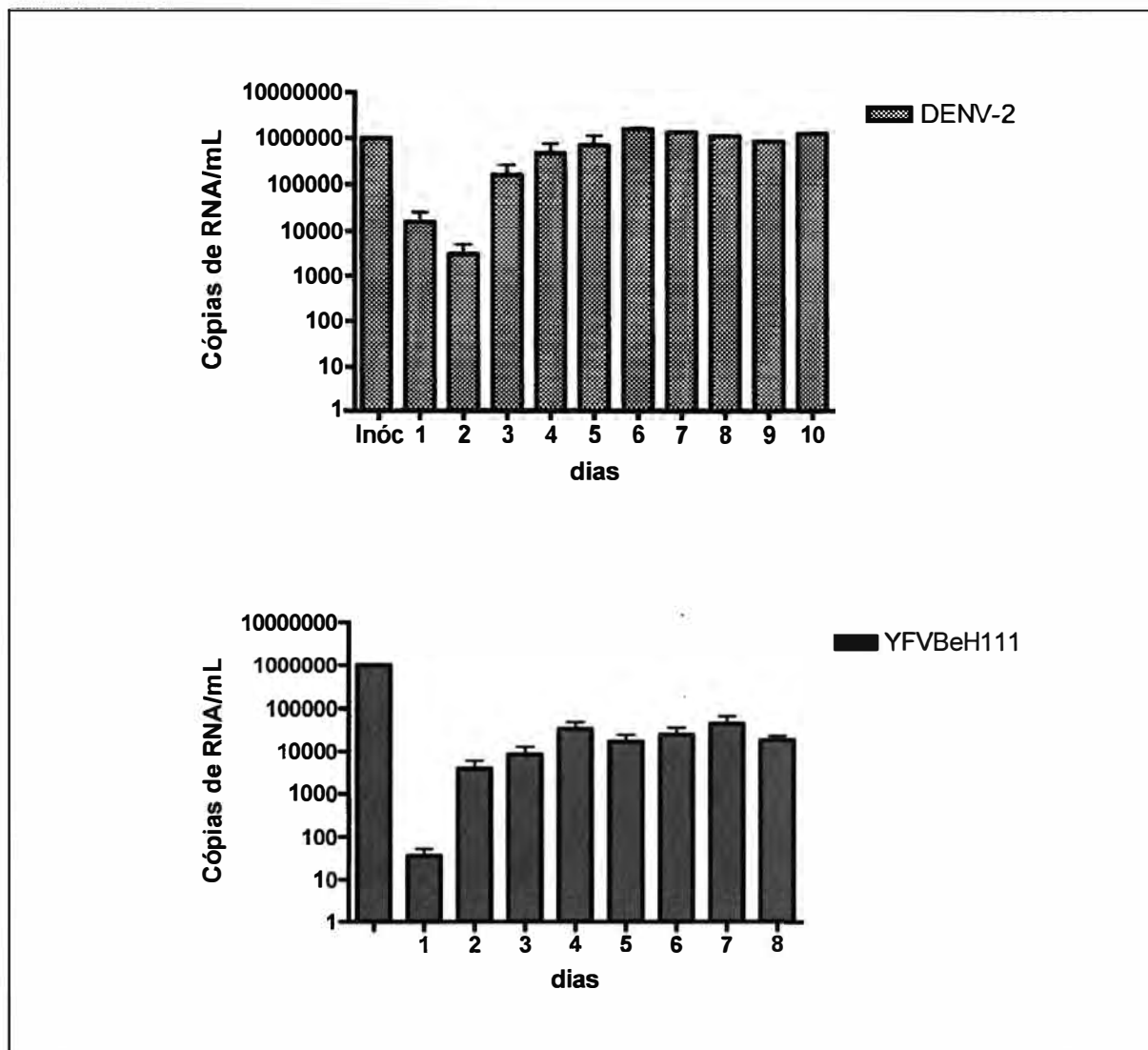


Figura 19: Perfil de replicação de VFABeH111 e DENV-2. Os gráficos representam a quantificação diária do RNA viral realizada por PCR em tempo real em sobrenadante coletado após 24 horas da infecção durante 10 dias para DENV-2 e 8 dias para VFABeH111. A primeira barra em ambos os gráficos representa o inóculo viral. Os gráficos apresentam dados representativos da média de N=3 experimentos independentes para DENV-2 e N=4 para VFABeH111.

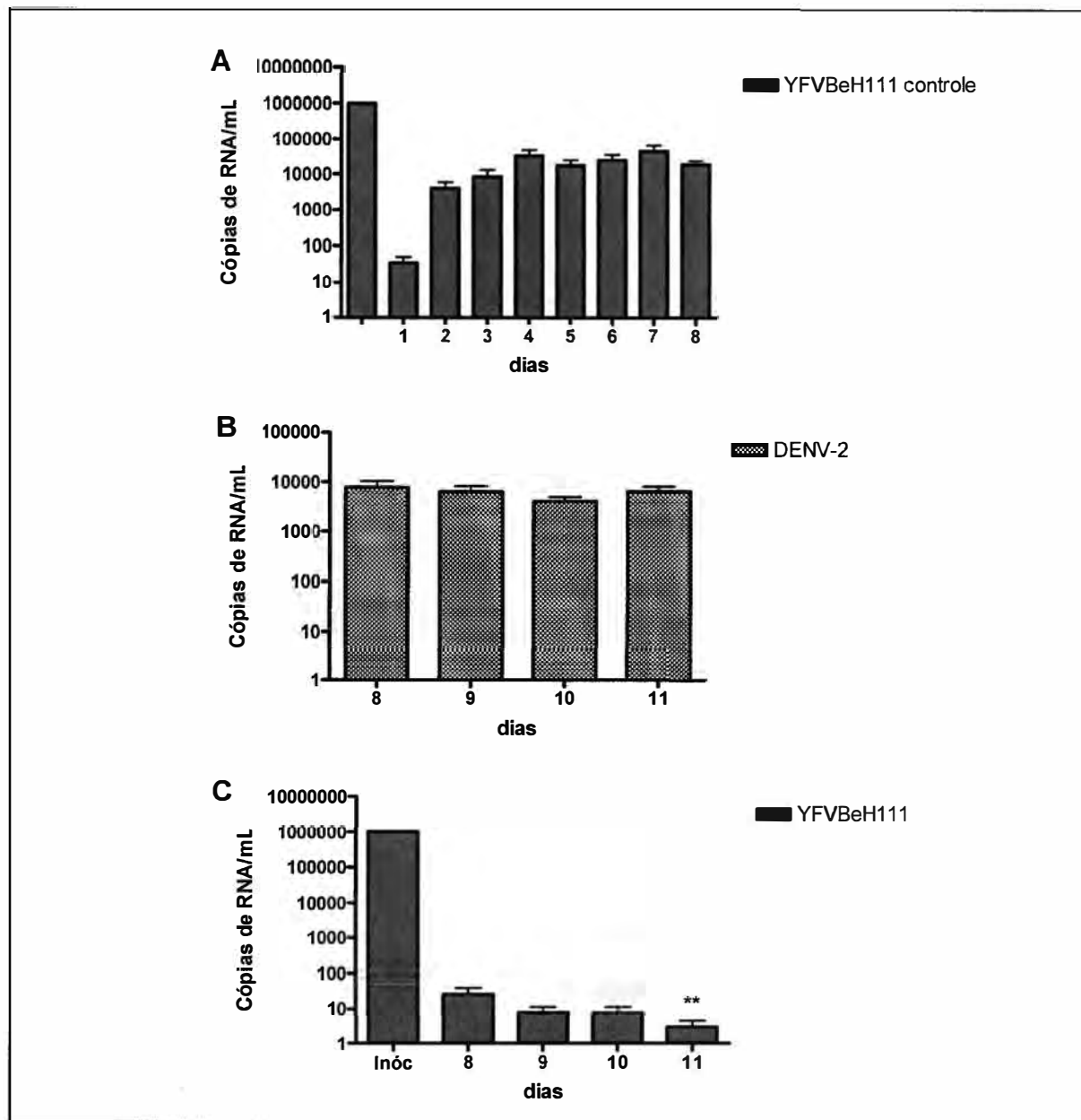


Figura 20: Interferência Viral DENV-2 /VFABeH111: As células C6/36 foram inicialmente infectadas com o vírus DENV-2 e 7 dias após confirmação da positividade da infecção, co-infectadas com VFABeH111. As coletas dos sobrenadantes foram realizadas durante 4 dias em intervalos de 24 horas. A multiplicidade da infecção (MOI) utilizada foi de 0,1. Em A está representado o gráfico controle com o perfil de replicação para o vírus VFABeH111. Em B e C estão representados os perfis de replicação de DENV-2 e VFABeH111, respectivamente, após a co-infecção com o vírus da febre amarela. Os gráficos representam dados representativos da média de N=3 experimentos independentes. ** $p < 0,001$ (Teste One-Way ANOVA).

4.7 – Ensaio de competição

4.7.1 Competição entre VFA17D e DENV-2

Uma outra investigação que se fez necessária após a obtenção dos resultados anteriormente descritos foi aquela envolvendo ensaios de competição entre os dois vírus estudados.

A competição entre VFA17D e DENV-2, como pode ser observado na figura 21, evidenciou uma maior eficiência de replicação de VFA17D, uma vez que nos primeiros dias da infecção observa-se uma quantidade de RNA viral próxima de 1.000 cópias. Nos dias subseqüentes a replicação viral variou entre 1.000 e 10.000 cópias de RNA, alcançando valores máximos de cerca de 10.000 cópias. Com relação ao DENV-2 a replicação viral nos dias iniciais ficou entre 10 e 100 cópias de RNA e os valores máximos alcançados nos dias subseqüentes foram de cerca de 1.000 cópias de RNA viral.

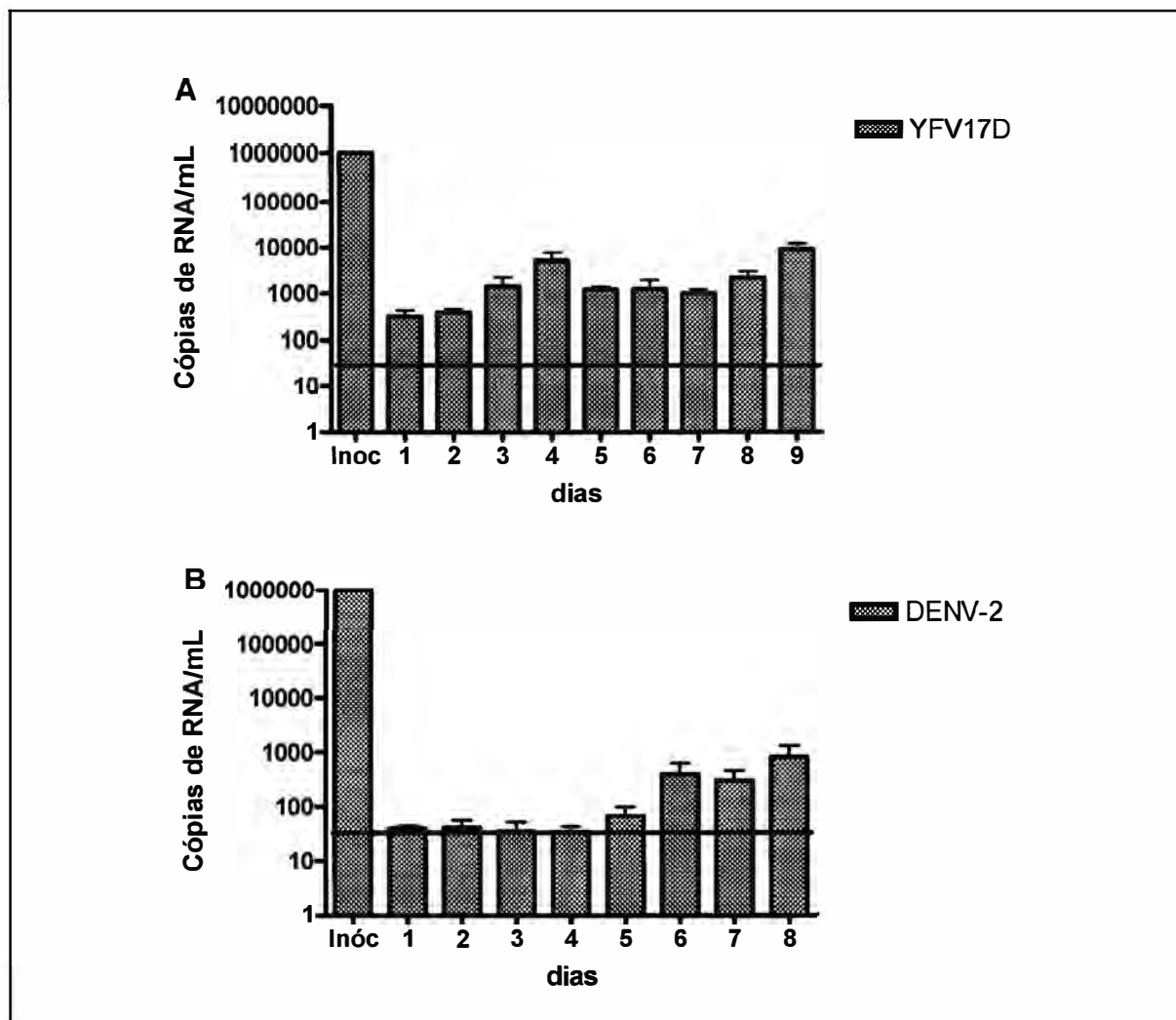


Figura 21: Ensaios de competição entre DENV-2 e VFA17D: As células C6/36 foram concomitantemente infectadas com DENV-2 e VFA17D. As coletas dos sobrenadantes foram iniciadas 24 horas após a infecção (p.i). A multiplicidade da infecção (MOI) utilizada foi de 0,1. Em A está representado o gráfico com o perfil de replicação para o vírus VFA17D. Em B está representado o perfil de replicação de DENV-2. Os gráficos representam dados representativos da média de N=3 experimentos independentes.

4.7.2 Competição entre DENV-2 e VFABeH111

Ensaio envolvendo a cepa selvagem de VFA também foram realizados. Os procedimentos foram os mesmos que aqueles envolvendo a cepa vacinal, assim como o processamento dos sobrenadantes coletados.

Os ensaios de competição entre VFABeH111 e DENV-2, de acordo com os gráficos da figura 22 novamente confirmaram uma maior eficiência de replicação da cepa selvagem de VFA do que DENV-2, porém somente no início da infecção. Nos primeiros dias da infecção observa-se uma quantidade de RNA de VFABeH111 próxima a 10.000 cópias contra cerca de 100 a 1000 cópias de RNA de DENV-2. Porém, a partir do 6^o dia a replicação de ambos vírus alcançaram patamares semelhantes, ficando em torno de 10.000 cópias de RNA.

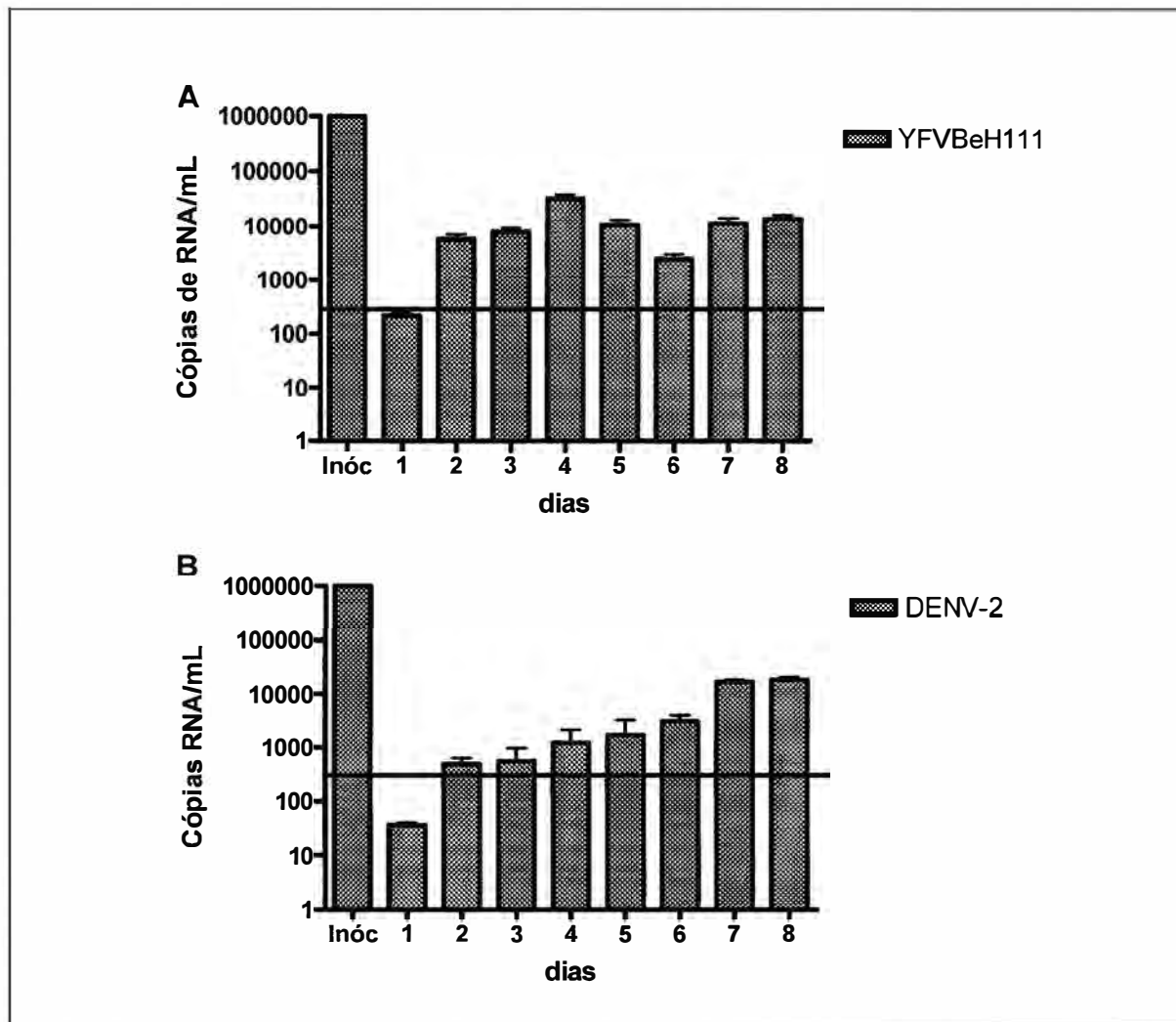


Figura 22: Ensaio de competição entre DENV-2 e VFABeH111. As coletas dos sobrenadantes foram realizadas 24 horas após a infecção (p.i). A multiplicidade da infecção (MOI) utilizada foi de 0,1. Em A está representado o gráfico com o perfil de replicação para o vírus VFABeH111. Em B está representado o perfil de replicação de DENV-2. Os gráficos representam dados representativos da média de N=2 experimentos independentes.

4.8 – Ensaio de Interferência viral em células de mamíferos: linhagem U937

Finalmente, para averiguar se o evento de interferência viral poderia ser observado em outros tipos celulares e não somente em células de mosquitos, realizamos a investigação em células derivadas de leucemia mielóide humana, denominada U937. Os ensaios foram realizados da mesma maneira que em células de mosquito C6/36.

Os resultados demonstram uma maior permissividade das células à infecção por VFA17D do que por DENV-2, conforme observação dos níveis de RNAs virais alcançados nos experimentos controle (Figura 23). A figura 23 mostra que após a infecção com DENV-2, os níveis de replicação ficam em torno de 1.000 cópias de RNA/mL. A infecção por VFA17D, após 48 horas alcançou 1.000 cópias de RNA/mL, porém os níveis de cópias virais aumentaram nos dias subsequentes, ficando em torno de 10.000 cópias de RNA/mL.

Nos experimentos de interferência para DENV-2 /VFA17D, ficou evidenciada uma pequena diminuição da replicação de VFA17D, quando a comparamos ao controle celular (figura 24). No entanto, essa constatação não foi observada nos ensaios para VFA17D /DENV-2, uma vez que a replicação de DENV-2 após co-infecção não se alterou significativamente quando a comparamos ao seu perfil de replicação nos experimentos controles (figura 25).

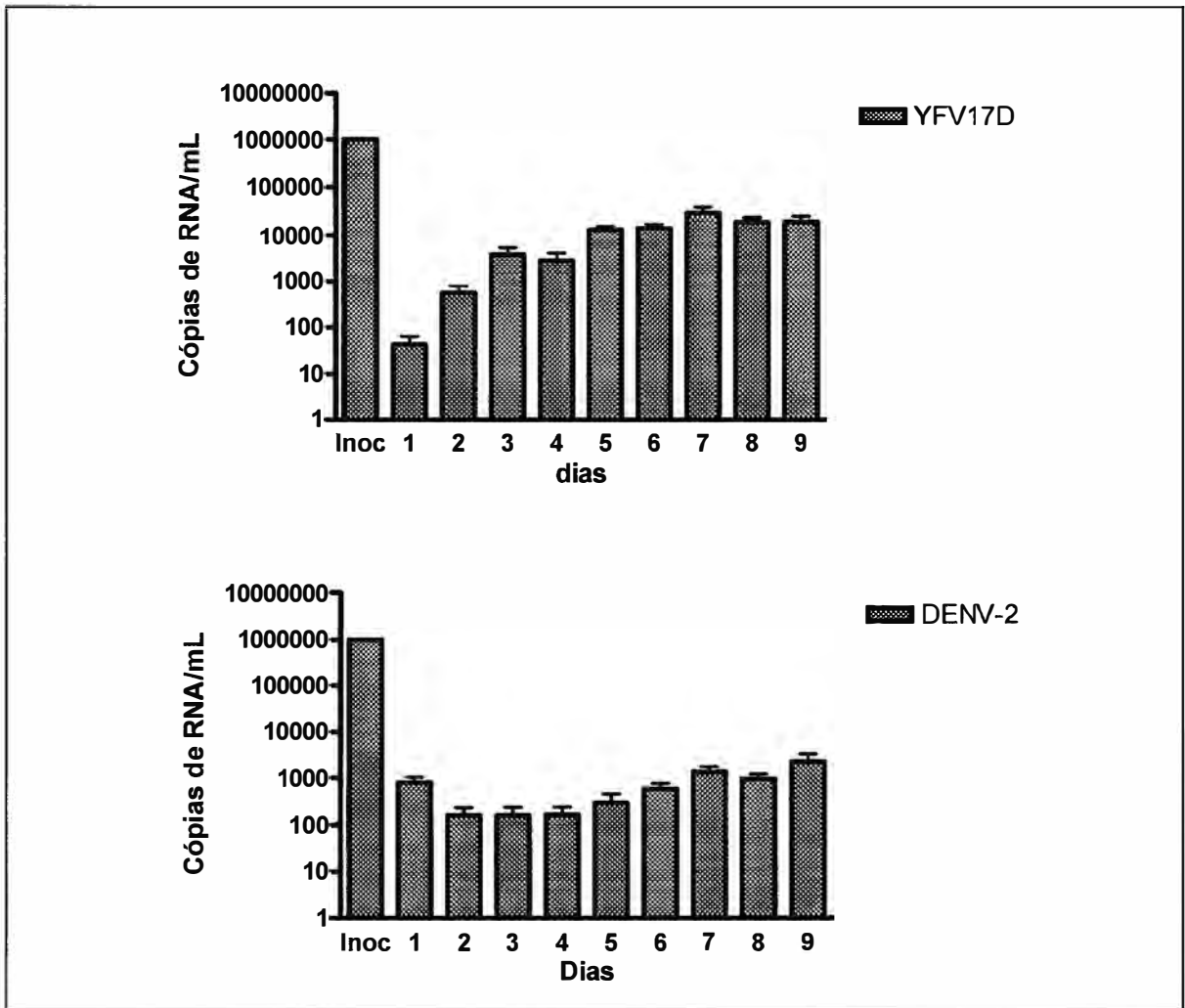


Figura 23: Perfil de replicação de YFV17D e DENV-2 em U937. Os gráficos representam a quantificação diária do RNA viral realizado por PCR em tempo real em sobrenadante coletado após 24 horas da infecção em células U937 durante 9 dias para ambos os vírus. A primeira barra em ambos os gráficos representa o inóculo viral. Os gráficos apresentam dados representativos da média de N=2 experimentos independentes.

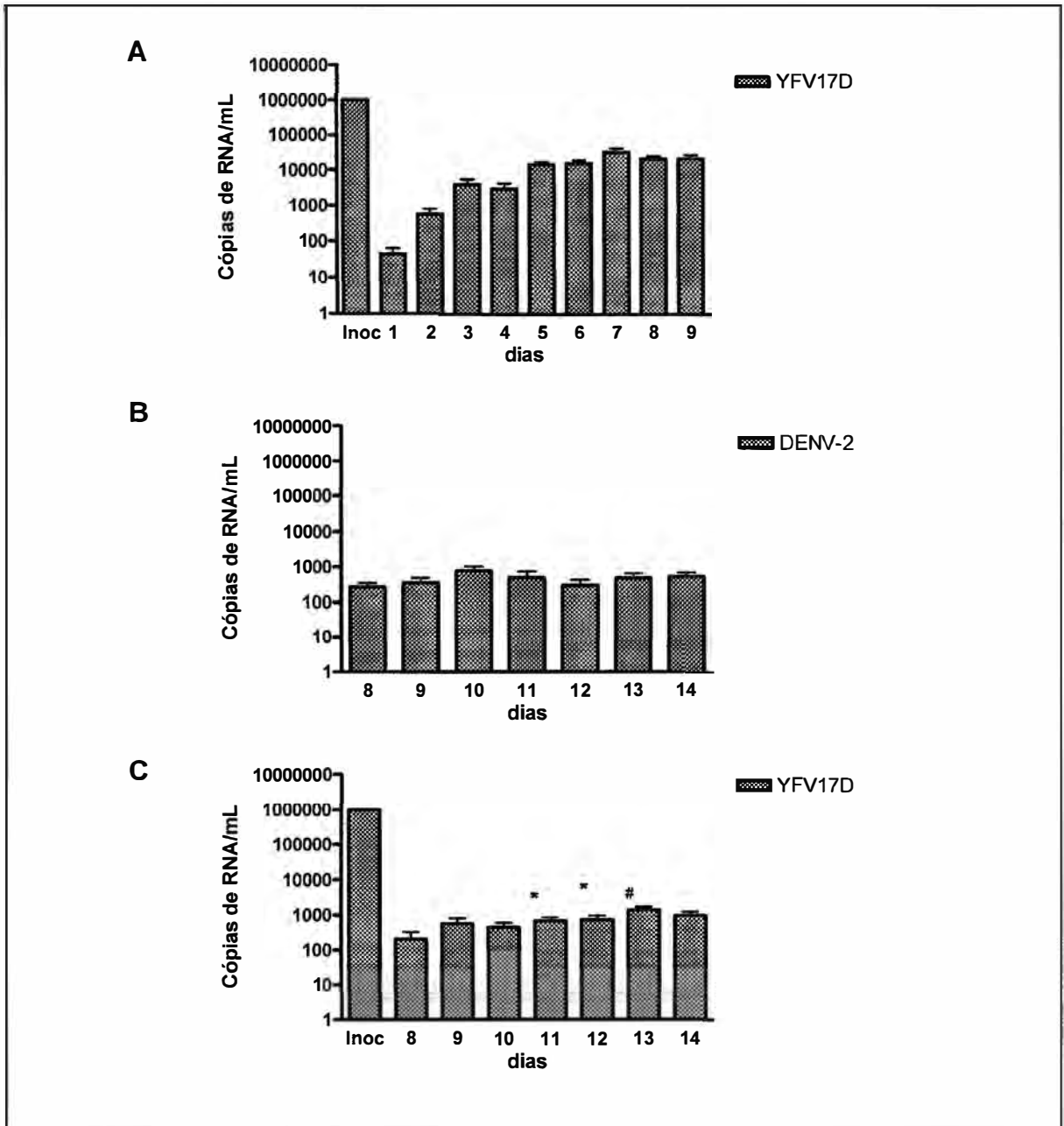


Figura 24: Interferência viral DENV-2 /VFA17D em células U937: As células U937 foram inicialmente infectadas com o vírus DENV-2 e 7 dias após confirmação da positividade da infecção, co-infectadas com VFA17D. As coletas dos sobrenadantes foram realizadas 24 horas após a infecção (p.i). A multiplicidade da infecção (MOI) utilizada foi de 0,1. Em A está representado o gráfico controle com o perfil de replicação para o vírus VFA17D. Em B e C estão representados os perfis de replicação de DENV-2 e VFA17D, respectivamente, após a co-infecção com o vírus da febre amarela. Os gráficos representam dados representativos da média de N=2 experimentos independentes. * $p < 0,05$ vs controle (A), # $p < 0,001$ vs controle (A) (Teste One-Way ANOVA).

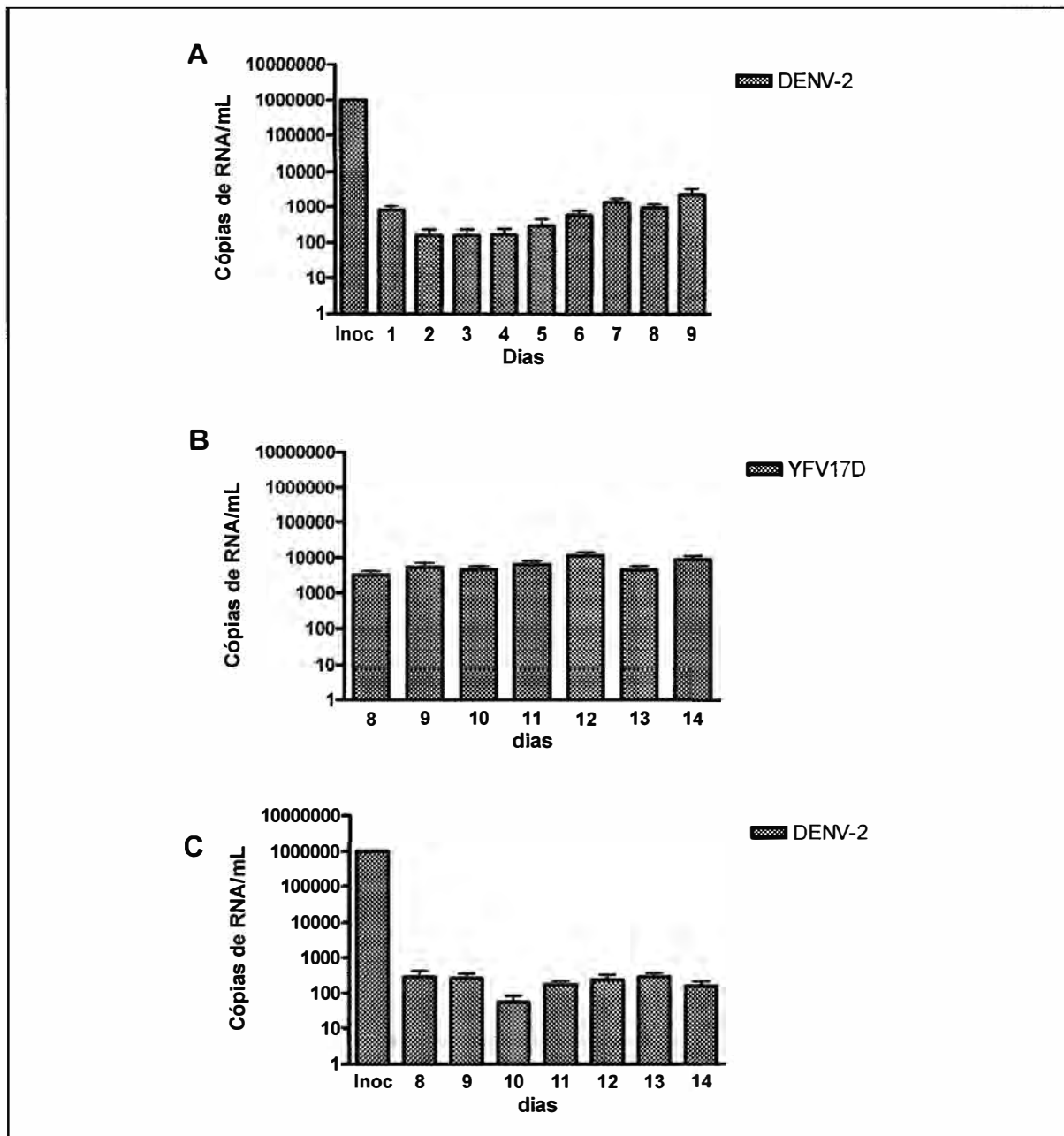


Figura 25: Interferência Viral VFA17D /DENV-2 em células U937: As células U937 foram inicialmente infectadas com o vírus VFA17d e 7 dias após confirmação da positividade da infecção, co-infectadas com DENV-2. As coletas foram realizadas 24 horas após a infecção (p.i.). A multiplicidade da infecção (MOI) utilizada foi de 0,1. Em A está representado o gráfico controle com o perfil de replicação para o vírus DENV-2. Em B e C estão representados os perfis de replicação de VFA17D e DENV-2, respectivamente, após a co-infecção com o vírus da febre amarela. Os gráficos representam dados representativos da média de N=3 experimentos independentes. # $p < 0,05$ (Teste One-Way ANOVA).

V – DISCUSSÃO

O vírus dengue causa atualmente a doença viral transmitida por mosquitos mais importante do mundo, sendo encontrada em mais de 100 países, com aproximadamente 50 a 100 milhões de indivíduos infectados anualmente (Guzman & Kouri, 2003; Malavige *et al.*, 2004; Halstead, 2007). No Brasil, a dengue representa a arbovirose emergente mais importante da atualidade, com grandes incrementos de casos a cada ano (Figueiredo, 2007). Com relação ao vírus da febre amarela, apesar da doença se manter endêmica nas florestas de áreas tropicais das Américas Central e do Sul e África, o vírus causa periodicamente surtos isolados ou epidemias de maior ou menor impacto para a saúde pública (Vasconcelos, 2003). No entanto, observa-se uma acentuada ressurgência da forma silvestre da doença desde o início da década de 1980 em países da América do Sul, incluindo o Brasil (Vasconcelos *et al.*, 2001; Vasconcelos, 2003), o que alerta para a possibilidade de reurbanização da doença. Diversas condições epidemiológicas existentes no país favorecem essa possibilidade, como por exemplo, a presença do vírus, de indivíduos susceptíveis, e do vetor da doença *Aedes aegypti* (Prata, 2000).

No entanto, o perfil epidemiológico do Brasil se mostra muito semelhante ao de países da Ásia, onde todos os pré-requisitos necessários para se vivenciar uma epidemia de febre amarela urbana são encontrados e, no entanto, não existem evidências de sua ocorrência.

Várias hipóteses têm sido elaboradas e estudadas para se explicar tal fenômeno na Ásia, tais como uma possível menor competência da cepa asiática do *Ae. aegypti* em relação à cepa americana para a transmissão do VFA e a possibilidade da presença de uma imunidade cruzada fornecida por exposições prévias ao vírus dengue e a outros *Flavivirus* presentes na região (Barret & Monath,

2003; Barret & Higgs, 2007). No entanto, até o momento nenhuma delas, isoladamente, conseguiu explicar tal fenômeno.

No Brasil, tais hipóteses não explicam de maneira eficiente a ausência da reurbanização da febre amarela no país. A hipótese de imunidade cruzada com o vírus da dengue não explicaria tal fato, uma vez que este tipo de imunidade entre os sorotipos só se verifica temporariamente. Outra hipótese, baseada em evidências experimentais, propõe que o mosquito *Aedes aegypti* de diferentes áreas geográficas tenha uma susceptibilidade oral variável quanto à transmissão do VFA (Beaty & Kloter, 1979; Gubler, 2002). Entretanto, no Brasil existem evidências demonstrando que este mosquito é capaz de transmitir o VFA, como relatado por Lourenço-de-Oliveira et al., 2004. Em um estudo recente, este grupo analisou a susceptibilidade oral do *Ae. aegypti* à infecção ao DENV e VFA separadamente. Foram coletadas 23 amostras em 13 estados brasileiros, verificando que a taxa de infecção tanto para o DENV quanto para VFA era elevada e heterogênea e as amostras vetoriais coletadas nas áreas de transição e endêmica eram altamente susceptíveis ao VFA (Lourenço-de-Oliveira et al., 2004). Porém, um fato que contribui de forma eficiente e inquestionável para a não reurbanização da febre amarela, se refere à disponibilidade da vacina altamente imungênica contra febre amarela. Além disso, a cobertura vacinal, recomendada para crianças a partir de 9 meses, para residentes ou visitantes de áreas endêmicas, áreas de transição e áreas de risco potencial constitui uma importante ferramenta para esse controle da expansão da doença para as áreas urbanas (Ministério da saúde, 2008). No entanto, o *Ae. aegypti* encontra-se distribuído nas mais diversas áreas do país, inclusive em áreas de baixa cobertura vacinal, por isso, outras investigações pertinentes à

ausência da reurbanização se fazem necessárias a fim de somar com aquelas relacionadas à capacidade vetorial..

Em nosso estudo, investigamos *in vitro* a hipótese de ocorrência de um fenômeno conhecido como interferência viral; uma situação em que a infecção por um determinado vírus poderia impedir uma segunda infecção das mesmas células por um vírus diferente. Dessa forma, hipotetizamos que mosquitos persistentemente infectados por um dos vírus não seriam capazes de ser infectados por outro tipo viral.

Utilizando ensaios de interferência estudamos a influência quanto à capacidade de infecção e replicação de um vírus sobre outro em uma mesma cultura de células de *Aedes albopictus*. Tais parâmetros foram analisados utilizando ensaios de imunofluorescência indireta e reações de PCR em tempo real. Essa última técnica mostrou-se bastante sensível e específica, o que nos permitiu quantificar a replicação de cada um dos vírus utilizando o sobrenadante da cultura celular e, desta forma, acompanhar as dinâmicas de infecção e replicação dos vírus dengue e febre amarela.

Uma descrição clássica do fenômeno de interferência viral a conceitua como uma inabilidade de um vírus para replicar em um uma célula ou organismo previamente infectados (Johnston *et al.*, 1974). A interferência homóloga, também conhecida como exclusão da superinfecção é a habilidade de uma infecção viral estabelecida interferir com uma infecção viral secundária com o mesmo vírus inicial, enquanto que infecções com vírus não relacionados (heterólogos) frequentemente não são afetadas. Esse é um fenômeno que, embora estudado a muito tempo, ainda não é muito bem entendido (Davey & Dalgarno, 1974; Karpf *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2005; Schaller *et al.*, 2007; Tscherne *et al.*, 2007). De acordo com a

definição acima, o sistema de estudo proposto por esse trabalho envolveu ensaios de interferência heteróloga.

Grande parte dos trabalhos descritos para ocorrência de interferência foram unânimes em mostrar a prevenção da superinfecção em sistemas de interferência homóloga, ou seja, de um mesmo vírus (incluindo ensaios com diferentes cepas). Esses estudos têm sido realizados com uma gama de diferentes vírus, como por exemplo, com o da hepatite C (Schaller *et al.*, 2007; Tscherne *et al.*, 2007), da diarreia viral bovina (Lee *et al.*, 2005), da estomatite vesicular (Simon *et al.*, 1990), Sendai (Shimazu *et al.*, 2008) e também em diversos *alphavirus* incluindo o vírus Sindbis (Condreay & Brown, 1979; Karpf *et al.*, 1997), o vírus Semliki Forest (Singh *et al.*, 1997), utilizando em diferentes tipos celulares. Grupos de pesquisa que trabalham com interferência homóloga envolvendo o paramixovírus Sendai, mostraram a presença de interferência homóloga entre diferentes isolados de vírus Sendai (SeV) em células BHK-21 (Yoshida *et al.*, 1982) e em pulmões de camundongos (Kiyotani *et al.*, 1990). Neste caso o fenômeno da interferência se mostrou como uma possível ferramenta terapêutica uma vez que a cepa denominada SeV-pi, com características atenuadas, mostrou grande potencial para suprimir a infecção por SeV selvagem.

Com relação a ensaios envolvendo interferência heteróloga, objeto de estudo desse trabalho, pesquisas envolvendo *alphavirus*, mostraram que, células infectadas com Sindbis vírus excluem a replicação tanto de *alphavirus* homólogos quanto heterólogos, mas não de vírus heterólogos de outra família, como foi o caso do flavivírus VFA (Karpf *et al.*, 1997). Embora a definição de interferência heteróloga descreva a ausência na alteração da replicação entre esses diferentes vírus. Tal fato já havia sido evidenciado em um trabalho, também com *alphavirus*, por Eaton e

colaboradores (1979). Neste trabalho, os autores mostraram que a infecção de células de *Ae albopictus* com um *alphavírus* levou à indução de um estado em que as células resistiram à superinfecção com *alphavírus* homólogos e heterólogos. No entanto, as células permaneceram sensíveis à superinfecção com um *bunyavirus*, o vírus *Snowshoe Hare*.

Esses resultados corroboram aqueles obtidos em nosso estudo, em que utilizamos dois vírus pertencentes à mesma família e gênero e observamos interferência viral entre eles, embora com diferentes magnitudes. Os dados obtidos nos ensaios de interferência viral com infecção prévia por DENV-2 *New Guinea C* seguida por VFA17D mostraram uma diminuição da replicação deste último vírus quando comparamos seu perfil de replicação controle. Entretanto, neste experimento, DENV-2 manteve sua taxa de replicação elevada (figura 14). O ensaio inverso também foi realizado com infecção prévia das células por VFA17D seguida por DENV-2 (VFA17D /DENV-2), onde também pudemos observar interferência viral, uma vez que houve uma diminuição da replicação de DENV-2 quando comparada ao controle, porém de uma maneira menos exacerbada do que aquela observada para VFA17D (figura 15).

Visando a investigar o fenômeno de interferência obtido após o ensaio do tipo DENV-2 /VFA17D, a mesma proposta anterior foi delineada em sistemas próprios para cultivo celular em lâmina e posterior reação de imunofluorescência indireta (câmaras LabTek). Os resultados das reações de imunofluorescência indireta utilizando co-marcação dos vírus DENV-2 e VFA17D por diferentes anticorpos secundários, confirmaram uma supremacia da infecção do vírus dengue em relação ao vírus da febre amarela (figura 17).

Com relação ao fenômeno da interferência viral envolvendo *Flavivirus*, poucos trabalhos foram realizados em culturas de células de mosquitos, e todos estes utilizaram somente o vírus dengue. Em um destes estudos, os resultados obtidos indicaram que culturas persistentemente infectadas com os diferentes sorotipos do vírus dengue resultam em obtenção de resistência à superinfecção com cepas selvagens dos quatro sorotipos (Igarashi, 1979). Em concordância com o trabalho anterior, Dittmar e colaboradores (1982) observaram que culturas de células oriundas de *Aedes albopictus* (clone C6/36) cronicamente infectadas com DEN1V apresentaram resistência à superinfecção com DEN3V. As análises foram realizadas utilizando reação de imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais contra antígenos tipo-específico de DEN3V. A resistência à superinfecção por DEN3V foi detectada após 20 horas da infecção com DEN1V, fato que corrobora com os nossos achados; embora, em nosso trabalho, não tenhamos objetivado testar o momento da ocorrência da interferência, e sim a presença ou não da interferência em células cronicamente infectadas com DENV-2 ou VFA vacinal ou selvagem. Em particular, salientamos que tivemos o cuidado de testar a interferência viral quando aproximadamente 100% das células já estavam infectadas por um dos vírus.

A análise morfológica celular diária, realizada para avaliar se as co-infecções resultam em alterações citopáticas, revelou alterações na morfologia celular após a co-infecção com VFA17D em células previamente infectadas com DENV-2 (figura 17). Essas alterações morfológicas não foram observadas na linhagem derivada de *Aedes albopictus*, C7-10 utilizada por Karpf e colaboradores para vírus Sindbis. Porém, é importante ressaltar que naquele estudo o tipo de experimento realizado envolveu a superinfecção com um vírus homólogo, e não heterólogo, como em nosso caso. Diferentemente de DENV-2 /VFA17D, essa alteração celular não foi

acompanhada nos ensaios com infecção prévia das células com VFA17D e posteriormente com DENV-2 (figura 16).

Uma vez que esses resultados poderiam estar associados à natureza atenuada da cepa vacinal do vírus da febre amarela, realizamos experimentos de interferência utilizando a cepa selvagem BeH111 do VFA. Os resultados continuaram mostrando uma diminuição da replicação do VFA selvagem frente a células cronicamente infectadas pelo DENV, descartando a suspeita inicial (figura 19).

Uma outra investigação que achamos pertinente realizar consistiu em examinar a interferência entre os dois tipos virais em culturas simultaneamente infectadas com ambos os vírus. Nesses ensaios de competição evidenciamos uma maior eficiência de replicação dos VFA, selvagem ou vacinal, comparado à do DENV-2 (figuras 21 e 22). Dados semelhantes foram previamente obtidos em ensaios de IFI onde em culturas simultaneamente infectadas com os vírus dengue 1 e 3, um dos dois tipos virais foi excluído (Dittmar *et al.*, 1982). Em resultados recentes de ensaios de competição envolvendo o paramixovírus SeV, cepa selvagem e aquela proveniente de cultura persistentemente infectada, também foi observada uma supressão da síntese protéica e multiplicação do vírus selvagem (Shimazu *et al.*, 2008).

Finalmente, em nosso projeto também foram realizados ensaios em células mononucleares U937 para se avaliar se o fenômeno de interferência também ocorreria. Porém, os resultados obtidos reproduziram apenas parcialmente aqueles obtidos em células de mosquitos, com uma ligeira interferência na replicação de VFA17D nos ensaios do tipo DENV-2 /VFA17D, porém não observada no ensaio VFA17D /DENV-2 (figuras 24 e 25). Em trabalhos anteriores envolvendo *alphavírus*,

foi observado o mesmo padrão de interferência homóloga (Karpf *et al.*, 1997). Porém nenhum trabalho relatou ainda a ocorrência de interferência viral em sistemas heterólogos.

Para alguns vírus, os mecanismos da interferência homóloga têm sido identificados em vários estágios no ciclo replicativo viral, como na entrada via receptor, na penetração do core e também nos passos da replicação (Lee *et al.*, 2005), mas para uma grande maioria esses eventos permanecem desconhecidos (Shimazu *et al.*, 2008), principalmente para aqueles pertencentes ao gênero *flavivirus*.

Este trabalho mostra a primeira evidência que existe um fenômeno de interferência entre os vírus dengue e febre amarela infectando células oriundas de mosquito. Futuramente pretendemos realizar investigações que permitam elucidar os mecanismos moleculares envolvidos em tal interferência.

O Brasil é um país com alta taxa de infestação por vetores responsáveis pela transmissão dos principais arbovírus de importância médica. Dessa forma, estudos envolvendo possíveis fenômenos de regulação e alteração da replicação desses vírus em vetores são pertinentes. Os dados apresentados nesse trabalho são de grande interesse epidemiológico para o nosso país e somam ao vasto estudo envolvendo vetores do VFA e DENV-2. A descoberta dos mecanismos moleculares responsáveis por tal interferência poderá fornecer importantes conhecimentos para o controle e prevenção de epidemias dessas doenças.

VI – CONCLUSÕES

Diante dos resultados mostrados previamente podemos concluir que:

- Nos ensaios DENV-2 /YFV17D observamos uma diminuição da replicação do YFV17D quando comparado ao controle positivo. Células derivadas de *Ae. albopictus* cronicamente infectadas com DENV-2 se apresentam menos permissivas à replicação do YFV17D.
- Nos ensaios YFV17D /DENV-2, também ocorre uma diminuição dos níveis de RNA viral de DENV-2 nos sobrenadantes coletados, porém de uma maneira menos acentuada do que aquela observada com YFV17D
- Nos ensaios envolvendo a cepa selvagem do vírus da febre amarela, os resultados confirmam a ocorrência de interferência quando as células são inicialmente infectadas com DENV-2 e, posteriormente, com YFVBeH111, com uma redução da replicação de YFVBeH111 comparado ao controle.
- A competição entre YFV17D e DENV-2, evidenciou uma maior eficiência de replicação de YFV17D.
- A competição entre YFVBeH111 e DENV-2 evidenciou uma maior eficiência de replicação da cepa selvagem de YFV do que DENV-2.
- Ensaios de interferência para DENV-2 /YFV17D em células U937 de interferência para DENV-2 /YFV17D. No entanto, essa constatação não foi observada nos ensaios para YFV17D /DENV-2, uma vez que a replicação de DENV-2 após co-infecção não se alterou significativamente quando a comparamos ao seu perfil de replicação nos experimentos controles.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barba-Spaeth, G., R. S. Longman, M. L. Albert e C. M. Rice. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. J Exp Med, v.202, n.9, Nov 7, p.1179-84. 2005.

Barnett, E. D. Yellow fever: epidemiology and prevention. Clin Infect Dis, v.44, n.6, Mar 15, p.850-6. 2007.

Barrett, A. D. Yellow fever vaccines. Biologicals, v.25, n.1, Mar, p.17-25. 1997.

Barrett, A. D. e S. Higgs. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. Annu Rev Entomol, v.52, p.209-29. 2007.

Barrett, A. D. e T. P. Monath. Epidemiology and ecology of yellow fever virus. Adv Virus Res, v.61, p.291-315. 2003.

Beaty, B. J. e K. O. Kloter. Nonspecific immunofluorescent staining of mosquito salivary gland. J Med Entomol, v.15, n.5-6, Sep 4, p.571-2. 1979.

Bratt, M. A. e H. Rubin. Specific interference among strains of Newcastle disease virus. 3. Mechanisms of interference. Virology, v.35, n.3, Jul, p.395-407. 1968a.

Bratt, M. A. e H. Rubin. Specific interference among strains of Newcastle disease virus. II. Comparison of interference by active and inactive virus. Virology, v.35, n.3, Jul, p.381-94. 1968b.

Camara, F. P., R. L. Theophilo, G. T. Dos Santos, S. R. Pereira, D. C. Camara e R. R. De Matos. [Regional and dynamics characteristics of dengue in Brazil: a retrospective study]. Rev Soc Bras Med Trop, v.40, n.2, Mar-Apr, p.192-6. 2007.

Chambers, T. J., C. S. Hahn, R. Galler e C. M. Rice. Flavivirus genome organization, expression, and replication. Annu Rev Microbiol, v.44, p.649-88. 1990.

Chen, Y., T. Maguire, R. E. Hileman, J. R. Fromm, J. D. Esko, R. J. Linhardt e R. M. Marks. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. Nat Med, v.3, n.8, Aug, p.866-71. 1997.

Davey, M. W. e L. Dalgarno. Semliki Forest virus replication in cultured *Aedes albopictus* cells: studies on the establishment of persistence. J Gen Virol, v.24, n.3, Sep, p.453-63. 1974.

Dittmar, D., A. Castro e H. Haines. Demonstration of interference between dengue virus types in cultured mosquito cells using monoclonal antibody probes. J Gen Virol, v.59, n.Pt 2, Apr, p.273-82. 1982.

Eaton, B. T. Heterologous interference in *Aedes albopictus* cells infected with alphaviruses. J Virol, v.30, n.1, Apr, p.45-55. 1979.

Figueiredo, L. T. The Brazilian flaviviruses. Microbes Infect, v.2, n.13, Nov, p.1643-9. 2000.

Figueiredo, L. T. Emergent arboviruses in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop, v.40, n.2, Mar-Apr, p.224-9. 2007.

Gould, E. A. e T. Solomon. Pathogenic flaviviruses. Lancet, v.371, n.9611, Feb 9, p.500-9. 2008.

Gubler, D. J. Human behaviour and cultural context in disease control. Trop Med Int Health, v.2, n.11, Nov, p.A1-2. 1997.

Gubler, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clin Microbiol Rev, v.11, n.3, Jul, p.480-96. 1998.

Gubler, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. Arch Med Res, v.33, n.4, Jul-Aug, p.330-42. 2002.

Gubler, D. J., G. Kuno, G. E. Sather, M. Velez e A. Oliver. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. Am J Trop Med Hyg, v.33, n.1, Jan, p.158-65. 1984.

Gubler, D. J. K., G.; Markoff, L. *Flaviviruses*. In: D. M. Knipe (Ed.). Fields in Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.01, 2007. *Flaviviruses*, p.1153-1185

Guzman, M. G. e G. Kouri. Dengue: an update. Lancet Infect Dis, v.2, n.1, Jan, p.33-42. 2002.

Guzman, M. G. e G. Kouri. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. J Clin Virol, v.27, n.1, May, p.1-13. 2003.

Halstead, S. B. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. Rev Infect Dis, v.11 Suppl 4, May-Jun, p.S830-9. 1989.

Halstead, S. B. Dengue. Lancet, v.370, n.9599, Nov 10, p.1644-52. 2007.

Henchal, E. A., J. M. Mccown, D. S. Burke, M. C. Seguin e W. E. Brandt. Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions using monoclonal antibodies. Am J Trop Med Hyg, v.34, n.1, Jan, p.162-9. 1985.

Henchal, E. A. e J. R. Putnak. The dengue viruses. Clin Microbiol Rev, v.3, n.4, Oct, p.376-96. 1990.

Herbert, W. J. Application of Immunological Methods. Handbook of Experimental Immunology. D.M.Weir. Oxford. 3 1978.

Houng, H. S., R. Chung-Ming Chen, D. W. Vaughn e N. Kanesa-Thanan. Development of a fluorogenic RT-PCR system for quantitative identification of dengue virus serotypes 1-4 using conserved and serotype-specific 3' noncoding sequences. J Virol Methods, v.95, n.1-2, Jun, p.19-32. 2001.

Hoskins, M. A protective action of neurotropic against viscerotropic yellow fever virus in *Macacus rhesus*. Am J Trop Med, v.15, p. 675-680.

Igarashi, A. Characteristics of *Aedes albopictus* cells persistently infected with dengue viruses. Nature, v.280, n.5724, Aug 23, p.690-1. 1979.

Johnston, R. E., K. Wan e H. R. Bose. Homologous interference induced by Sindbis virus. J Virol, v.14, n.5, Nov, p.1076-82. 1974.

Karpf, A. R., E. Lenches, E. G. Strauss, J. H. Strauss e D. T. Brown. Superinfection exclusion of alphaviruses in three mosquito cell lines persistently infected with Sindbis virus. J Virol, v.71, n.9, Sep, p.7119-23. 1997.

Kiyotani, K., S. Takao, T. Sakaguchi e T. Yoshida. Immediate protection of mice from lethal wild-type Sendai virus (HVJ) infections by a temperature-sensitive mutant, HVJpi, possessing homologous interfering capacity. Virology, v.177, n.1, Jul, p.65-74. 1990.

Kroschewski, H., S. L. Allison, F. X. Heinz e C. W. Mandl. Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus. Virology, v.308, n.1, Mar 30, p.92-100. 2003.

Kuhn, R. J., W. Zhang, M. G. Rossmann, S. V. Pletnev, J. Cover, E. Lenches, C. T. Jones, S. Mukhopadhyay, P. R. Chipman, E. G. Strauss, T. S. Baker e J. H. Strauss. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. Cell, v.108, n.5, Mar 8, p.717-25. 2002.

Lee, Y. M., D. M. Tscherne, S. I. Yun, I. Frolov e C. M. Rice. Dual mechanisms of pestiviral superinfection exclusion at entry and RNA replication. J Virol, v.79, n.6, Mar, p.3231-42. 2005.

Lefevre, A., H. Contamin, T. Decelle, C. Fournier, J. Lang, V. Deubel e P. Marianneau. Host-cell interaction of attenuated and wild-type strains of yellow fever virus can be differentiated at early stages of hepatocyte infection. Microbes Infect, v.8, n.6, May, p.1530-8. 2006.

Lindenbach, B. D. T., H.; Rice, C.M. *Flaviviridae: The viruses and their replication*. In: D. M. Knipe (Ed.). Fields in Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.01, 2007. *Flaviviridae: The viruses and their replication*, p.1101-1113

Lourenco-De-Oliveira, R., M. Vazeille, A. M. Bispo De Filippis e A. B. Failloux. Oral susceptibility to yellow fever virus of *Aedes aegypti* from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.97, n.3, Apr, p.437-9. 2002.

Lourenco-De-Oliveira, R., M. Vazeille, A. M. De Filippis e A. B. Failloux. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.98, n.1, Jan, p.43-54. 2004.

Lozach, P. Y., L. Burleigh, I. Staropoli, E. Navarro-Sanchez, J. Harriague, J. L. Virelizier, F. A. Rey, P. Despres, F. Arenzana-Seisdedos e A. Amara. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. J Biol Chem, v.280, n.25, Jun 24, p.23698-708. 2005.

Mackenzie, J. S., D. J. Gubler e L. R. Petersen. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. Nat Med2004. S98-109 p.

Malavige, G. N., S. Fernando, D. J. Fernando e S. L. Seneviratne. Dengue viral infections. Postgrad Med J, v.80, n.948, Oct, p.588-601. 2004.

Monath, T. P. Yellow fever: an update. Lancet Infect Dis, v.1, n.1, Aug, p.11-20. 2001.

Monath, T. P. Dengue and yellow fever--challenges for the development and use of vaccines. N Engl J Med, v.357, n.22, Nov 29, p.2222-5. 2007.

Monath, T. P. Treatment of yellow fever. Antiviral Res, v.78, n.1, Apr, p.116-24. 2008.

Mukhopadhyay, S., R. J. Kuhn e M. G. Rossmann. A structural perspective of the flavivirus life cycle. Nat Rev Microbiol, v.3, n.1, Jan, p.13-22. 2005.

Nogueira, R. M., M. P. Miagostovich, A. M. De Filippis, M. A. Pereira e H. G. Schatzmayr. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.96, n.7, Oct, p.925-6. 2001.

Nogueira, R. M., M. P. Miagostovich, E. Lampe e H. G. Schatzmayr. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.85, n.2, Apr-Jun, p.253. 1990.

Osanai, C. H., A. P. Travassos Da Rosa, A. T. Tang, R. S. Do Amaral, A. D. Passos e P. L. Taui. [Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.25, n.1, Jan-Feb, p.53-4. 1983.

Pletnev, A. G., M. Bray e C. J. Lai. Chimeric tick-borne encephalitis and dengue type 4 viruses: effects of mutations on neurovirulence in mice. J Virol, v.67, n.8, Aug, p.4956-63. 1993.

Prata, A. Yellow fever. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.95 Suppl 1, p.183-7. 2000.

Reinhardt, B., R. Jaspert, M. Niedrig, C. Kostner e J. L'age-Stehr. Development of viremia and humoral and cellular parameters of immune activation after vaccination with yellow fever virus strain 17D: a model of human flavivirus infection. J Med Virol, v.56, n.2, Oct, p.159-67. 1998.

Rey, F. A. Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.12, Jun 10, p.6899-901. 2003.

Rice, C. M., E. M. Lenches, S. R. Eddy, S. J. Shin, R. L. Sheets e J. H. Strauss. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. Science, v.229, n.4715, Aug 23, p.726-33. 1985.

Rothman, A. L. e F. A. Ennis. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. Virology, v.257, n.1, Apr 25, p.1-6. 1999.

Schaller, T., N. Appel, G. Koutsoudakis, S. Kallis, V. Lohmann, T. Pietschmann e R. Bartenschlager. Analysis of hepatitis C virus superinfection exclusion by using novel fluorochrome gene-tagged viral genomes. J Virol, v.81, n.9, May, p.4591-603. 2007.

Schatzmayr, H. G., R. M. Nogueira e A. P. Travassos Da Rosa. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.81, n.2, Apr-Jun, p.245-6. 1986.

Schlesinger, J. J., M. Foltzer e S. Chapman. The Fc portion of antibody to yellow fever virus NS1 is a determinant of protection against YF encephalitis in mice. Virology, v.192, n.1, Jan, p.132-41. 1993.

Shimazu, Y., S. I. Takao, T. Irie, K. Kiyotani, T. Yoshida e T. Sakaguchi. Contribution of the leader sequence to homologous viral interference among Sendai virus strains. Virology, v.372, n.1, Mar 1, p.64-71. 2008.

Simon, K. O., J. J. Cardamone, Jr., P. A. Whitaker-Dowling, J. S. Youngner e C. C. Widnell. Cellular mechanisms in the superinfection exclusion of vesicular stomatitis virus. Virology, v.177, n.1, Jul, p.375-9. 1990.

Singh, I. R., M. Suomalainen, S. Varadarajan, H. Garoff e A. Helenius. Multiple mechanisms for the inhibition of entry and uncoating of superinfecting Semliki Forest virus. Virology, v.231, n.1, Apr 28, p.59-71. 1997.

Steck, F. T. e H. Rubin. The mechanism of interference between an avian leukosis virus and Rous sarcoma virus. I. Establishment of interference. Virology, v.29, n.4, Aug, p.628-41. 1966a.

Steck, F. T. e H. Rubin. The mechanism of interference between an avian leukosis virus and Rous sarcoma virus. II. Early steps of infection by RSV of cells under conditions of interference. Virology, v.29, n.4, Aug, p.642-53. 1966b.

Stollar, V. e T. E. Shenk. Homologous viral interference in *Aedes albopictus* cultures chronically infected with Sindbis virus. J Virol, v.11, n.4, Apr, p.592-5. 1973.

Svitkin, Y. V., V. N. Lyapustin, V. A. Lashkevich e V. I. Agol. A comparative study on translation of flavivirus and picornavirus RNAs in vitro: apparently different modes of protein synthesis. FEBS Lett, v.96, n.1, Dec 1, p.211-5. 1978.

Tesh, R. B. A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell cultures. Am J Trop Med Hyg, v.28, n.6, Nov, p.1053-9. 1979.

Tesh, R. B., A. P. Travassos Da Rosa, H. Guzman, T. P. Araujo e S. Y. Xiao. Immunization with heterologous flaviviruses protective against fatal West Nile encephalitis. Emerg Infect Dis, v.8, n.3, Mar, p.245-51. 2002.

Theiler, M. e C. R. Anderson. The relative resistance of dengue-immune monkeys to yellow fever virus. Am J Trop Med Hyg, v.24, n.1, Jan, p.115-7. 1975.

Theiler, M. e H. H. Smith. The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. J. Exp. Med. 65, 787-800 (1937). Rev Med Virol, v.10, n.1, Jan-Feb, p.6-16; discussion 3-5. 2000.

Tscherne, D. M., M. J. Evans, T. Von Hahn, C. T. Jones, Z. Stamatakis, J. A. Mckeating, B. D. Lindenbach e C. M. Rice. Superinfection exclusion in cells infected with hepatitis C virus. J Virol, v.81, n.8, Apr, p.3693-703. 2007.

Vasconcelos, P. F. [Yellow Fever]. Rev Soc Bras Med Trop, v.36, n.2, Mar-Apr, p.275-93. 2003.

Vasconcelos, P. F., D. B. De Menezes, L. P. Melo, E. T. Pessoa, S. G. Rodrigues, E. S. Da Rosa, M. J. Timbo, I. C. Coelho, F. Montenegro, J. F. Da Rosa e Et Al. A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceara State, Brazil, 1994. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.37, n.3, May-Jun, p.253-5. 1995.

Vasconcelos, P. F., E. J. Luna, R. Galler, L. J. Silva, T. L. Coimbra, V. L. Barros, T. P. Monath, S. G. Rodrigues, C. Laval, Z. G. Costa, M. F. Vilela, C. L. Santos, P. M. Papaiordanou, V. A. Alves, L. D. Andrade, H. K. Sato, E. S. Rosa, G. B. Froguas, E. Lacava, L. M. Almeida, A. C. Cruz, I. M. Rocco, R. T. Santos e O. F. Oliva. Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases. Lancet, v.358, n.9276, Jul 14, p.91-7. 2001.

Whitehead, S. S., J. E. Blaney, A. P. Durbin e B. R. Murphy. Prospects for a dengue virus vaccine. Nat Rev Microbiol, v.5, n.7, Jul, p.518-28. 2007.

Wilkins, L. W., Ed. Flaviviridae: The viruses and their replication. Fields Virology. Philadelphia, v.01, Fields Virology, 5th ed. 2007.

Yoshida, T., M. Hamaguchi, H. Naruse e Y. Nagai. Persistent infection by a temperature-sensitive mutant isolated from a Sendai virus (HVJ) carrier culture: its initiation and maintenance without aid of defective interfering particles. Virology, v.120, n.2, Jul 30, p.329-39. 1982.

Zanotto, P. M., E. A. Gould, G. F. Gao, P. H. Harvey e E. C. Holmes. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.2, Jan 23, p.548-53. 1996.

VIII – ANEXO

Interference between dengue and yellow fever viruses

Emiliana P. Abrão¹ and Benedito A. L. Fonseca^{2*}

1 - Department of Biochemistry and Immunology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

2 - Department of Clinical Medicine, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

*Corresponding author: Benedito Antônio Lopes da Fonseca MD, PhD –
Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo.

Av: Bandeirantes, 3900. Ribeirão Preto – São Paulo

Phone: +55 16 36023249

Fax: +55 16 36330036/3633-6695

*E-mail address: baldfons@fmrp.usp.br

Abstract

Dengue is the most important disease caused by an arbovirus in the world. Another arbovirus infection of great importance to public health is yellow fever, an acute infectious disease prevalent in the Americas and Africa. Both, the urban and sylvatic modalities are caused by the yellow fever virus, an arbovirus transmitted by mosquitoes, including *Aedes aegypti*, the same vector responsible for dengue transmission. Historically, dengue epidemics occur in Asia but, in the same area, there has been no report on yellow fever occurrence. Among the hypotheses trying to explain this finding, it has been postulated that cross immunity and decreased vector capacity of *Aedes aegypti* in relation to the yellow fever virus could be responsible for this phenomena. None of these hypotheses have been proved so far. In this study, performing immunofluorescence and replication profiles assays in single and co-infected cell cultures, we investigated the hypothesis of occurrence of viral interference using C6/36 cells, an *Aedes albopictus* derived cell line. Our results evidence that there is a specific interference pattern between both viruses. When cells were firstly infected with dengue virus and subsequently with yellow fever virus, a strong impairment on the replication profile of yellow fever virus was observed, but not conversely.

Keywords

Dengue; yellow fever; flavivirus; superinfection, blockade

1 - Introduction

Yellow fever virus (VFA) is a prototype of the family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus* (Gubler, 2002). The *Flaviviridae* family is comprised of approximately 73 virus, 40 of them causing diseases in humans, and most of them are transmitted by arthropods, so named arbovirus from “arthropod born virus” (Monath et al., 2001). The viruses belonging to this family are small and spherical viruses with around 50nm diameter. The viral envelope consists of a bilayer derived from the infected cell and two viral anchored proteins, named E and M. The genome is a positive-sense single-stranded RNA and contains a single open-reading frame of ~11,000 nucleotides encoding structural (S) and nonstructural (NS) proteins flanked by short non-coding regions with a 5' cap structure and a non-polyadenylated 3' end. The VFA is a single serotype and five genotypes can be distinguished (Monath, 2001; Bae, 2003; Gubler, 2007).

The VFA is a zoonotic infection and is transmitted through two major cycles: a urban cycle and a sylvatic one (Gubler, 2002; Monath, 2001). The urban cycle is relatively simple, where the virus is transmitted between humans by *Aedes aegypti*, the same vector as dengue fever, a highly domestic mosquito (Monath, 2001; Vasconcelos, 2003). The sylvatic cycle is more complex and occurs in Africa and American forests, where the virus is maintained in wild-nature in a cycle involving non-human primates, such as monkeys for instance, and mosquitoes of the genus *Haemagogus spp*, in the case of Americas (Monath, 2001).

Historically the VFA was introduced with its vector *Aedes aegypti* in Americas in slave trading ships arriving from Africa during the colonial period (Codeço, 2004). In Brazil, the virus caused great outbreaks from the 17th to 19th centuries (Figueiredo, 2000). The discovery of *Aedes aegypti* as being the vector responsible

for the transmission of the VFA occurred in 1900. In 1903, as an aim to control the VFA epidemics, a governmental campaign to eradicate this mosquito started in Brazil. To that date, the complete eradication of this vector, together with intense vaccination against the virus led to an effective control of urban VFA epidemics, as well as dengue epidemics (for a review see Gubler, 2002). Therefore, the last great urban VFA epidemics in Brazil occurred in 1929 in Rio de Janeiro and the last reported case of urban VFA was reported in 1942 (Figueiredo, 2000; Vasconcelos, 2003; Figueiredo, 2007). Since that period, in Brazil there were only reports involving the sylvatic VFA.

Nevertheless, in the last 50 years there was a dramatic growth of urban centers in the tropical Americas, mostly in a chaotic way. This phenomenon contributed to the re-infestation of the main urban vector, *Aedes aegypti* (Gubler, 2002; Codeço, 2004). Therefore, since 2001 increasing reports of the sylvatic form of the disease have been described to occur in Brazil (Vasconcelos et al., 2001; Vasconcelos, 2003). Outbreaks occurred in Pará and Maranhão States in 1980, Goiás State in 1999 and 2000, and also in Minas Gerais State in 2001, 2004 and 2005 (Vasconcelos et al., 2001; Figueiredo, 2007). It seems that there is a circulation of the virus in the cities, at the same place of its competent vector.

Based on that premises, there is a great concern about the reurbanization of VFA in Brazil due to the high prevalence of the urban vector, in and the increasing presence of the sylvatic VFA in endemic regions, and the susceptible status of non-endemic urban populations (Vasconcelos, 2002; Codeço, 2004).

On the other hand, some epidemiological studies have demonstrated the absence of urban yellow fever in many regions, despite of the presence of *Aedes* mosquitoes; such as in Asia for instance, where VFA has never occurred (Barnett,

2007). The reasons for this phenomenon are not well understood, and some hypotheses have been postulated, such as cross immunity or decreased vectorial capacity of *Aedes* mosquitoes to VFA. So far none of these hypotheses have been validated.

In Brazil, we observe a similar pattern as that described in Asia. Based on that we proposed a new hypothesis, where *Aedes* mosquitoes infected with DENV2 would become severely impaired for a second infection by VFA. To address this issue we have performed cytomorphological and molecular assays in cells derived from *A. albopictus* which were exposed to single or simultaneous infection procedures to VFA and DENV2. This study reports that mosquito's cells that were previously infected with VFA are severely impaired to a subsequent infection by DENV2.

2. Materials and methods

2.1 - Viruses strains

DENV2, New Guinea C strain, and yellow fever virus, 17D strain, were obtained from Dr. Robert E. Shope and used in interference assay. The viruses were propagated in C6/36 cell at 28°C, maintained in Leibovitz L-15 medium containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (L15-10%), 10% tryptose phosphate broth, 150 U/mL penicillin and 1mg/mL streptomycin, and detected by IFA, after 7 days post-infection, using hyperimmune mouse ascitic fluids prepared against DENV2 serotype (Tesh, 1979) and antibodies against VFA 17D prepared in rabbit. The supernatant virus were harvested, aliquoted in the presence of L15-2% and stored at -80°C for later use.

2.2 – Plaque assay

Virus titers were determined by plaque assays with Vero cells monolayers grown in 24-well plates. The viral stocks of DENV2 and VFA 17D were diluted serially 10-fold in sterile PBS buffer each and inoculated into duplicate wells. After adsorption, monolayers were washed with the PBS buffer and overlaid with 1.0 mL of 3% carboxymethylcellulose increased with L15 – 2% and incubated at 37°C/5% CO₂ for 7 days. After this period, cells were stained with dye 2% neutral red and the plaques were counted, and the units converted to numbers of PFU per milliliter. When the viral stocks showed a titer of at least 10⁶ PFU/mL, they were used to construct the real time RT-PCR standard curves to realize an absolute quantification of the virus harvested from the experiments.

2.3 - Extraction of viral RNA

The RNA of VFA 17D and DENV2 were extracted using QIAamp viral RNA Kit (Qiagen, Valencia, CA) in accord with the manufacturer instructions. The RNA was eluted with 60µl of sterile water and stored at -20⁰C for later use.

2.4 – Interference assay

An interference experiment was done using C6/36 cells, a strain derived from *Aedes albopictus*. In control groups culture flasks with C6/36 monolayers were infected with either DENV2 virus or YF 17D viruses at a M.O.I. of 0,1 and 7 days later infection was confirmed by IFA or RT- PCR with specific primers. In a second group, seven days after the initial infection, following IFA assay, cells were subjected to a second crossed-infection (i.e. cells that were firstly infected with DENV2 were secondly infected with VFA and vice versa) at the same M.O.I. and with the same strain of the first infection. Since the first day of infection, the culture medium of the infected cells was harvested daily and stored at -20⁰C until the moment of the use.

2.5 - Cell morphology analysis

After infection and co-infection assays cell morphology was daily assessed using an optical microscope CK2 and the cells image captured and used to check for alterations in cells' morphology that could indicate the occurrence of cell injury.

2.6 – Immunofluorescence assay

The immunofluorescence reaction was done at the third day after co-infection. Antibodies against dengue-2 virus and yellow fever virus were generated in mice (Swiss strain) and rabbit, respectively. The secondary antibodies against mouse and

rabbit IgGs were respectively labeled with FITC (green) and TRITC (red), and were purchased from Sigma-Aldrich®, USA. Co-infected cells were treated with both primary antibodies and then with secondary antibodies. The cells image were collected in a BX40 fluorescence microscope (Olympus) and captured by a Q-Color 5 camera (Olympus) with the Q-Capture 2.68.6 software.

2.6 – Real-time PCR assay

2.6.1 – Primers design

The DENV2 oligonucleotide primers to were based on the conserved 3'-noncoding region (3'UTR) described by Houg *et al.*, 2001 and the oligonucleotide primers for VFA17D were based on the 3'UTR designed specifically according to the general guidelines for real-time PCR primer after to realized an alignment with the nucleotide sequence for all dengue serotypes. Primer sequences are: DENV2 (sense: 5'AAG-GTG-AGA-TGA-AGC-TGT-AGT-CTC-3'; anti-sense: 5'-CAT-TCC-ATT-TTC-TGG-CGT-TCT-3'), VFA-17D (sense: 5'TTT-GCC-ACT-GCT-AAG-CTG-TGA -3'; anti-sense: 5'- CGC-AAA-ACC-TGG-TTT-CTG-GG-3').

2.6.2 – Real-time PCR

Quantitative real-time PCR was performed in a GeneAmp 5700 detection system. Total virus RNAs collected at the interference assay as well as the virus RNA of the standard curve were extracted by QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN, Valencia, CA) as previously described. Extracted RNAs were used in RT-PCR using both TaqMan and Sybr Green One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit (Applied Biosystems) according to manufacturer's instruction and the generated data were

analyzed by the GeneAmp 5700 SDS software (Applied Biosystems). Amplification conditions were 20 min at 48°C, 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 sec at 95°C and 1 min at 60°C. The standard curve was performed using direct dilutions of the viral stock previously titrated in 10^6 PFU/mL. Specificity of the reaction for each virus was analyzed through the melting temperature (T_m). The standard curve was performed using direct dilutions of the viral stock previously titrated in 10^6 PFU/mL ranging from 10^1 to 10^6 PFU/mL.

3- Results

3.1 - Cell morphology analysis

Cells that were firstly infected with VFA17D and subsequently with DENV2 presented a significant alteration in morphology (Fig. 1), especially with the presence of oversized cells and cluster of cells. Conversely, cells that were firstly infected with DENV2 and subsequently with VFA17D presented a normal and characteristic aspect (Fig. 1), suggesting that in this group the viral replication level is significantly lower.

3.2 - Replication profiles after DENV2 or VFA 17D viruses infection

The analysis of infection after 24 hours in group 1 shows that amplification profiles for both viruses in C6/36 cells present a considerable drop in the viral load compared to the inoculum, known as the eclipse period. In the next 2 days, the viral replication increased, reaching on the 3rd day, levels higher than those present in the initial inoculum, as can be observed in Fig.2. These results evidence a chronic infection in C6/36 cells by both viruses.

3.3 - Replication profiles after DENV2 and VFA 17D viruses cross-infections

The analysis of group 2, which was subjected to cross-infection assays, shows that when cells were first infected with DENV2, and seven days later with VFA 17D virus, a reduced VFA17D replication profile was observed while DENV2 replication was kept in a high level (Fig. 3). Differently to that, when cells were firstly infected with VFA, and seven days later with DENV2, the replication profiles for both viruses were shown to be high-levelled (Fig. 4).

4. Discussion

The results presented here evidence that the occurrence of dengue-2 virus infection impairs the replication of YF virus subsequently infected. Since our results were obtained in mosquito cells, it is possible to hypothesize that once *Aedes* mosquitoes are infected with dengue-2 virus, a second infection by YF virus and replication might not efficiently take place. Therefore, our results shed light into the observed situation of absence of urban YF epidemics in areas where dengue is highly prevalent, where dengue virus interference on YF virus replication in mosquito's cells could, at least partially, explain this phenomenon. It should also be considered that the reverse situation could likewise happen, with the prevalent infection of YF virus impairing the subsequent infection/replication of dengue virus.

Acknowledgements

This study was supported by the São Paulo State Research Foundation (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). EPA holds a CAPES Fellowship. BALF holds a CNPq Research Fellowship.

References

- Gubler, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. Arch Med Res, v.33, n.4, Jul-Aug, p.330-42. 2002.
- Monath, T. P. Yellow fever: an update. Lancet Infect Dis, v.1, n.1, Aug, p.11-20. 2001.
- Gubler, D. J. K., G.; Markoff, L. *Flaviviruses*. In: D. M. Knipe (Ed.). Fields in Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.01, 2007. *Flaviviruses*, p.1153-1185
- Vasconcelos, P. F. [Yellow Fever]. Rev Soc Bras Med Trop, v.36, n.2, Mar-Apr, p.275-93. 2003.
- Figueiredo, L. T. The Brazilian flaviviruses. Microbes Infect, v.2, n.13, Nov, p.1643-9. 2000.
- Figueiredo, L. T. Emergent arboviruses in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop, v.40, n.2, Mar-Apr, p.224-9. 2007.
- Barnett, E. D. Yellow fever: epidemiology and prevention. Clin Infect Dis, v.44, n.6, Mar 15, p.850-6. 2007.
- Tesh, R. B. A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell cultures. Am J Trop Med Hyg, v.28, n.6, Nov, p.1053-9. 1979.

LEGENDS TO THE FIGURES

Figure 1. Morphology of infected and control C6/36 cells. (A) Cells firstly infected with DENV2 and seven days later with VFA17D with no altered morphology. (B) Cells firstly infected with VFA17D and seven days later with DENV2 showing an altered pattern of morphology. The pictures show cells' morphology during four post-infection days (p.i.).

Figure 2. Replication profile of (A) DENV-2 and (B) VFA17D-infected cells. Note that there is a drop in replication in the first 48 hours after infection (eclipse period). Later, there is an increase in viral production to levels above the initial inoculum. These results put in evidence the chronic infection in C6/36 cells by both viruses.

Figure 3. Replication profile of DENV-2 and VFA17D obtained in the co-infection experiments. C6/36 cells were first infected with DENV-2 virus and after 7 days co-infected with VFA17D. There was a low replication of VFA17D when compared with DENV-2 virus. Days 1-8 refer to the days following the co-infection with VFA17D.

Figure 4. Replication profile of DENV-2 and VFA17D obtained in the co-infection experiments. C6/36 cells were first infected with VFA17D virus and after 7 days later co-infected with DENV-2. The same profile for both virus replication was observed. Days 1-8 refer to the days following the co-infection with VFA17D.

Figure 5. (A) and (C), positive immunofluorescence for DENV-2 labeled with FITC; (B) and (D), negative immunofluorescence for VFA17D labeled with TRITC; (E) and (F), negative controls. Exposition time was the same for the all experiments.

FIGURE 1

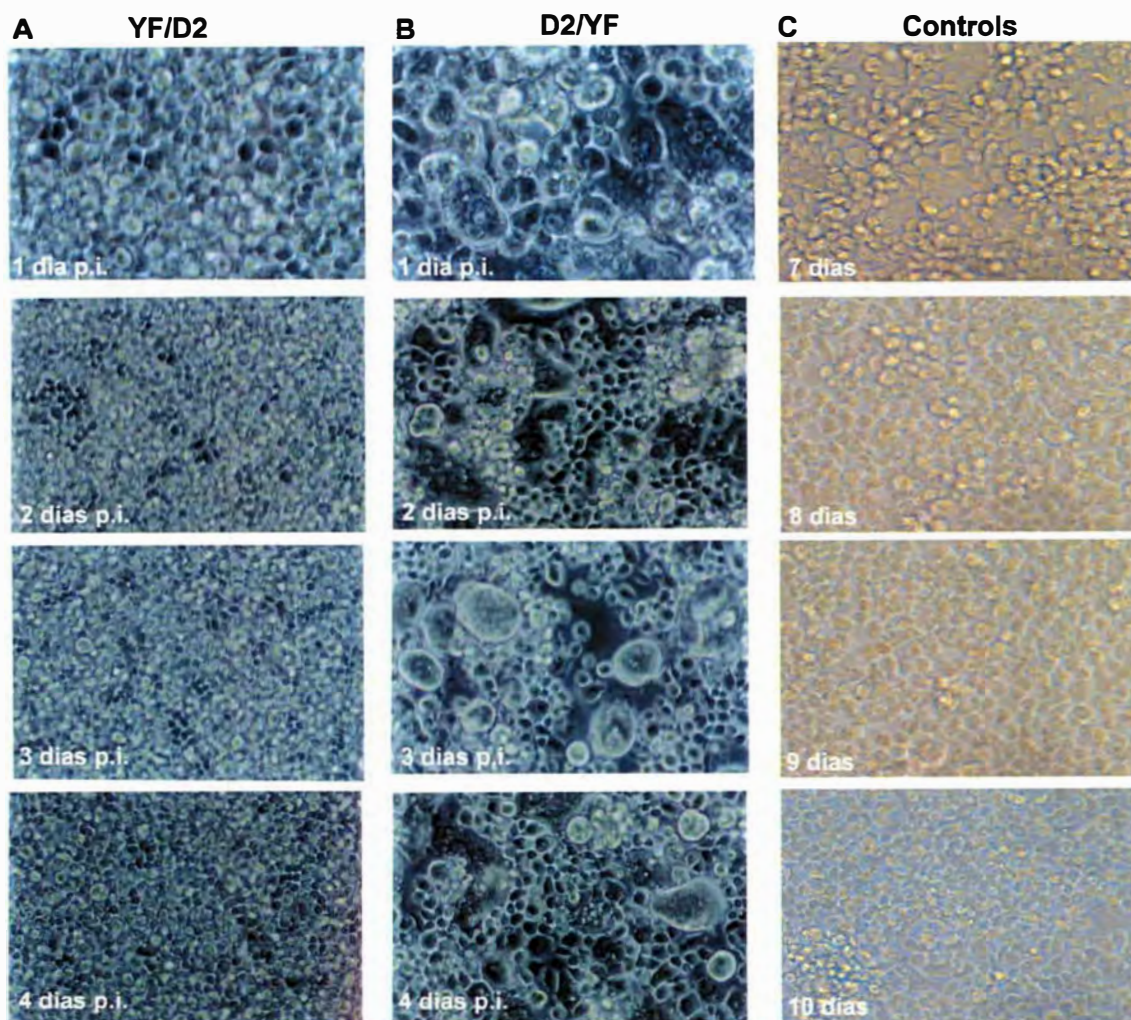
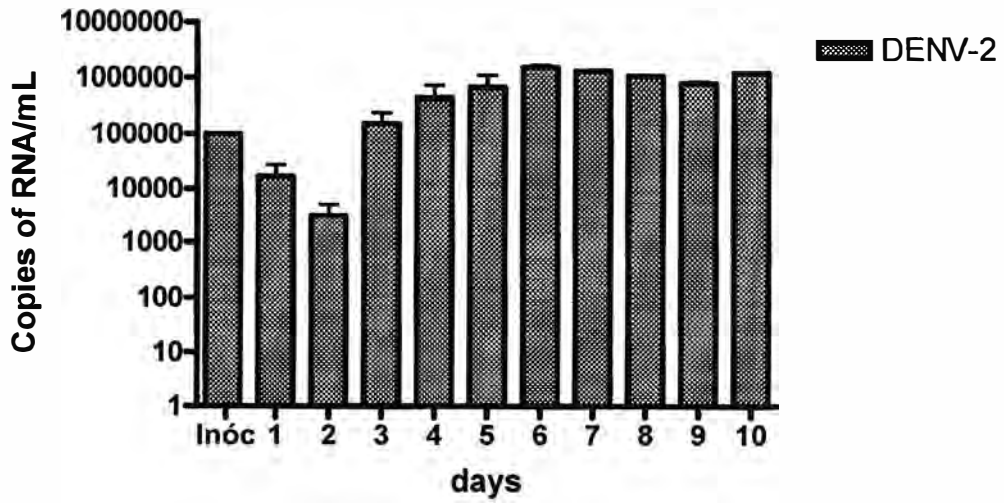


FIGURE 2

A



B

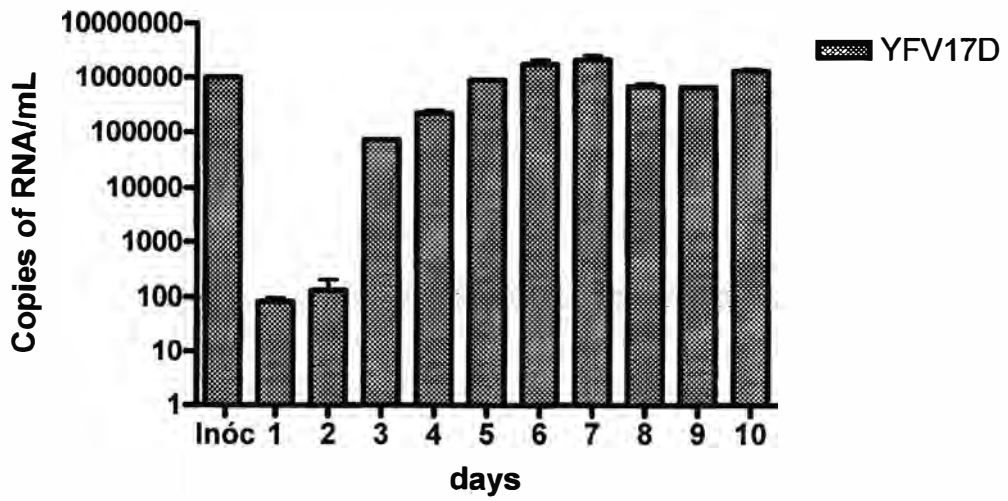


FIGURE 3

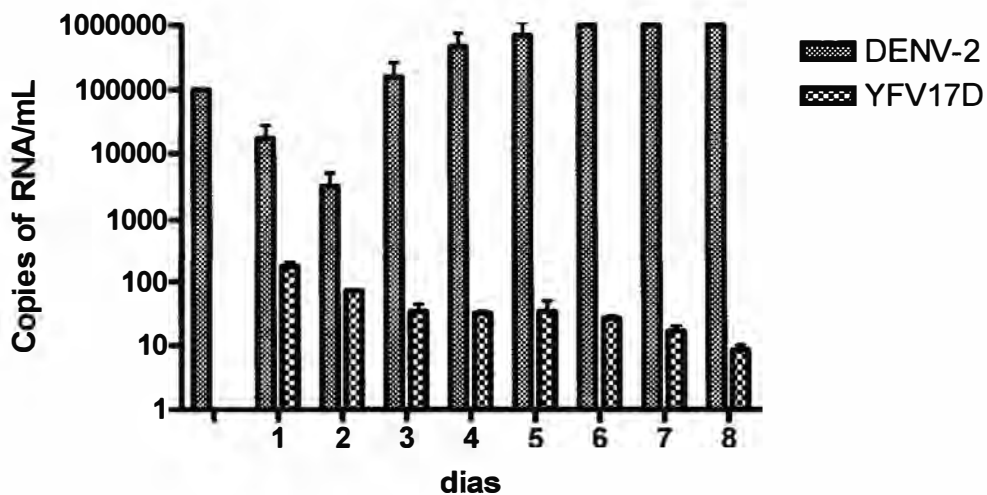


FIGURE 4

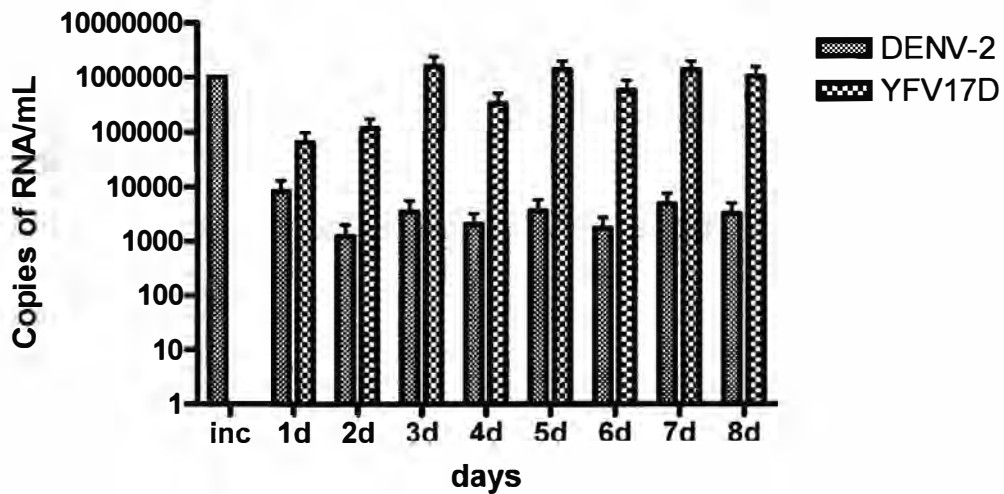


FIGURE 5

DENV-2 (FITC)

YFV17D (TRITC)

