

Renata Cristina Fleith

**IMPLICAÇÕES DO PEPTÍDEO CONSERVADO E<sub>250-270</sub> DA  
PROTEÍNA “E” NA INFECTIVIDADE DO VÍRUS DA DENGUE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Santos Mansur

Florianópolis  
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Fleith, Renata Cristina  
IMPLICAÇÕES DO PEPTÍDEO CONSERVADO E250-270 DA PROTEÍNA  
E NA INFECTIVIDADE DO VÍRUS DA DENGUE / Renata Cristina  
Fleith ; orientador, Daniel Santos Mansur - Florianópolis,  
SC, 2014.  
121 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

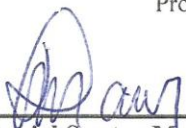
1. Biotecnologia e Biociências. 2. Vírus da Dengue. 3.  
Proteína do Envelope. 4. Mutações. I. Mansur, Daniel Santos  
. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

“Implicações do peptídeo conservado E<sub>250-270</sub> da proteína “E” na infectividade do vírus da Dengue”.


por


RENATA CRISTINA FLEITH Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 10/PPGBTC/2014) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Orientador:


  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Daniel Santos Mansur (MIP/CCB/UFSC)**

Banca examinadora:

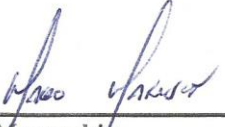
  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Francisco Pereira Lopes (Embrapa Informática Agropecuária/SP)**

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Daisy Maria Strottmann (ICC/Fiocruz)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. André Luiz Barbosa (MIP/CCB/UFSC)**

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Patrícia Hermes Stoco (PPGBTC/CCB/UFSC)**

Coordenador:

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Marcelo Maraschin**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Florianópolis, 30 de abril de 2014.



Aos meus pais Renato e Márcia, e ao meu irmão Afonso. Pelo carinho e amor incondicional.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao meu orientador Prof. Daniel Mansur, que no princípio de tudo isso me convidou para fazer parte do seu grupo. Obrigada professor pela paciência nesses dois anos, por tudo que você me ensinou e, principalmente, por ter acreditado em mim, muitas vezes mais do que eu mesma acreditava.

Ao Prof. André Báfica por ter me aceitado nessa família de “loucos, encrênqueiros e desajustados” que é o LiDI, da qual me sinto hoje inteiramente parte. Obrigado professor por me fazer ver as coisas de uma forma diferente e ser mais crítica; e especialmente, por compartilhar conosco o seu amor pela ciência.

Ao Prof. Fernando Spiller, pelos ensinamentos, críticas e discussões científicas.

Quisera eu ter podido aprender tudo que vocês podiam ensinar!

À pessoa maravilhosa, meu grande amigo e professor, Álvaro Menin. Pois seus ensinamentos não ficaram somente no âmbito acadêmico, eles foram uma lição de vida; e sempre me guiaram nos momentos de dúvida.

No LiDI tive o prazer de conhecer e conviver com muitas pessoas maravilhosas e brilhantes, que se tornaram a minha segunda família e fazem deste um lugar único.

Às minhas mais que colegas, grandes amigas, que nesse momento estão distantes: Lívia, Nicole e Nika. Vocês foram as “cerejas do bolo” desses dois anos; sem mais! E à Cris, essa pessoa de coração imenso, por todas as conversas e conselhos. Espero que minha amizade com vocês possa durar a vida inteira.

À Paula e ao Filho, que me ajudaram diretamente no desenvolvimento deste, muitas vezes deixando suas coisas de lado para cuidar das minhas. Não seria possível chegar aqui sem vocês. À Puka e à Carol, por toda ajuda e por tornarem meu dia-a-dia muito mais divertido. E em nome deles, a todos os integrantes e ex-integrantes do LiDI, que tanto me ensinaram e fizeram desse um período inesquecível e muito feliz.

À Dra. Cláudia Nunes Duarte dos Santos e à Dra. Daisy Maria Strottmann, do ICC-Fiocruz, que colaboraram na execução deste, do início ao fim; cederam reagentes e me receberam tão cordialmente em seu laboratório. Ao Dr. Brian Ferguson, que nos ajudou em todas as análises de biologia estrutural, escolha dos mutantes e modelagens. E ao Dr. Francisco Pereira Lobo, que conduziu as principais análises de bioinformática.

Aos professores e alunos do Laboratório de Protozoologia pela disponibilidade de seu laboratório, onde realizei boa parte dos experimentos iniciais, pelo empréstimo de reagentes, equipamentos, pelas contribuições em seminários, pelos conselhos e amizade.

Aos professores e alunos do Laboratório de Imunologia Aplicada e Virologia Ambiental, que sempre me atenderam prontamente, auxiliando e cedendo o uso de aparelhos, reagentes, etc. E em nome deles, a todos os alunos e professores da UFSC que contribuíram de alguma forma para a realização deste.

Aos membros do Procad-Dengue, não só pela troca de materiais e reagentes, mas principalmente pelas discussões, ideias e críticas nas reuniões e visitas ao Laboratório.

Por fim, e de forma toda especial, à minha família. A vocês que estão sempre ao meu lado, acreditando, incentivando e dando o suporte para que eu realize meus sonhos. Obrigada mãe e pai, por tudo que vocês me ensinaram, pois é o exemplo de vocês que me guia todos os dias. Obrigado mano, por tornar minha vida mais leve e alegre. Eu amo vocês!



“That is the way to learn the most, that when you are doing something with such enjoyment that you don’t notice that the time passes”.

(Albert Einstein).



## RESUMO

Os vírus de genoma RNA apresentam uma ampla variabilidade genética, devido à alta taxa de mutação intrínseca associada à polimerase viral. Essas mutações ocorrerem de forma randômica, mas a variabilidade é desigual ao longo do genoma, pois mutações que resultam em efeitos deletérios sobre a aptidão são restritas. Dessa forma, o genoma é marcado por regiões permissivas para múltiplas mutações e locais críticos para estrutura e função viral. Dentre essas regiões críticas, vários trabalhos demonstraram que mutações na proteína do envelope (E) dos *Dengue virus* (DENV) têm impacto na aptidão e infectividade viral. Além de ser a proteína mais abundante da superfície do virion e seu principal determinante antigênico, a proteína E participa dos processos de adsorção e fusão do virion nas células hospedeiras, sendo essencial para a replicação do vírus. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a conservação e o papel do peptídeo E<sub>250-270</sub> na infectividade dos DENV, através da síntese de vírus recombinantes mutantes. Inicialmente uma análise foi feita de modo a desenhar mutações que impactassem a sua estrutura secundária, ou interferissem com possíveis interações entre proteínas. Os fragmentos de DNA contendo essas mutações foram sintetizados e inseridos em um clone infeccioso do DENV-1, sorotipo BR/90, e então testados em ensaios de transfecção. Surpreendentemente, o vírus recombinante vBACMutJ, demonstrou um nível de replicação e espalhamento reduzido, em células de humanos e insetos, quando comparado ao selvagem, sugerindo que as mutações na sequência de E<sub>250-270</sub> reduzem a infectividade viral.

**Palavras-chave:** *Dengue virus*; proteína do envelope; mutações; infectividade; peptídeos conservados.



## ABSTRACT

RNA viruses exhibit wide genetic variability due to the high intrinsic rate of mutation associated with viral polymerase. These mutations occur randomly, but the variability is uneven along the genome, since mutations that result in deleterious effects on fitness are limited. Thus, the genome is marked by regions permissive for multiple mutations, and critical sites for viral structure and function. Among these critical regions, several studies have shown that mutations in *Dengue virus* (DENV) envelope protein (E) impair viral fitness and infectivity. Besides it is the most abundant protein on the surface of the virion and its main antigenic determinant, the E protein participate in the process of adsorption and fusion into the host cell, and is essential for virus replication. In this context, the aim of this study was to evaluate the conservation and the role of the peptide E<sub>250-270</sub> on DENV infectivity, through the synthesis of mutant recombinant viruses. Initially, an in depth analysis was performed in order to design mutations that would either disrupt its secondary structure or interfere with possible protein/protein interactions. DNA fragments containing these mutations were synthesized and inserted into an infectious clone of DENV-1, serotype BR/90, and then tested in transfection assays. Surprisingly, the recombinant virus vBACMutJ demonstrated a very low level of replication and spread, in human and insect cells, when compared to the wild type, suggesting that mutations in the sequence of E<sub>250-270</sub> reduced the viral infectivity.

**Keywords:** *Dengue virus*; envelope protein; mutations; infectivity; conserved peptides.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diferença entre virions maduros e imaturos. ....	28
Figura 2 – Representação esquemática do genoma e proteoma viral. .....	29
Figura 3 – Estrutura do virion e da proteína do Envelope. ....	32
Figura 4 – Mecanismo de fusão proposto para proteínas de fusão classe II. ....	39
Figura 5 – O ciclo viral. ....	42
Figura 6 – Estratégia utilizada para inserção das mutações em pBACDV1. ....	55
Figura 7 – Esquema representativo de pBACDV1 e Plasmídeo 2... ..	56
Figura 8 - Regiões conservadas da proteína do envelope dos DENV. .....	73
Figura 9 – Perfil de conservação dos aminoácidos nos DENV. ....	75
Figura 10 – Sequência dos mutantes de E <sub>250-270</sub> . ....	76
Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose do produto das restrições de AatII e SphI. ....	78
Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose: PCR das colônias transformadas com plasmídeos resultantes da primeira clonagem. .	78
Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose do produto das restrições de PvuI, NotI e MluI. ....	79
Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose: PCR das colônias transformadas com pBACMut. ....	80
Figura 15 – Eletroforeses do produto de restrição e transcrição <i>in vitro</i> de pBACDV1 e pBACMutJ. ....	81
Figura 16 – Modelagem da proteína E contendo o Mutante J. ....	82
Figura 17 – Avaliação da curva de replicação viral por RTq-PCR e titulação. ....	83
Figura 18 – Expressão da proteína E nas células transfectadas. ....	84
Figura 19 – Espalhamento do vírus em células transfectadas com vBACDV1 e vBACMutJ. ....	86

Figura 20 – Avaliação da curva de replicação viral no sobrenadante de células C6/36. ....	87
Figura 21 – Espalhamento do vírus em células C6/36 transfectadas. ....	88



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Condições de amplificação utilizando iniciadores M13	59
Quadro 2 - Condições de amplificação utilizando iniciadores Mut.	62
Quadro 3 - Iniciadores utilizados na qPCR .....	68
Quadro 4 - Condições de amplificação: PCR quantitativo em tempo real .....	68
Quadro 5 – Frequência dos aminoácidos de peptídeos altamente conservados de E em 480 sequências da poliproteína viral.....	74



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- µg – micrograma  
µL – microlitro  
A – alanina  
ADE – *Antibody Dependent Enhancement*  
ATP – Adenosina trifosfato  
ATPase – Adenosina trifosfatase  
B.O.D. – *Biochemical oxygen demand*  
BAC – Cromossomo artificial bacteriano (do inglês: *bacterial artificial chromosome*)  
Bco – Branco  
BSA – albumina sérica bovina (do inglês *Bovine serum albumin*)  
C – proteína do Capsídeo  
CCL4 – *Chemokine (C-C motif) ligand 4*  
CD – *Cluster of Differentiation*  
cDNA – DNA complementar  
CMC – carboximetilcelulose  
CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono  
C-terminal – Carboxi-terminal  
DC-SIGN – molécula não integrina, aderida à molécula de adesão intercelular 3, específica de células dendríticas (do inglês *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*).  
DENV – *Dengue virus*  
DENV-1 a -4 – *Dengue virus* sorotipo 1, 2, 3 e 4.  
DENV1-BR/90 – DENV-1, isolado BR/90.  
DMEM/F12 – *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*  
DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic Acid*)  
E – proteína do Envelope  
E-DI – Domínio I da proteína do envelope  
E-DII – Domínio II da proteína do envelope  
E-DIII – Domínio III da proteína do envelope  
EDTA – ácido etilenodiamino teracético  
g – grama  
GRP78 – Proteína regulada pela glicose-78 (do inglês *glucose-regulating protein 78*)  
IFI – imunofluorescência indireta  
IFN – Interferon  
IgG – Imunoglobulina tipo G

JEV – *Japanese encephalitis virus*  
kb – Quilobases  
kDa – Quilodáltons  
L – leucina  
L – litro  
LB – Luria-Bertani  
M – proteína de Membrana  
mg – Miligrama  
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês *Major Histocompatibility Complex*)  
mL – Mililitro  
mRNA – RNA mensageiro  
MTase – Metiltransferase  
NaCl – cloreto de sódio  
NC – Nucleocapsídeo  
nm – Nanômetros  
NS – proteína não estrutural  
N-terminal – Amino-terminal  
NTPase - Nucleosídeo trifosfatase  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
ORF – Sequência aberta de leitura  
P1 – Plasmídeo 1  
P2 – Plasmídeo 2  
pb – pares de bases  
pBACDV1 – BAC que codifica a poliproteína do DENV1-BR/90.  
pBACMut A-O – pBACDV1 com mutações (A-O) na sequência de E<sub>250</sub>.  
270  
PCR – reação em cadeia da polimerase (do inglês: *Polymerase Chain Reaction*)  
PDB - *Protein Data Bank*  
pfu – unidades formadoras de placa  
pH – Potencial hidrogeniônico  
PPM – Padrão de peso molecular  
prM – proteína precursora de membrana  
qPCR – PCR quantitativo em tempo real  
qsp – quantidade suficiente para  
RdRP – RNA polimerase dependente de RNA (do inglês *RNA-dependent RNA polymerase*).  
RE – Retículo endoplasmático  
RER – Retículo endoplasmático rugoso  
RMN – Ressonância magnética nuclear

RNA – Ácido ribonucleico (do inglês *Ribonucleic Acid*)  
RNase – ribonuclease  
rpm – rotações por minuto  
RTPase - RNA 5' trifosfatase  
RTq-PCR – Reação da transcriptase reversa, seguida de qPCR  
S – serina  
SAP – *Shrimp Alkaline Phosphatase*  
SDS – dodecil sulfato de sódio  
sE – Fração solúvel da proteína do envelope, ou ectodomínio.  
SFB – soro fetal bovino  
SLA – *stem-loop A*  
STAT2 – *Signal transducer and activator of transcription 2*  
STING – *Stimulator of Interferon Genes*  
TB – *Terrific Broth*  
TBEV – *Tick-borne encephalitis virus*  
TNF – Fator de necrose tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor*)  
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina  
UTR – Região não codificante  
V- valina  
WNV – *West Nile virus*  
YFV – *Yellow fever virus*  
 $\alpha$  – Alfa  
 $\beta$  – Beta  
 $\gamma$  – Gama



## SUMÁRIO

<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>25</b>
1.1 DENGUE .....	25
1.2 EPIDEMIOLOGIA .....	25
1.3 TRANSMISSÃO .....	26
1.4 A DOENÇA .....	27
1.5 O VÍRUS .....	27
<b>1.5.1 O genoma</b> .....	<b>28</b>
<b>1.5.2 Capsídeo</b> .....	<b>30</b>
<b>1.5.3 Proteína precursora de membrana</b> .....	<b>30</b>
<b>1.5.4 Envelope</b> .....	<b>31</b>
<b>1.5.5. Proteína não estrutural 1</b> .....	<b>33</b>
<b>1.5.6 Proteínas não estruturais 2A e 2B</b> .....	<b>34</b>
<b>1.5.7 Proteína não estrutural 3</b> .....	<b>34</b>
<b>1.5.8 Proteínas não estruturais 4A e 4B</b> .....	<b>36</b>
<b>1.5.9 Proteína não estrutural 5</b> .....	<b>36</b>
1.6 O CICLO VIRAL .....	37
1.7 IMUNOPATOLOGIA.....	42
1.7.1 Reposta imune mediada por anticorpos .....	42
1.7.2 Resposta imune mediada por células, citocinas e complemento ..	45
1.8 PAPEL DA PROTEÍNA “E” NA INFECTIVIDADE VIRAL .....	48
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>51</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	51
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	51
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>53</b>
3.1 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA .....	53
3.2 SELEÇÃO DAS MUTAÇÕES .....	53
3.3 SÍNTESE DOS MUTANTES .....	54
<b>3.3.1 Desenho e síntese dos genes mutados</b> .....	<b>54</b>
<b>3.3.2 Primeira Clonagem</b> .....	<b>56</b>
3.3.2.1 Extração de DNA plasmidial: minipreparação em tubo .....	58
3.3.2.2 PCR dos genes em <i>pUC Simple</i> .....	59
<b>3.3.3 Segunda clonagem</b> .....	<b>60</b>
3.3.3.1 Extração do DNA de pBACDV1 .....	60
3.3.3.2 Digestão de pBACDV1 e dos plasmídeos resultantes da primeira clonagem .....	60
3.3.3.3 Ligação em pBACDV1 .....	61
3.3.3.4 PCR para amplificação do segmento de E <sub>250-270</sub> .....	62
3.4 TRANSCRIÇÃO <i>in vitro</i> .....	63

<b>3.4.1 Purificação do RNA transcrito .....</b>	<b>64</b>
3.5 CULTURA DE CÉLULAS.....	64
<b>3.5.1 Células Huh-7.5 .....</b>	<b>64</b>
<b>3.5.2 Células C6/36.....</b>	<b>65</b>
3.6 TRANSFEÇÃO.....	66
3.7 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR .....	66
<b>3.7.1 Extração de RNA .....</b>	<b>66</b>
<b>3.7.2 Síntese do DNA complementar (cDNA) .....</b>	<b>67</b>
3.8 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL .....	67
3.9 TITULAÇÃO VIRAL ATRAVÉS DA DETECÇÃO DE PLACAS DE LISE.....	68
3.10 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	69
3.11 MARCAÇÃO INTRACELULAR DE CÉLULAS Huh-7.5 TRANSFECTADAS PARA CITOMETRIA DE FLUXO .....	70
3.12 CERTIFICADO DE QUALIDADE EM BIOSSEGURANÇA ....	71
3.13 MEIOS E SOLUÇÕES .....	71
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
4.1 REGIÕES CONSERVADAS NA PROTEÍNA “E” .....	73
4.2 OS MUTANTES DE E <sub>250-270</sub> .....	75
4.3 O MUTANTE J.....	81
4.4 ENSAIOS COM vBACMutJ .....	82
<b>4.4.1 Ensaios em células de linhagem humana .....</b>	<b>82</b>
<b>4.4.2 Ensaios em células de inseto .....</b>	<b>86</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>933</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>955</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>1133</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>1155</b>
<b>APÊNDICE C.....</b>	<b>1177</b>



## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 DENGUE

A dengue é uma doença viral infecciosa, transmitida por mosquitos e amplamente distribuída pelas regiões tropicais do planeta. Seu agente etiológico é um arbovírus, membro da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, que apresenta cinco sorotipos: *Dengue virus* 1 a 5 (DENV-1 a -5). Em humanos, a doença cursa normalmente com um quadro febril autolimitante, que pode agravar-se com hemorragias e choque hipovolêmico, principalmente nos casos de infecções recorrentes por diferentes sorotipos (HALSTEAD, 1979; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007; NORMILE, 2013).

A doença já é descrita na literatura médica há mais de 200 anos, mas o vírus foi só isolado em 1943 no Japão, e então em 1945 no Hawaii, sendo descrito como DENV-1 e DENV-2, respectivamente. Sua origem é incerta, mas as principais teorias indicam a emergência de um ancestral comum a cerca de mil anos, na África ou Ásia. Esse vírus estaria, a princípio, envolvido num ciclo silvestre de transmissão, entre mosquitos e primatas não humanos. A transmissão para humanos parece ter ocorrido há poucas centenas de anos, de forma independente para todos os quatro sorotipos (HOLMES; TWIDDY, 2003; MESSINA et al., 2014).

### 1.2 EPIDEMIOLOGIA

A expansão geográfica para novos países, tanto em áreas urbanas como rurais, fez a incidência de dengue no mundo aumentar 30 vezes nos últimos 50 anos; transformando-a na doença viral transmitida por mosquitos com a mais rápida taxa de propagação na atualidade (WHO/TDR, 2009). Apesar das estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontarem para um número em torno de 50 a 100 milhões de casos anualmente (WHO/TDR, 2009), um estudo mais recente demonstra que se consideradas as infecções aparentes e não aparentes, esse número pode ser até três vezes maior (BHATT et al., 2013).

Toda essa diferença sugere um importante papel das infecções não aparentes na epidemiologia da doença. Elas somariam cerca de 294 milhões de casos em 2010. Já as infecções aparentes, no mesmo ano, seriam cerca de 96 milhões; e estariam distribuídas principalmente pela Ásia, com cerca de 70% dos casos (30% só na Índia), Américas com

14% (metade deles só no Brasil e México), e África com 16% (BHATT et al., 2013). Estima-se que quase metade da população mundial, 2,5 bilhões de pessoas, viva em países onde a dengue é endêmica (WHO/TDR, 2009).

Quanto aos números oficiais, em 2013 foram notificados 2.351.703 casos de dengue clínica nas Américas, com uma taxa de incidência de 430,84 por 100.000 habitantes. Destes 1.603.529 casos foram reportados em países do cone sul (PAHO, 2014). De acordo com as estimativas de Shepard et al. (2011) o “custo anual total” da dengue nas Américas foi de 2,1 bilhões de dólares americanos no período entre 2000 e 2007; para o Brasil o custo foi de 878 milhões de dólares.

Para se ter ideia da evolução geral da doença no país, em 2009, foram notificados 393.583 casos de dengue no Brasil (BRASIL, 2011a). Em 2011, até 01 de outubro, já tinham sido notificados 721.546 casos, sendo destes 10.620 casos graves. O maior número de notificações ocorreu na região Sudeste (47,6%), seguida pelo Nordeste (25,6%), Norte (15,7%), Centro-Oeste (6,2%) e Sul (4,8%) (BRASIL, 2011b). Em 2013 (até semana epidemiológica 44) tinham sido registrados 1.451.432 casos de dengue, o que corresponde a 61,7% dos casos das Américas, com uma taxa de incidência de 755,51 casos por 100.000 habitantes (PAHO, 2014). Todos os sorotipos virais já foram isolados no país (BRASIL, 2011b).

De acordo com os dados da Diretoria de Vigilância Epidemiológica de Santa Catarina, em 2013, foram confirmados 255 casos de dengue no estado. Destes, 19 foram casos autóctones (SANTA CATARINA, 2014a). Em 2014, até 10 de março, foram confirmados sete casos, sendo todos importados (SANTA CATARINA, 2014b).

### 1.3 TRANSMISSÃO

Os DENV apresentam um ciclo silvestre de transmissão, tendo os primatas não humanos como hospedeiros vertebrados e os mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti*, como vetores. No entanto os *Dengue virus* tornaram-se plenamente adaptados aos seres humanos e não mais exigem o ciclo silvestre para sua manutenção (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

Os vetores são infectados no momento do repasto sanguíneo, quando aspiram partículas virais, juntamente com o sangue de hospedeiros vertebrados na fase de viremia da doença. Após a ingestão, o vírus infecta as células do intestino médio do artrópode, espalha-se pela hemocele e, então, para outros tecidos, incluindo as glândulas

salivares. Uma vez nas glândulas, o vírus pode ser novamente transmitido através da picada do mosquito, quando é liberado juntamente à saliva. O ciclo que vai desde a infecção dos mosquitos, até a presença dos virions nas glândulas salivares, leva de oito a 14 dias, dependendo da temperatura ambiente, cepa viral, entre outros (GLUBER; KONO; MARKOFF 2007).

Outras formas de transmissão, não associadas a vetores, têm sido admitidas entre os flavivírus. Todavia, seu papel na epidemiologia e manutenção da doença não é bem compreendido. Para os DENV, já foram relatados casos isolados de transmissão vertical, em transfusões de sangue, em transplantes de órgãos, e pelas vias percutânea e mucocutânea (CHEN; WILSON, 2005; TAMBYAH et al., 2008; WIWANITKIT, 2010).

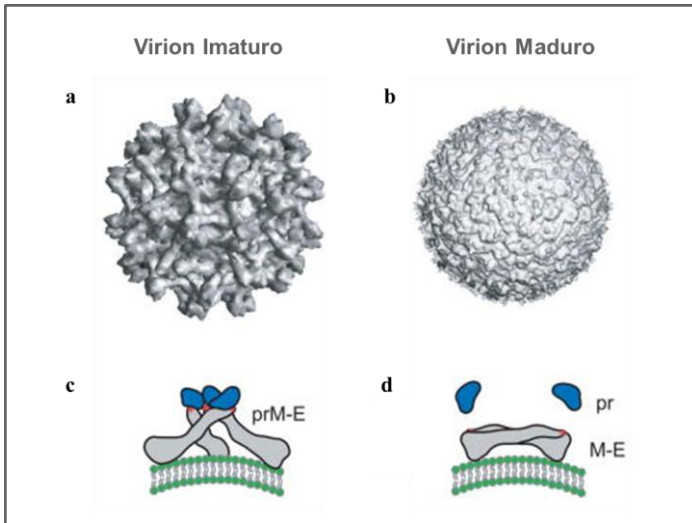
#### 1.4 A DOENÇA

A dengue tem uma ampla variedade de apresentações clínicas, muitas vezes com evolução clínica e prognóstico imprevisíveis. Enquanto a maioria dos pacientes recuperam-se após um curso clínico autolimitante e não grave, um pequeno percentual apresenta uma doença de maior gravidade, caracterizada principalmente por extravasamento de plasma acompanhado ou não de hemorragia. Para fim de classificação, a sintomatologia das infecções pelo DENV foi dividida em três grupos: dengue sem sinais de alarme, dengue com sinais de alarme, e dengue grave (SANTA CATARINA, 2014c).

#### 1.5 O VÍRUS

Os *Dengue virus* são vírus envelopados pequenos, de simetria icosaédrica e genoma de ácido ribonucleico (RNA, do inglês *Ribonucleic Acid*) de fita simples, senso positivo. As partículas virais maduras são esferas, de superfície regular (Figura 1a), medindo aproximadamente 50 nanômetros (nm) de diâmetro. Já as partículas imaturas medem cerca de 60 nm de diâmetro, e apresentam superfície recoberta por espículas, como demonstrado na Figura 1b. O virion é delimitado por um envelope lipídico que recobre um nucleocapsídeo (NC) elétron denso de 30 nm de diâmetro. O envelope é formado por várias subunidades da glicoproteína do Envelope (E) e precursora de Membrana (prM), além de uma bicamada lipídica derivada de membranas da célula do hospedeiro. O nucleocapsídeo consiste de múltiplas cópias da proteína do capsídeo (C) e do RNA genômico

(CHAMBERS et al., 1990a; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007; REY et al., 1995; ZHANG et al., 2003b).

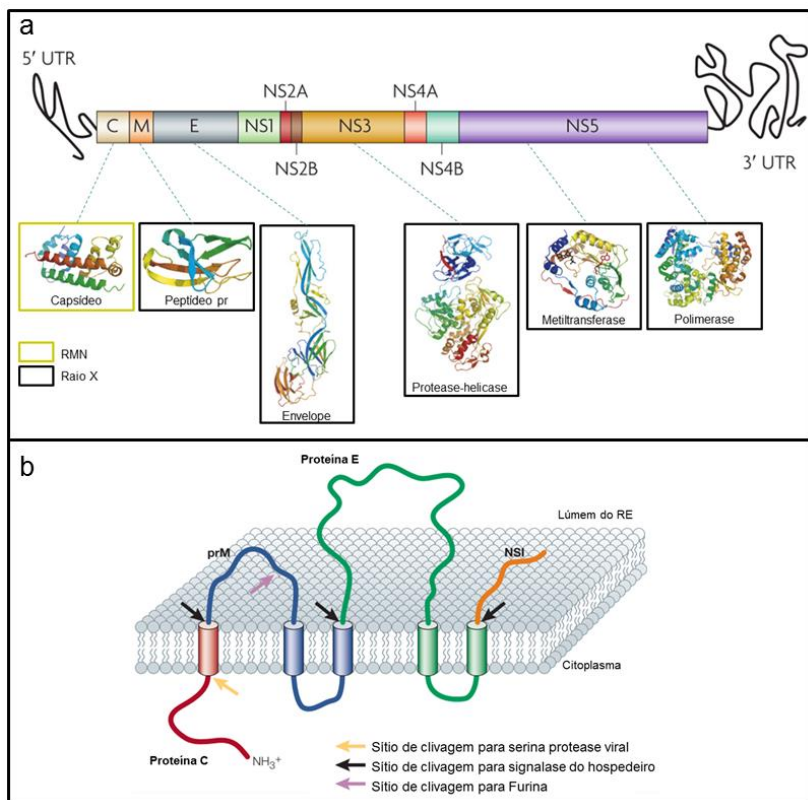


**Figura 1** – Diferença entre virions maduros e imaturos. A superfície das partículas virais imaturas é recoberta por espículas (a), decorrentes dos trímeros de prM-E (c). Os virions maduros são menores, e apresentam superfície regular (b), com a proteína E organizada em homodímeros (d). Em “a” e “b” a reconstrução das partículas virais por crio-microscopia eletrônica. Em “c” e “d” a representação esquemática de E (cinza) e prM (azul) de acordo com o estado de maturação do virion. Peptídeo de fusão representado em laranja. Adaptado de Perera; Kuhn (2008).

### 1.5.1 O genoma

O RNA viral consiste de uma única fita de aproximadamente 11 quilobases (Kb), com uma estrutura *cap* do tipo 1 (m7Gpp- pAmpN2) em sua extremidade 5'. Diferentemente do RNA mensageiro (mRNA) celular, não apresenta cauda de poliadeninas na extremidade 3'. O genoma é por si só infeccioso e codifica uma única sequência aberta de leitura (ORF – do inglês *Open Reading Frame*), que é traduzida em uma poliproteína precursora representada na Figura 2a. Essa ORF está situada entre duas regiões não codificantes (UTRs – do inglês *untranslated regions*), que contém elementos estruturais e funcionais importantes na regulação da tradução e replicação viral. A poliproteína precursora é co e pós-traducionalmente processada por proteases virais e

do hospedeiro (Figura 2b), para dar origem a três proteínas estruturais, C, E e prM, que correspondem aos primeiros resíduos da região amino-terminal; e a sete proteínas não estruturais (NS, do inglês *nonstructural*): NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007; RICE et al., 1985; YU et al., 2008b).



**Figura 2** – Representação esquemática do genoma e proteoma viral. (a) Os DENV possuem genoma de RNA fita simples, senso positivo, que é traduzido em uma única poliproteína precursora. Após o processamento, a poliproteína é clivada em três proteínas estruturais (C, prM/M e E), e sete não estruturais (NS1 a NS5). As estruturas resolvidas de algumas dessas proteínas, ou seus domínios enzimáticos, estão mostradas nas caixas. A caixa contornada em amarelo contém a estrutura de C, resolvida através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), nas caixas em preto estão as estruturas resolvidas por cristalografia de raio X. As proteínas estruturais são traduzidas em associação com as membranas celulares, de acordo com a orientação

demonstrada em “b”. Na figura, os cilindros representam as hélices transmembrana e as setas indicam os sítios de clivagem pós-traducional específicos para os diferentes tipos enzimáticos. As estruturas em “a” estão disponíveis no *Protein Data Bank*, sob os respectivos códigos: 1R6R, 3C5X, 1OKE, 2VBC, 2PID, 2J7U. Adaptado de: Guzman et al. (2010), Mukhopadhyay; Kuhn; Rossmann, (2005) e Perera; Kuhn (2008).

### 1.5.2 Capsídeo

A primeira proteína a ser traduzida a partir da ORF é a proteína do capsídeo. Sua sequência inicia-se um resíduo após a primeira metionina, que é removida durante o processamento proteico. Trata-se de uma proteína pequena, de apenas 12 quilodáltons (kDa) na forma madura, de caráter altamente básico. Os resíduos carregados encontram-se agrupados nas extremidades amino- e carboxi-terminal (N- e C-terminal, respectivamente), separados por uma região altamente hidrofóbica. Essa região parece exercer uma importante função na montagem das partículas virais, e deleções em sua sequência impactam negativamente na capacidade de propagação do vírus *in vitro*. Inicialmente a proteína apresenta outra região hidrofóbica, também na extremidade C-terminal. Uma vez que, a tradução da poliproteína viral ocorre em associação com as membranas do retículo endoplasmático (RE), essa região parece atuar como peptídeo sinal para translocação da prM até o lúmen. Durante a maturação da proteína essa região é clivada pela NS2B-NS3 protease viral, antes da montagem do virion (MA et al., 2004; RICE et al., 1985; YAMSHCHIKOV; COMPANS, 1995; ZHU et al., 2007).

Estruturalmente as múltiplas cópias de C organizam-se em dímeros, sendo cada monômero formado por quatro alfa ( $\alpha$ ) hélices conectadas por *loops* (Figura 2a, primeira caixa). A disposição das hélices torna a distribuição das cargas altamente desuniforme em torno do dímero. Quase metade dos resíduos carregados encontram-se em uma borda exposta do dímero, que provavelmente interage com a molécula negativamente carregada de RNA. Em contrapartida a borda côncava oposta é altamente apolar e interage com a proteína de Membrana (M) viral (MA et al., 2004).

### 1.5.3 Proteína precursora de membrana

A próxima proteína traduzida a partir da ORF é a prM. Ela apresenta aproximadamente 18 kDa, 166 aminoácidos, e é a precursora

da proteína estrutural de membrana do vírus. A proteína sofre clivagem em sua região N-terminal para formar M, num processo associado à maturação e liberação do vírus, sendo que prM é normalmente encontrada em células infectadas e M somente nas formas extracelulares (CASTLE et al., 1985; CHAMBERS et al., 1990a; GUIRAKHOO; BOLIN; ROEHRIG, 1992; RICE et al., 1985).

A sequência de prM inicia com uma região de aminoácidos não carregados, que servem como sequência-sinal na extremidade N-terminal para inserção no RE. Esse domínio hidrofóbico pode ou não ser clivado por uma signalase, processo esse regulado pela disponibilidade de proteína E. Logo após esse domínio, prM apresenta uma região predominantemente hidrofílica, contendo seis resíduos conservados de cisteína, que participam na formação de uma ponte dissulfeto, e vários sítios de glicosilação do tipo Asn-X-Ser/Thr (LORENZ et al., 2002; NOWAK; WENGLER, 1987; RICE et al., 1985).

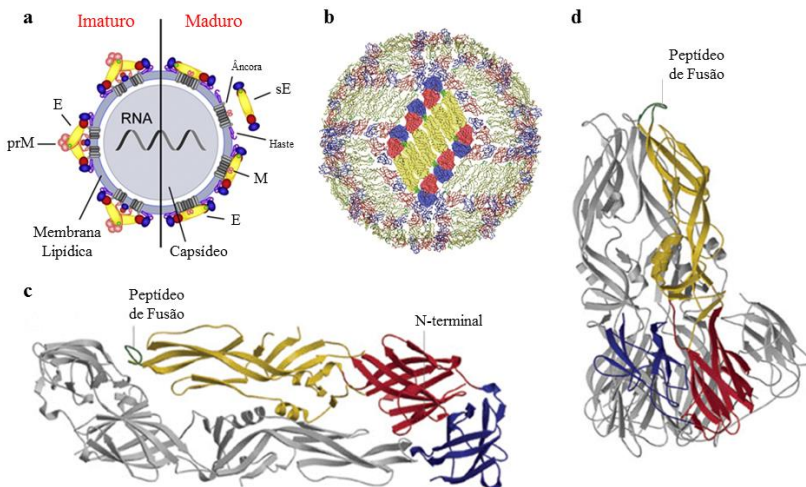
Nas partículas virais imaturas prM forma um heterodímero com E, de forma a impedir o rearranjo estrutural desta última para a forma fusogênica, o que poderia ser catalisado pelo potencial hidrogeniônico (pH) ácido, durante a passagem das partículas pelos compartimentos da via secretora do Golgi. A conversão em partículas maduras ocorre também nessa via e coincide com a clivagem de prM em pr e M por uma furina protease celular. Após a clivagem o heterodímero se dissocia, o fragmento pr (de 91 aminoácidos) é liberado, e E forma homodímeros. A porção M remanescente, presente nos virions maduros, contém apenas um ectodomínio curto (aminoácidos 92 a 130) e a região transmembranar da extremidade C-terminal (aminoácido 131 a 166). (CHAMBERS et al., 1990a; GUIRAKHOO; BOLIN; ROEHRIG, 1992; LORENZ et al., 2002; ZHANG et al., 2003a).

### 1.5.4 Envelope

A glicoproteína E é a maior proteína da superfície dos *Flavivirus* (com 54 kDa e 495 aminoácidos), e também a maior determinante antigênica das partículas virais. Ela desempenha um papel fundamental, mediando a ligação do virion ao receptor celular e a fusão à membrana do endossomo (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). Sua estrutura consiste de um ectodomínio N-terminal ou sE (porção solúvel de E); uma região em forma de haste, formada por duas  $\alpha$ -hélices conservadas; e um domínio transmembrana hidrofóbico C-terminal. Nos flavivírus, o envelope consiste de 180 cópias de E e 180 cópias de M ancoradas na bicamada lipídica de membrana. No DENV imaturo, essas

180 cópias de E estão organizadas em 60 heterotrímeros de prM-E, que formam espículas na superfície do virion (Figura 1a e 3a). Já nas partículas maduras, E organiza-se em 30 aglomerados de três homodímeros paralelos (Figura 1b e 3b). Cada monômero possui três domínios ricos em folhas beta ( $\beta$ ): domínio I (E-DI), domínio II (E-DII) e domínio III (E-DIII), demonstrados em destaque na Figura 3c (KUHN et al., 2002; ZHANG et al., 2003b).

Um barril beta, com oito fitas, forma a estrutura do primeiro domínio. Já E-DII é um domínio alongado, que se projeta ao longo da superfície do vírus, entre as regiões transmembrana das subunidades do homodímero. É formado por 12 fitas beta e duas alfa hélices. O último domínio, E-DIII, apresenta uma estrutura do tipo *IgC-like*, com 10 fitas beta. O peptídeo de fusão do vírus, que possibilita a fusão do envelope viral à membrana celular, é uma estrutura em forma de *loop* localizada na ponta de E-DII, distalmente à região transmembrana (Figura 3c). Além disso, E-DII é o domínio de dimerização da proteína e parece participar da ligação inicial a um receptor celular auxiliar. E-DIII está provavelmente envolvido na ligação ao receptor principal da célula e é o maior alvo para anticorpos neutralizantes (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007; LOK et al., 2008; MODIS et al., 2005).



**Figura 3** – Estrutura do virion e da proteína do Envelope. (a) Representação esquemática da partícula viral. Esquerda: virion imaturo; direita: virion maduro. O NC esférico é formado por múltiplas cópias de C, associadas ao RNA de fita simples. A superfície dos virions imaturos é irregular, contendo 60 espículas,



formadas pelos trimeros de prM-E. Após a clivagem proteolítica de prM, os monômeros de E se reorganizam, de maneira que a superfície dos virions maduros é regular e formada por 90 dímeros de E. (b) Esses dímeros agrupam-se de três em três paralelamente, formando 30 aglomerados; um deles destacado no centro do virion. (c) Conformação dimérica da proteína E (resíduos 1-395) nos virions maduros. (d) Conformação trimérica, pós-fusão da proteína E. Em (c) e (d) um dos monômeros e o peptídeo de fusão estão destacados, coloridos, em oposição aos demais em cinza. Para todas as figuras: E-DI está em vermelho; E-DII em amarelo; E-DIII em azul; Peptídeo de fusão em verde; e prM/M em rosa. Adaptado de: Heinz; Stiasny (2012), Mukhopadhyay; Kuhn; Rossmann (2005) e Zhang et al. (2004).

### 1.5.5. Proteína não estrutural 1

NS1 é a primeira proteína não estrutural no mapa linear dos DENV (Figura 2a). A sequência da proteína apresenta um alto grau de similaridade entre os flavivírus, com 1.056 nucleotídeos em comprimento, que codificam 352 aminoácidos (MACKOW et al., 1987). NS1 apresenta de 46 a 55 kDa (dependendo do seu nível de glicosilação), pode ser encontrada sob diferentes formas oligoméricas e em diferentes localizações celulares. Em células infectadas de mamíferos, NS1 é expressa na forma de monômeros. Durante a síntese a proteína é translocada pelo interior do RE onde é separada de E por uma signalase, e de NS2A por uma protease residente indeterminada, para então, organizar-se na forma de dímeros. A seguir NS1 é transportada até a superfície celular, onde pode permanecer associada à membrana, ou ser liberada para o meio extracelular sob uma forma hexamérica (FALGOUT; MARKOFF, 1995; FLAMAND et al., 1999; WESTAWAY; GOODMAN, 1987; WINKLER et al., 1988).

Tanto na forma intracelular, como na forma secretada, NS1 associa-se a lipídios. Dessa forma, os dímeros podem interagir com a membrana do RE em sítios onde ocorre a replicação viral. A proteína é considerada cofator essencial nesse processo, e diversos estudos têm demonstrado sua localização junto a RNA de fita dupla e outros componentes do complexo de replicação (GUTSCHE et al., 2011; LINDENBACH; RICE, 1997; MACKENZIE; JONES; YOUNG, 1996; MULLER; YOUNG, 2013). Por sua vez, as formas lipoproteicas associadas à membrana e secretadas são altamente imunogênicas, interagindo principalmente com componentes do sistema complemento e sistema imune adaptativo (AKEY et al., 2014; AVIRUTNAN et al., 2006, 2011; LIN et al., 2003). Depois de secretada, a proteína pode ser liberada na corrente sanguínea dos indivíduos infectados, e alcançar

concentrações tão altas quanto miligramas (mg) por mililitro (mL) no plasma, por essa razão NS1 é um importante marcador da infecção viral (YOUNG et al., 2000).

### **1.5.6 Proteínas não estruturais 2A e 2B**

NS2A é a primeira de quatro proteínas hidrofóbicas (NS2A, NS2B, NS4A e NS4B) encontradas na poliproteína viral (CHAMBERS et al., 1990a). Apresenta 24 kDa, e como mencionado anteriormente, tem sua extremidade N-terminal determinada pela clivagem através de uma protease indeterminada, residente do lúmen do RE (CHAMBERS; MCCOURT; RICE, 1989; FALGOUT; MARKOFF, 1995). A junção NS2A-NS2B é clivada pela serina protease viral NS2B-NS3 no citoplasma (CHAMBERS; MCCOURT; RICE, 1990).

Estudos envolvendo mutações na sequência de NS2A, em diferentes flavivírus, demonstraram que a proteína está envolvida tanto na montagem dos virions, quanto na replicação, interagindo com componentes do complexo replicativo (KÜMMERER; RICE, 2002; LEUNG et al., 2008; LIU; CHEN; KHROMYKH, 2003; MACKENZIE et al., 1998; XIE et al., 2013). Além disso, NS2A parece inibir a resposta imune mediada por interferon (IFN) do tipo I (MUÑOZ-JORDAN et al., 2003).

A outra proteína que integra a sub-região NS2 da poliproteína precursora viral é NS2B. Formada por apenas 130 aminoácidos, a proteína apresenta cerca de 14 kDa e é produzida através da clivagem pós-traducional de suas extremidades N- e C-terminal pelo complexo NS2B-NS3 (CHAMBERS; MCCOURT; RICE, 1989; PREUGSCHAT; YAO; STRAUSS, 1990). A proteína associa-se à membrana através de três domínios hidrofóbicos, dois localizados na região N-terminal e um na região C-terminal. Entre os dois domínios da região N-terminal há também um domínio hidrofílico, formado por 40 aminoácidos altamente conservados entre os flavivírus (CLUM; EBNER; PADMANABHAN, 1997). Através desses resíduos conservados NS2B associa-se com NS3 formando o complexo NS2B-NS3 serina protease, no qual atua como cofator (FALGOUT; MILLER; LAI, 1993; FALGOUT et al., 1991).

### **1.5.7 Proteína não estrutural 3**

Com cerca de 70 kDa e 618 aminoácidos, NS3 é a segunda maior proteína dos DENV. Trata-se de uma proteína multifuncional, com função serina protease, relacionada à região N-terminal, aliada a

funções de helicase e trifosfatase de sua porção C-terminal (CHAMBERS et al., 1990a; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007; LUO et al., 2008). A atividade protease de NS3 é atribuída a um domínio catalítico tipo tripsina, de 172 aminoácidos, localizado no terço amino-terminal da proteína. A atividade catalítica é dependente de pelo menos 40 resíduos de NS2B, com quem NS3 forma um complexo estável (CHAMBERS et al., 1990b; FALGOUT; MILLER; LAI, 1993; PREUGSCHAT; YAO; STRAUSS, 1990).

O complexo serina protease viral NS2B-NS3 reconhece preferencialmente sequências formadas por pares de resíduos básicos, circundados por aminoácidos de cadeias laterais curtas, clivando geralmente após argininas (CHAMBERS; MCCOURT; RICE, 1990; RICE et al., 1985). Esse tipo de clivagem, mediado por uma protease viral, juntamente àquele mediado por sinalases e furina, representam os três tipos de clivagem encontrados nos DENV (Figura 2b). O complexo NS2B-NS3, por sua vez, é responsável pela clivagem nas junções entre NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A e NS4B/NS5 (CHAMBERS et al., 1990b; CLUM; EBNER; PADMANABHAN, 1997; FALGOUT et al., 1991; PREUGSCHAT; YAO; STRAUSS, 1990); no interior de NS2A, NS3 e NS4A (ARIAS; PREUGSCHAT; STRAUSS, 1993; NESTOROWICZ; CHAMBERS; RICE, 1994; PREUGSCHAT; STRAUSS, 1991); e também entre C-prM (YAMSHCHIKOV; COMPANS, 1995).

A porção remanescente de NS3, que corresponde a aproximadamente 70% da proteína, está envolvida no processo de replicação viral. Especificamente, o domínio C-terminal apresenta funções de RNA helicase, 5' nucleosídeo trifosfatase (NTPase) e RNA 5' trifosfatase (RTPase). Essa estrutura pode ser dividida em três domínios catalíticos, I, II e III, dispostos consecutivamente da extremidade amino- para a carboxi-terminal. Sete motivos característicos das helicases da superfamília 2 estão presentes nos domínios I e II. Entre esses domínios está a porção NTPase da proteína. O último domínio, III, parece ligar-se a NS5 (GORBALENYA et al., 1989; JOHANSSON et al., 2001; WU et al., 2005; XU et al., 2005).

Como helicase, NS3 catalisa a separação entre a fita de RNA recém-formada e a fita-molde, na presença de cátions bivalentes e mediante hidrólise de um nucleosídeo trifosfato, usualmente adenosina trifosfato (ATP), como fonte de energia (MATUSAN et al., 2001; PAOLINI; DE FRANCESCO; GALLINARI, 2000). Por outro lado, um estudo recente demonstrou que NS3 pode também catalisar o anelamento de fitas de RNA complementares, de forma ATP-

independente (GEBHARD; KAUFMAN; GAMARNIK, 2012). Além de seu papel funcional, mutações no domínio helicase, acompanhadas de mutações em E, têm sido associadas à neurovirulência viral em modelo murino (BORDIGNON et al., 2007; DE BORBA et al., 2012).

### 1.5.8 Proteínas não estruturais 4A e 4B

NS4A e NS4B são proteínas transmembrana, altamente hidrofóbicas, com aproximadamente 16 e 27 kDa respectivamente. Os primeiros resíduos de NS4A aparentemente não interagem com a membrana e parecem funcionar como cofator de NS3. Em seguida há três regiões hidrofóbicas associadas à membrana, e um pequeno *loop* que expõe o sítio de clivagem NS4A-2k para a sinalase celular. A região C-terminal é formada pelo fragmento 2k, que atua como sequência sinal para a translocação de NS4B para o lúmen do RE (MILLER et al., 2007; NEMÉSIO; PALOMARES-JEREZ; VILLALAÍN, 2012; SHIRYAEV et al., 2009). NS4B, por sua vez, parece ter dois segmentos hidrofóbicos, que se associam à membrana no lúmen do RE; e três segmentos transmembrana na extremidade C-terminal (MILLER; SPARACIO; BARTENSCHLAGER, 2006).

As duas proteínas estão envolvidas com o processo de replicação viral, fato esse reforçado pela presença delas junto à componentes do complexo de replicação e membranas derivadas do RE em experimentos de colocalização (LINDENBACH; RICE, 1999; MILLER; SPARACIO; BARTENSCHLAGER, 2006; MILLER et al., 2007). Além de atuar como cofator de NS3, regulando a atividade ATPase, NS4A, juntamente a outras proteínas virais e do hospedeiro, participa do rearranjo estrutural da membrana, processo essencial para a replicação (ROOSEENDAAL et al., 2006; SHIRYAEV et al., 2009). Quanto à NS4B, estudos *in vitro* demonstram que ela pode também atuar como modulador da replicação viral, através de uma interação com NS3. Nesse caso, NS4B atuaria dissociando NS3 das fitas simples de RNA e, consequentemente, aumentaria a sua atividade helicase, uma vez que disponibiliza a enzima para a ligação com outra fita dupla de RNA (UMAREDDY et al., 2006).

### 1.5.9 Proteína não estrutural 5

NS5 é a maior (900 aminoácidos e aproximadamente 103 kDa nos DENV) e também a mais conservada proteína dos Flavivírus. Trata-se de uma proteína multifuncional, com atividade de metiltransferase

(MTase) na sua porção N-terminal, e RNA polimerase dependente de RNA (RdRP, do inglês *RNA-dependent RNA polymerase*) na sua extremidade C-terminal (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007; MANDL et al., 1989).

Como MTase, NS5 está envolvida em dois dos quatro passos que levam a formação do *cap* no RNA viral. Mais especificamente, a proteína atua metilando o *cap*, na posição da guanina-N7 e adenosina-2' O (GpppA → m(7)GpppA → m(7)GpppAm), através da transferência de grupos metil de um S-adenosil-L-metionina (RAY et al., 2006). Já a porção com atividade RdRP, liga-se especificamente ao genoma viral através da interação com um elemento promotor *stem-loop A* (SLA), localizado na extremidade 5'. A ligação a SLA marca o início da replicação do RNA viral. É a partir dele que a polimerase inicia a extensão dos cerca de 11.000 nucleotídeos, até a extremidade 3'.

## 1.6 O CICLO VIRAL

O ciclo dos DENV no hospedeiro humano inicia com a inoculação do vírus através da picada do mosquito infectado. Primeiramente, a partir do local da inoculação, o vírus infecta células de Langerhans e dendríticas imaturas na epiderme e derme, onde ocorre a primeira série de replicações (WU et al., 2000). Em seguida, essas células infectadas migram para os linfonodos drenantes, onde monócitos e macrófagos recrutados tornam-se alvos da infecção. Essa segunda série replicativa amplifica a progênie viral e dá origem ao estado virêmico, no qual o vírus espalha-se pela corrente sanguínea e linfática através da infecção de células mononucleares e, finalmente, por diversos órgãos (JESSIE et al., 2004; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009; WU et al., 2000).

Apesar de células dendríticas, monócitos e macrófagos desempenharem o papel principal na infecção e replicação dos DENV, estudos têm demonstrado outras células como alvos em potencial. São exemplos: linfócitos B e T (LIN et al., 2002; MENTOR; KURANE, 1997), hepatócitos (SUKSANPAISAN; CABRERA-HERNANDEZ; SMITH, 2007), células endoteliais (WEI et al., 2003), queratinócitos (SURASOMBATPATTANA et al., 2011) e fibroblastos (KURANE; JANUS; ENNIS, 1992). Quanto à dispersão, antígenos dos DENV foram encontrados em diversos órgãos e tecidos humanos naturalmente infectados, como fígado, baço, pulmão, rim, entre outros (JESSIE et al., 2004; KILLEN; O'SULLIVAN, 1993).

A entrada dos DENV nas células-alvo se dá por endocitose mediada pela interação entre a glicoproteína E viral e receptores celulares de superfície. As porções de E envolvidas na adsorção ainda não foram completamente determinadas, porém as evidências sugerem que a ligação se dê ao nível de E-DIII (CHEN et al., 1997; CRILL; ROHRIG, 2001).

Os receptores envolvidos na infecção em humanos também não estão bem definidos e, uma vez que os DENV infectam diferentes tipos celulares, os receptores podem diferir entre as células-alvo. São sugeridos como receptores primários: DC-SIGN (do inglês *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) (NAVARRO-SANCHEZ et al., 2003; TASSANEETRITHEP et al., 2003); a proteína regulada pela glicose-78 ou GRP78 (do inglês *glucose-regulating protein 78*) (JINDADAMRONGWECH; THEPPARIT; SMITH, 2004); o receptor de manose (MILLER et al., 2008); moléculas associadas a CD14 (CHEN; WANG; KING, 1999); entre outros. Além disso, a infecção parece depender da interação com receptores auxiliares como o heparan sulfato e outros glicosaminoglicanos (CHEN et al., 1997).

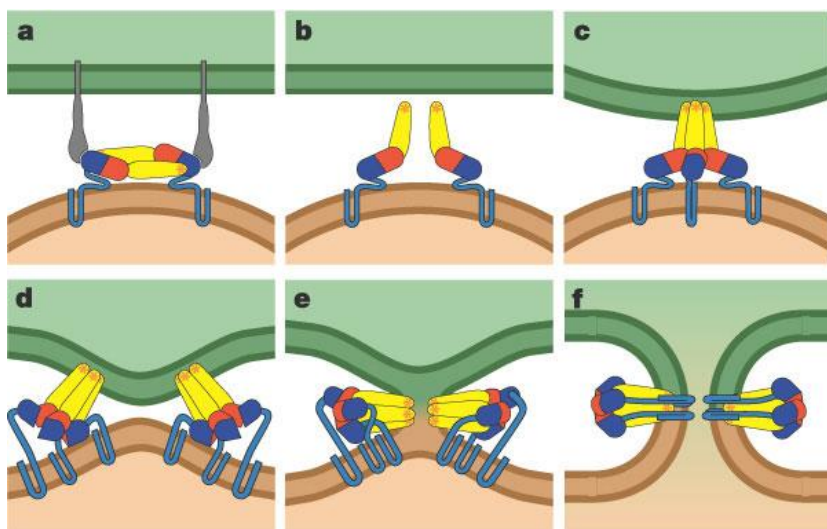
Além da adsorção via interação proteína E-receptor, os flavivírus podem também infectar monócitos e macrófagos quando complexados a anticorpos não neutralizantes. Nesse caso, o complexo vírus-anticorpo interage com receptores do tipo FcγR que reconhecem regiões constantes nas imunoglobulinas tipo G (IgG) (BALSITIS et al., 2010).

Uma vez que a ligação ao receptor celular ocorre, as partículas virais são internalizadas através da formação de vesículas endocíticas recobertas por clatrina. Esses endossomos precoces são liberados no citoplasma, sofrem uma acidificação, e maturam em endossomos tardios onde a fusão das membranas ocorre (VAN DER SCHAAR et al., 2008). Em oposição à via clássica de internalização, um estudo de Acosta, Castilla e Damonte (2009) demonstrou que a infecção de células Vero por DENV-2, mas não por DENV-1, ocorre de forma independente de clatrina e caveolina.

Seja qual for a via de internalização adotada, o ciclo viral segue com as partículas virais nos endossomos. À medida que essas vesículas amadurecem, o pH em seu interior diminui, o que desencadeia uma série de alterações conformacionais na proteína E, culminando com a fusão das membranas celular e viral e liberação do RNA viral no citoplasma (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

A proteína do envelope dos DENV é classificada como uma proteína de fusão de classe II, organizada em homodímeros nas partículas virais maduras, com seu peptídeo de fusão hidrofóbico no topo de E-DII. Esses homodímeros de E se dissociam quando da acidificação do meio em monômeros, para então associarem-se novamente como homotrímeros (Figura 3d). Os três domínios de E mantêm seu dobramento praticamente inalterado durante esse processo, sendo que as maiores mudanças se dão ao nível das orientações de cada um deles, por meio da flexão das regiões de ligação interdomínios. A transição para o estado de homotrímeros é irreversível, uma vez que, o número de interações polares e apolares entre os monômeros nesse estado é muito maior do que no estado dimérico (ALLISON et al., 1995; MODIS et al., 2004; STIASNY; HEINZ, 2006; STIASNY et al., 2002).

Durante a transição entre dímeros e trímeros, os peptídeos de fusão antes crípticos tornam-se expostos, e passam a ocupar o topo do trímero (Figura 3d). Os três *loops* formam então uma espécie de “âncora aromática” (os aminoácidos triptofano-101 e fenilalanina-108 estão presentes), que se insere na membrana celular, e interage com a região haste de E, possibilitando a aproximação entre as membranas e a fusão, detalhada na Figura 4 (ALLISON et al., 1995; MODIS et al., 2003, 2004).



**Figura 4** – Mecanismo de fusão proposto para proteínas de fusão classe II. Através da adsorção e internalização via endossomos (a), os virions são expostos a uma redução de pH. Isso induz o dobramento de E-DII, de forma que

o domínio projeta-se externamente à superfície do virion, expondo o peptídeo de fusão e permitindo o rearranjo dos monômeros lateralmente no plano da membrana viral (b). Em seguida, o peptídeo de fusão insere-se na camada de hidrocarbonetos da membrana da célula, promovendo a formação do trímero (c). A partir daí, formam-se inúmeras interações polares e apolares entre os monômeros do trímero, que se difundem desde o peptídeo de fusão até a base. A etapa seguinte é mediada pelo deslocamento e giro de E-DIII, o que cria novas interações no trímero e promove o dobramento da porção C-terminal de E através do peptídeo de fusão. A energia liberada nesse processo possibilita a formação de uma curvatura das membranas e, conseqüentemente uma aproximação entre elas (d). Por fim, a criação de novos contatos entre a região “haste-âncora” e E-DII leva a um estado de “hemifusão” e, finalmente, a formação de um poro lipídico de fusão (f). Padrão de cores: E-DI está em vermelho; E-DII em amarelo; E-DIII em azul; Peptídeo de fusão em laranja; região da haste e âncora em azul claro; membrana viral e do endossomo em marrom e verde, respectivamente. Adaptado de Modis et al. (2004).

Como resultado do processo de fusão, o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma, e o RNA é desnudado, ficando disponível para a replicação. Primeiramente, o RNA genômico é utilizado como molde para síntese de uma fita de RNA senso negativo, que servirá então de molde para síntese de múltiplas fitas positivas. Essas novas fitas senso positivo podem ser usadas como mRNAs na tradução das proteínas virais, para síntese de novas fitas senso negativas, ou ainda, se associar às proteínas estruturais na montagem de novos virions (ALCARAZ-ESTRADA; YOCUPICIO-MONROY; DEL ANGEL, 2010; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

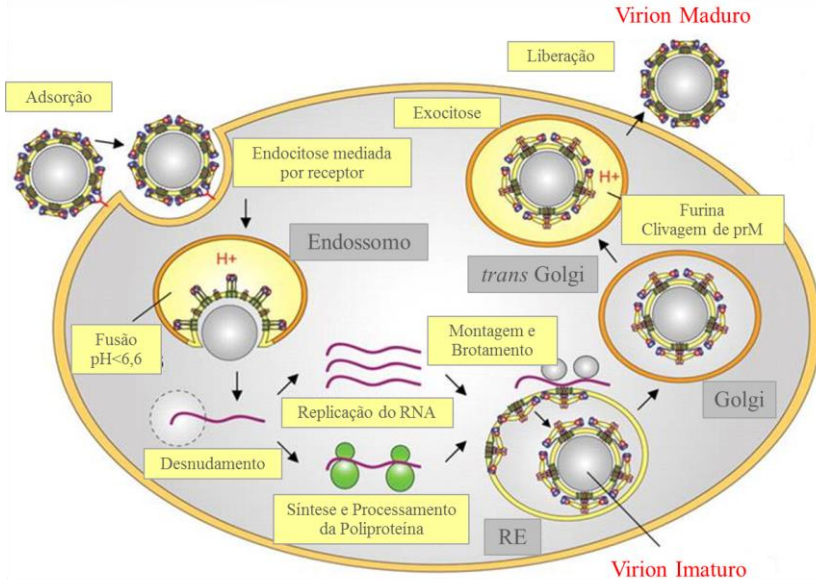
Uma vez que, o RNA viral pode atuar como mRNA, o genoma associa-se ao RE rugoso (RER), onde a tradução ocorre. Para que isso seja possível, várias mudanças são observadas nas estruturas membranares do retículo, que proporcionam a formação do microambiente ideal para os componentes do complexo replicativo (MACKENZIE; WESTAWAY, 2001; UCHIL; SATCHIDANANDAM, 2003). A associação do complexo às membranas é mantida principalmente através das interações envolvendo as pequenas proteínas hidrofóbicas não estruturais (ver itens 1.4.6 e 1.4.8).

Assim como a replicação e tradução, a montagem dos virions também ocorre em associação com as membranas intracelulares. Inicialmente múltiplas cópias de C altamente básicas interagem com uma única cópia de RNA genômico no citoplasma, para formar o nucleocapsídeo. Em seguida, num processo rápido e coordenado, as partículas adquirem o envelope a partir do brotamento para o lúmen do



RER (Figura 5) (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007; LORENZ et al., 2002; MACKENZIE; WESTAWAY, 2001). Como anteriormente mencionado, as proteínas E e prM são sintetizadas juntas e permanecem integradas às membranas do retículo através de âncoras transmembrana da região C-terminal.

Os virions no lúmen do RER são partículas imaturas, de superfície irregular, com 60 projeções formadas pelos heterotrímeros de prM-E. Nessas projeções, as três subunidades de prM recobrem os peptídeos de fusão localizados no topo das subunidades de E (LORENZ et al., 2002; ZHANG et al., 2003b). Após montadas, essas partículas são transportadas individualmente até o complexo de Golgi, através de vesículas (MACKENZIE; WESTAWAY, 2001). A maturação das partículas virais ocorre na rede *trans*-Golgi, em duas etapas. Primeiramente, a redução do pH induz uma mudança conformacional irreversível nas proteínas prM e E. Em seguida uma protease residente, furina, cliva o peptídeo pr, liberando M. Essa clivagem gera uma desorganização do heterotrímero, e permite a reorganização de E em 90 homodímeros, que formam a superfície esférica e regular das partículas virais maduras (STADLER et al., 1997; YU et al., 2008a; ZHANG et al., 2004). Finalmente, os virions maduros percorrem a via secretora do Golgi, acumulam-se no compartimento endossomal e são liberados da célula por exocitose (MACKENZIE; WESTAWAY, 2001).



**Figura 5** – O ciclo viral. Após a adsorção, mediada pela ligação do vírus ao receptor celular, os virions são internalizados. O pH ácido no interior do endossomo induz um rearranjo estrutural de E (como detalhado na Figura 4), que possibilita a fusão das membranas. O NC é então liberado no citoplasma, onde ocorre o desnudamento. Em seguida, o RNA viral é replicado, traduzido e a poliproteína viral processada. A montagem ocorre no interior do RE, de onde os virions brotam na forma de partículas virais imaturas. Essas partículas são transportadas individualmente até o Golgi, no interior de vesículas. No *trans*-Golgi a exposição dos virions a um pH ácido promove uma alteração conformacional irreversível do complexo prM-E, expondo o sítio de clivagem para a furina protease celular. Após a clivagem de pr, a proteína E reorganiza-se em dímeros, dando origem aos virions maduros, que são liberados para o meio extracelular por exocitose. O padrão de cores adotado é o mesmo da Figura 3. Adaptado de: Stiasny; Heinz (2006).

## 1.7 IMUNOPATOLOGIA

### 1.7.1 Reposta imune mediada por anticorpos

A resposta imune à infecção pelos DENV está envolvida tanto na proteção, quanto no desenvolvimento da doença em humanos. A resposta humoral efetora é normalmente mediada pela produção de anticorpos neutralizantes, e aquela associada à doença, por anticorpos

não neutralizantes e com reatividade cruzada entre os sorotipos virais (ROTHMAN, 2011). Os principais alvos da resposta imune humoral são as proteínas E, prM e NS1, mas anticorpos anti-C, anti-NS5 e anti-NS3 também são por vezes detectados (LAI et al., 2008; VALDÉS et al., 2000).

A proteína do envelope é a maior determinante antigênica das partículas virais e também o principal alvo para ambos os tipos de anticorpos. Os epítomos estão distribuídos por todos os três domínios, mas apresentam diferentes graus de acessibilidade à ligação dos anticorpos de acordo com o estado conformacional da proteína (DE ALWIS et al., 2012; HEINZ; STIASNY, 2012; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

Embora tenham sido encontrados epítomos para anticorpos neutralizantes agrupados na ponta de E-DII, na região da dobradiça entre E-DI e E-DII de *West Nile Virus* (WNV), a maioria dos anticorpos produzidos contra os domínios I e II de DENV apresentam reatividade cruzada e não são neutralizantes (OLIPHANT et al., 2006; ROTHMAN, 2011). A região do peptídeo de fusão do vírus, por exemplo, por ser altamente conservada entre os sorotipos, é usualmente alvo de anticorpos com reatividade cruzada entre os DENV e outros flavivírus. No entanto, uma vez que seus epítomos estão praticamente inacessíveis nas partículas virais maduras, esses anticorpos se ligam com baixa avidéz e apresentam baixa atividade neutralizante (CHERRIER et al., 2009; CRILL et al., 2009; LAI et al., 2008; SUKUPOLVI-PETTY et al., 2010).

Por outro lado, os epítomos da superfície lateral de E-DIII são os principais alvos para anticorpos neutralizantes nos DENV. E, uma vez que, este é o domínio com menor grau de conservação, os anticorpos são em sua maioria sorotipo-específicos. Ainda que, os anti-E-DIII representem a menor fração de anticorpos produzidos na resposta humoral global anti-DENV, a concentração deles parece correlacionar-se positivamente com a potência de neutralização de amostras de soro humano (CRILL et al., 2009; WAHALA et al., 2009).

Anticorpos específicos para as proteínas prM e NS1 têm sido encontrados principalmente em infecções secundárias, e geralmente apresentam alto grau de reatividade cruzada (LAI et al., 2008; VALDÉS et al., 2000). Os anti-prM reagem com partículas virais imaturas ou semimaduras, uma vez que a clivagem incompleta de prM parece ser um evento comum nos DENV (DEJNIRATTISAI et al., 2010). Já os anti-NS1, podem reagir contra a proteína associada à membrana das células infectadas, ou a forma multimérica secretada. No primeiro caso, esses

anticorpos podem ter um efeito protetor, direcionando a lise das células infectadas através do complemento (EDELING; DIAMOND; FREMONT, 2014; SCHLESINGER; BRANDRISS; WALSH, 1987). Mas a maioria dos estudos relata os efeitos deletérios dos anti-NS1, ou aumentando a ativação do complemento mediada pela própria proteína (AVIRUTNAN et al., 2006), ou pela reatividade cruzada com autoantígenos do hospedeiro, principalmente nas células endoteliais e plaquetas, o que pode estar relacionado com os danos vasculares da dengue hemorrágica (CHANG et al., 2002; FALCONAR, 1997; LIN et al., 2001, 2003).

A neutralização de infecções causadas pelos flavivírus pode ocorrer através de dois mecanismos conhecidos: inibição da ligação aos receptores celulares ou inibição da fusão (TEOH et al., 2012; THULLIER et al., 2001; VOGT et al., 2009). Esse evento parece ser determinado por pelo menos três fatores principais: afinidade e concentração dos anticorpos produzidos, e a acessibilidade aos epítomos. Pierson *et al.* (2007), estudando diferentes anticorpos anti-E de WNV, determinou o nível mínimo de ocupação dos epítomos que proporcionava neutralização. De acordo com seus resultados, para que a infecção fosse bloqueada, pelo menos 30 das 180 subunidades de E deviam estar ligadas a anticorpos, isso considerando os anticorpos monoclonais com a atividade neutralizante mais potente. Já aqueles pouco neutralizantes, que reconhecem poucos sítios na superfície do virion, precisavam ocupar um número bem maior de subunidades. No entanto, quando abaixo da concentração mínima requerida, mesmo os potentes anticorpos neutralizantes desencadearam o fenômeno de “aumento da infectividade dependente de anticorpos” ou ADE (do inglês *Antibody Dependent Enhancement*).

Assim como o WNV, os DENV também podem induzir ADE, estando essa associada às manifestações clínicas mais graves da doença. O fenômeno é mediado principalmente por anticorpos não neutralizantes específicos para as proteínas E e prM (DEJNIRATTISAI et al., 2010). Nesse caso os anticorpos ligam-se ao virion, e como não há neutralização, formam-se imunocomplexos capazes de interagir com receptores celulares do tipo Fc. O aumento da infectividade ocorre, uma vez que, a ligação a esses receptores favorece a internalização dos virions nas células hospedeiras, podendo ser até mais eficiente que aquela mediada pelos receptores usuais (BALSITIS et al., 2010; PIERSON et al., 2007).

Embora a infecção por DENV induza uma eficiente e duradoura imunidade contra reinfecções por vírus do mesmo sorotipo (infecções

homotípicas) (SABIN, 1952), a ocorrência de ADE está comumente relacionada aos casos de infecções secundárias heterotípicas, nas quais os indivíduos são infectados com um sorotipo diferente do primeiro. Nesses casos, num fenômeno denominado de “pecado antigênico inicial”, as células B e T de memória produzidas a partir da primeira exposição respondem mais rapidamente que as células *naive*. No entanto, como os sorotipos virais podem ser muito diversos em sequência, essas células podem não apresentar a especificidade e avidéz ideal aos antígenos do segundo sorotipo. Assim sendo, há uma produção mais rápida, e com títulos mais elevados, de anticorpos contra o primeiro sorotipo, com reatividade cruzada para o segundo, mas que são geralmente pouco ou não neutralizantes (MATHEW et al., 2011; MIDGLEY et al., 2011; ROTHMAN, 2011).

Além do agravamento da doença em pacientes infectados, a ocorrência de ADE é também um fator limitante para o desenvolvimento de vacinas e imunoterapias. Nesse contexto, e ainda, na tentativa de prevenir a evasão viral via variação antigênica, vários trabalhos têm demonstrado a existência de anticorpos multineutralizantes anti-dengue. Comum a esses anticorpos está o fato de que os epítomos aos quais eles se ligam são comumente crípticos, estão localizados em regiões conservadas e que retém função estrutural como o peptídeo de fusão e outras regiões em E-DII (COSTIN et al., 2013; DENG et al., 2011; SMITH et al., 2013), em E-DI (COCKBURN et al., 2012), na região da dobradiça E-DI / E-DII (DE ALWIS et al., 2012), e E-DIII (COCKBURN et al., 2012b).

### **1.7.2 Resposta imune mediada por células, citocinas e complemento**

Assim como a resposta humoral, a resposta imune celular aos DENV está tanto envolvida no controle da viremia e proteção, como nos eventos relacionados à doença. Os mecanismos envolvidos em cada um desses processos, principalmente aqueles relacionados à proteção, não são bem entendidos, em parte devido à inexistência de bons modelos animais para estudo que reproduzam a doença (ROTHMAN, 2011).

Como mencionado anteriormente, depois de infectadas pelos DENV, as células dendríticas imaturas migram até os linfonodos drenantes. Nos linfonodos essas células podem diferenciar-se em células dendríticas maduras, processar, e apresentar os antígenos virais, através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) de classe I e II, para as células T. Essas células, por sua vez, respondem ao estímulo através de diversas funções

efetoras, como proliferação, lise das células infectadas e produção de citocinas (ROTHMAN, 2011). Todavia, foi demonstrado que células dendríticas infectadas com DENV podem apresentar uma falha no processo de maturação, com menor expressão de moléculas coestimulatórias e de MHC, o que reduziria sua capacidade de apresentação de antígeno para as células T. Além disso, essas células dendríticas tendem a ser apoptóticas e respondem mal quando estimuladas pelo fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *Tumor Necrosis Factor*)  $\alpha$ . Uma vez que, esse processo impacta significativamente a imunidade celular, tem-se sugerido que se trata de um mecanismo de evasão viral (DEJNIRATTISAI; DUANGCHINDA, 2008; PALMER et al., 2005).

Os epítomos para ambos os tipos de células T são encontrados por toda poliproteína viral, no entanto a maioria deles localiza-se em NS3. Uma vez que eles sejam apresentados, as células T são ativadas, e respondem com a lise das células infectadas e/ou produção de diversas citocinas, como TNF, IFN gama ( $-\gamma$ ) e CCL4 (*Chemokine (C-C motif) ligand 4*), por exemplo. No entanto, durante as infecções primárias e secundárias por DENV, as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, (CD, do inglês *Cluster of Differentiation*) encontradas no soro apresentam, em sua maioria, reatividade cruzada entre sorotipos virais e, como as células B, estão sujeitas ao fenômeno de “pecado antigênico original” quando da ocorrência de infecções secundárias heterotípicas (DUANGCHINDA et al., 2010; FRIBERG et al., 2011a; MONGKOLSAPAYA et al., 2003). Assim sendo, as células T específicas para um sorotipo podem interagir, com peptídeos variantes de outro sorotipo. Essa interação altera a resposta funcional dessas células, enviesando a produção de certas citocinas, numa ordem “hierárquica”, em detrimento de outras (FRIBERG et al., 2011b). Nesse contexto, dados de Friberg et al. (2011b) demonstram que das células T, que respondem quando estimuladas com peptídeos heterólogos, a maioria produz principalmente CCL4, poucas produzem CCL4 e CD107a (usado como marcador de degranulação), e menos ainda produzem CCL4, CD107a e TNF $\alpha$ ; não foram detectadas células produzindo IFN- $\gamma$ . Acredita-se atualmente que a massiva ativação das células T leva à produção de uma “tempestade de citocinas” e outras moléculas inflamatórias. O ambiente altamente pró-inflamatório resultante seria o responsável por aumentar a permeabilidade no endotélio vascular, com perda de fluídos e proteína, associados aos casos de DHF e DSS (PANG; CARDOSA; GUZMAN, 2007).

Por outro lado, o desenvolvimento da doença em humanos também estaria relacionado a um mecanismo de evasão da resposta imune inata que os DENV desenvolveram. Várias de suas proteínas atuam inibindo e degradando moléculas das cascatas de síntese e sinalização de IFNs do tipo I. São exemplos, o complexo NS2B-NS3 na clivagem de STING (*Stimulator of Interferon Genes*), e NS5 na degradação de STAT2 (*Signal transducer and activator of transcription 2*) (AGUIRRE et al., 2012; ASHOUR et al., 2009; MORRISON et al., 2013; MUÑOZ-JORDAN et al., 2003; RODRIGUEZ-MADOZ et al., 2010).

A respeito do papel protetor mediado pelas células T e suas citocinas muito pouco foi elucidado. Todavia em um estudo de Yauch et. al. (2009), usando uma cepa adaptada a camundongos de DENV-2 (S221), e camundongos  $IFN-\alpha/\beta R^{-/-}$ , demonstrou o papel protetor das células  $CD8^{+}$  na infecção primária por DENV-2. Essas células demonstraram atividade citotóxica *in vivo*, e na sua ausência os autores observaram um aumento na replicação viral. Além disso, a imunização dos animais com epítomos dominantes para células  $CD8^{+}$  aumentou o *clearance* viral após a infecção.

Mais tarde, o mesmo grupo, usando o mesmo modelo, demonstrou que células T  $CD4^{+}$  específicas para DENV expressam  $IFN-\gamma$ , TNF, Interleucina-2 e CD40L e são capazes de lisar células infectadas, no entanto a depleção delas não afeta a resposta mediada por células T  $CD8^{+}$  ou por anticorpos neutralizantes. Também no caso da imunização dos animais com epítomos para células T  $CD4^{+}$ , os autores observaram um aumento no *clearance* viral após o desafio (YAUCH et al., 2010).

Outro estudo, envolvendo o teste de uma vacina tetravalente, no qual os voluntários eram primeiramente imunizados e, então desafiados com DENV-1 ou DENV-3, demonstrou o possível papel protetor do  $IFN-\gamma$  na fase aguda da doença. A porcentagem de células T  $CD8^{+}$ , produzindo  $IFN-\gamma$  sete dias após o desafio aumentou e permaneceu constante naqueles indivíduos protegidos da doença. No mesmo período, não foram detectadas células  $CD8^{+}$  produzindo interferon nos indivíduos que adoeceram, sendo que nesses casos a produção de  $IFN-\gamma$  retornou os níveis pré-desafio 14 dias após (GUNTHER et al., 2011).

A ativação do sistema complemento também tem sido considerada um fator importante no desenvolvimento dos casos mais graves da doença. Ela ocorre majoritariamente em resposta à proteína NS1, na sua forma solúvel ou associada às membranas celulares. A ativação pode ser aumentada quando na presença de anticorpos anti-NS1

e, especificamente, quando junto das superfícies endoteliais, parece contribuir para o extravasamento de fluídos dos vasos. Corroborando essas sugestões, grandes quantidades de NS1, anafilatoxina C5a e do complexo SC5b-9 foram encontradas no fluído pleural de pacientes com DSS (AVIRUTNAN et al., 2006; FALCONAR, 1997).

## 1.8 PAPEL DA PROTEÍNA “E” NA INFECTIVIDADE VIRAL

A importância da proteína do envelope fica evidente dado que ela está envolvida nos dois principais processos que determinam a infecção dos DENV: ligação ao receptor celular e fusão. Ainda mais, se considerarmos que é a inibição desses processos que possibilita a neutralização dos virions. No entanto, apesar de muitas estruturas de E, em diferentes estágios de maturação, já estarem disponíveis, pouco se sabe a respeito dos resíduos críticos no desempenho dessas funções.

Vários estudos demonstraram que mutações na proteína têm impacto negativo na infectividade (BUTRAPET et al., 2011; CHRISTIAN et al., 2013; HUANG et al., 2010; KROSCHEWSKI; SAGRIPANTI; DAVIDSON, 2009), restringem o crescimento do vírus *in vitro* e reduzem a neurovirulência viral (HIRAMATSU et al., 1996; PRYOR et al., 1998). Além disso, a inibição da infectividade viral tem sido descrita pelo uso de várias moléculas e peptídeos que atuam ou ligam-se à E (ALHOOT et al., 2013; KATO et al., 2010; SCHMIDT; YANG; HARRISON, 2010; SCHMIDT et al., 2012), e pelo uso de anticorpos multineutralizantes (como descrito no item 1.6.1.1).

Baseado nessas evidências, a identificação dos “aminoácidos críticos” na proteína do envelope, que não podem ser alterados sem perda da infectividade, pode ter um grande impacto no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e vacinas. Além disso, como a proteína E consiste no principal alvo para anticorpos neutralizantes, multineutralizantes, e não neutralizantes, o estudo da interação destes com os vários peptídeos que compõe a proteína é de fundamental importância para determinar o papel de cada uma destas regiões tanto na resposta imune efetora, quanto no desenvolvimento da ADE.

Nesse contexto, utilizando análises de bioinformática estrutural, e procurando por regiões da proteína que pudessem ser alvo de anticorpos multineutralizantes, nosso grupo identificou a presença de dois peptídeos conservados na estrutura de todos os quatro sorotipos virais. Ambos estão localizados no E-DII. O primeiro é o peptídeo de fusão do vírus, o qual apresenta função bem definida como relatado nessa revisão. O segundo, que denominamos “E<sub>250-270</sub>”, possui 21



aminoácidos e constitui a maior porção conservada da proteína E entre os quatro sorotipos. Devido à escassez de informações acerca de E<sub>250-270</sub>, ele foi objeto de estudo neste trabalho, **sob a hipótese de que mutações em sua sequência diminuem a infectividade viral.**



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel de E<sub>250-270</sub> na infectividade dos DENV, através da síntese de vírus recombinantes mutantes.

### 2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar sistematicamente a conservação de E<sub>250-270</sub> nos *Dengue virus*
2. Gerar mutações na sequência que codifica o E<sub>250-270</sub> em um clone infeccioso do DENV1-BR/90;
3. Verificar a replicação e o potencial infeccioso dos clones construídos em células de humanos e insetos;



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

O peptídeo de fusão e E<sub>250-270</sub> foram identificados a partir do alinhamento (utilizando *ClustalW2*, parâmetros padrão) de sequências da proteína E dos quatro sorotipos virais (números de acesso no *GenBank*: AAW23164.1 para DENV-1, AAC59275.1 para DENV-2, BAD42418.1 para DENV-3 e BAC77238.1 para DENV-4).

Com intuito de comparar o grau de conservação de E<sub>250-270</sub> com o restante da proteína E, e com a poliproteína como um todo, nós avaliamos o grau de conservação de cada aminoácido em 480 sequências de DENV, 120 de cada sorotipo, aleatoriamente sorteadas. A quantidade de genomas analisados foi limitada pelo número de sequências disponíveis para DENV-4 no *GenBank*.

Para tal, em colaboração com o Dr. Francisco Lobo, da Embrapa Informática Agropecuária, as sequências proteicas codificadas por estes genomas foram alinhadas utilizando o programa MUSCLE (EDGAR, 2004), com parâmetros-padrão. O arquivo *fasta* resultante foi analisado em um programa escrito na linguagem *Perl*. Este programa calcula, para cada posição do alinhamento, o aminoácido (ou *gap*) mais presente, e a frequência do mesmo. Os dados de frequência foram plotados nos gráficos utilizando o ambiente estatístico R. O *script* em *Perl* e os comandos em R estão disponíveis mediante solicitação ao autor.

#### 3.2 SELEÇÃO DAS MUTAÇÕES

Para estudar a função do conservado peptídeo E<sub>250-270</sub> no contexto da infecção buscamos alterar suas propriedades bioquímicas através da substituição das cadeias laterais de aminoácidos selecionados. Para tal, dispomos da estrutura cristalizada da proteína do envelope (*Protein Data Bank* (PDB) código: 1TG8 e 1OK8), o que nos permitiu desenhar essas mutações com o mínimo de impacto na estrutura geral da proteína. Para avaliar e quantificar se cada aminoácido tinha suas cadeias laterais acessíveis na superfície da estrutura tridimensional da proteína utilizamos o *software* ASA (<http://www.netasa.org/asaview/>). Os resíduos que tiveram mais de 50% de acessibilidade na superfície da molécula, e ainda, considerando-se a distribuição de cargas dessa região da proteína (avaliada pelo *software* *Pymol*: <http://www.pymol.org/>), foram escolhidos para as mutações. Essas análises, a seleção das

mutações, e a modelagem dos mutantes foram feitas em colaboração com o Dr. Brian Ferguson, da *University of Cambridge*.

Outras mutações foram propostas a partir de um alinhamento da sequência aminoacídica de E<sub>250-270</sub> do DENV1-BR/90 (*GenBank*: AAN60367.2) com outros flavivírus. Foram comparadas as sequências de cepas de *Yellow fever virus* (YFV - *GenBank*: AAX47569.1), *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV - *GenBank*: CAA54069.1), *West Nile virus* (WNV - *GenBank*: ABZ10679.1) e *Japanese encephalitis virus* (JEV - *GenBank*: ADN27988.1).

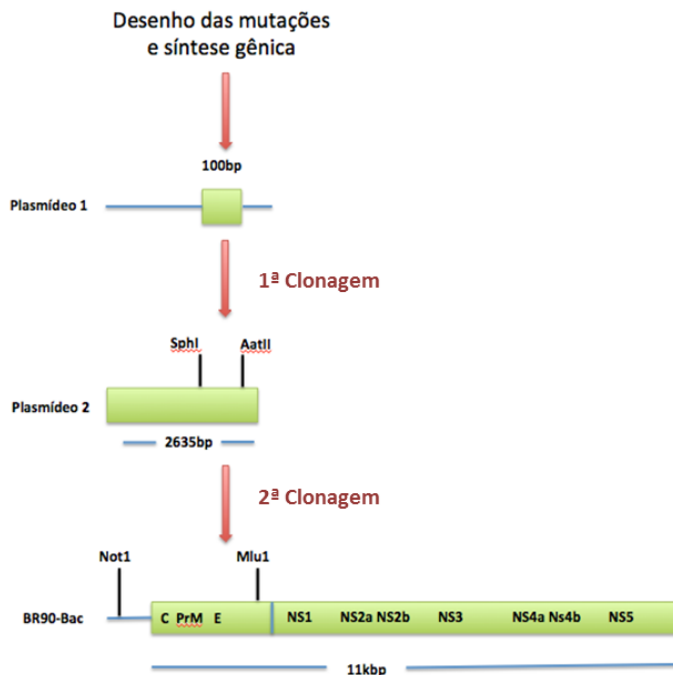
Ao todo foram selecionados 14 mutantes (denominados Mutante A a O). O efeito das mutações de cada um dos resíduos individualmente (na estrutura secundária da proteína, estabilidade, acessibilidade ao solvente e na formação de pontes de hidrogênio) foi avaliado através do *software* *SDM/Mordred*, utilizando parâmetros padrão (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~sdm/sdm.php>).

### 3.3 SÍNTESE DOS MUTANTES

Para a síntese dos clones infecciosos, sequências de E<sub>250-270</sub> contendo as mutações de interesse foram subclonadas em um cromossomo artificial bacteriano (BAC, do inglês *Bacterial Artificial Chromosome*), que codifica a poliproteína do DENV1-BR/90 (SUZUKI et al., 2007). Esse BAC, aqui denominado pBACDV1, foi gentilmente cedido pela Dra. Cláudia Nunes Duarte dos Santos, do Instituto Carlos Chagas, Fiocruz. Aqueles resultantes das clonagens, aqui denominados pBACMut, foram utilizados para a síntese dos clones infecciosos, através da transcrição *in vitro*.

#### 3.3.1 Desenho e síntese dos genes mutados

A estratégia de clonagem escolhida para a inserção das mutações contou com a síntese de dois plasmídeos. O plasmídeo 1 (P1), contendo a sequência de E<sub>250-270</sub> com as mutações de interesse; e o plasmídeo 2 (P2), contendo a sequência correspondente à proteína E do vírus em pBACDV1. O gene mutado desse primeiro plasmídeo foi inicialmente clonado no segundo, e este em pBACDV1 como demonstrado na Figura 6.

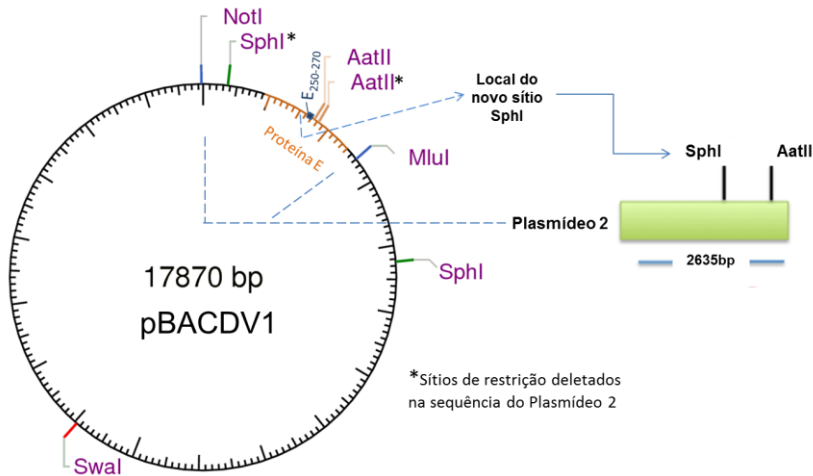


**Figura 6** – Estratégia utilizada para inserção das mutações em pBACDV1.

Para o desenho do primeiro plasmídeo, inicialmente procuramos em pBACDV1, por sítios de restrição próximos à sequência de E<sub>250-270</sub>. O sítio de restrição da enzima AatII mais próximo à região do Peptídeo foi escolhido para demarcar a extremidade 3' do gene sintético. A partir dessa extremidade 3', contamos 100 nucleotídeos a montante, onde inserimos um sítio de restrição para SphI. Dessa forma, o gene sintético de P1 contém a região de E<sub>250-270</sub> em pBACDV1, flanqueada por extremidades para as enzimas AatII e SphI, num total de 100 nucleotídeos (Figura 6). Foram desenhadas 13 variações do plasmídeo 1, cada uma delas contendo a região de E<sub>250-270</sub> com as mutações de B a O.

A sequência de pBACDV1 também serviu como molde para o desenho do gene sintético contido no plasmídeo 2, como demonstrado na Figura 7. Esse gene corresponde ao fragmento entre os sítios de restrição das enzimas NotI e MluI em pBACDV1, com 2.635 pares de bases, e contendo toda a sequência da proteína E viral. Alguns nucleotídeos foram substituídos nesse gene para a inserção e deleção de sítios de restrição. Primeiramente, nós adicionamos um sítio de restrição

para a enzima SphI próximo à região 5' de E<sub>250-270</sub> (Figura 7), que possibilitaria a clonagem do gene sintético de P1 (Figura 6). Mais duas mutações foram criadas com o intuito de excluir sítios de restrição sobressalentes de AatII e SphI existentes na sequência original desse primeiro gene (marcadas com um asterisco na Figura 7). As mutações inseridas tanto para criação do sítio de SphI, quanto para remoção dos sítios sobressalentes, se deram exclusivamente ao nível de nucleotídeos, sem acarretar em mutações na sequência aminoacídica. Finalizando o desenho de P2, adicionamos na região de E<sub>250-270</sub> as mutações correspondentes ao Mutante A. Dessa forma, esse mutante não passou pela primeira etapa de clonagens.



**Figura 7** – Esquema representativo de pBACDV1 e Plasmídeo 2.

Todos os 14 fragmentos gênicos (P2 com Mutante A, e os 13 P1 com mutantes de B a O), foram sintetizados pela empresa *Genscript*, em um plasmídeo *pUC-simple "knock-out"* para o sítio da enzima de restrição AatII.

### 3.3.2 Primeira Clonagem

Inicialmente todos os 14 plasmídeos foram utilizados na transformação de células Dh5 $\alpha$  (Invitrogen™) por eletroporação. As células transformadas foram incubadas em meio SOC sem antibiótico, a



37°C, 120 rotações por minuto (rpm), por 60 minutos. E, então, distribuídas em placas de meio *Luria-Bertani* (LB) -ágar com ampicilina (100 µg/mL). As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 16 horas.

Algumas colônias foram então selecionadas e testadas quanto à presença do gene de interesse, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), utilizando iniciadores específicos para o vetor *pUC-simple* (iniciadores M13 – ver item 3.3.2.2). Os produtos da PCR foram verificados através de eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Em seguida selecionamos uma colônia positiva para cada gene mutante, e estas foram inoculadas em 10 mL de meio LB com ampicilina, e incubadas a 37°C, 120 rpm por 16 horas. A partir dessa cultura recuperamos os plasmídeos mutados através de uma midipreparação do Plasmídeo 2 (*HiSpeed Plasmid Midi Kit* - Qiagen, de acordo com as recomendações do fabricante), e minipreparações dos demais (ver protocolo no item 3.3.2.1).

Com o DNA plasmidial obtido realizamos a primeira etapa das clonagens, que consistiu da restrição de todos os 14 plasmídeos com as enzimas AatII e SphI e subsequente ligação dos fragmentos de 100 nucleotídeos no Plasmídeo 2 (Figura 6).

As restrições foram realizadas em duas etapas, utilizando reagentes e protocolo adaptado do fabricante das enzimas (Promega). Para restrição de aproximadamente 1,5µg do DNA plasmidial, adicionamos 1,5 µL de Tampão J, 0,15 µL albumina sérica bovina (BSA, do inglês *Bovine serum albumin*) 100x, 3 µL de AatII (5U/µL) e água livre de nucleases em quantidade suficiente para completar 15 µL. A reação permaneceu incubada por quatro horas a 37°C, seguida da inativação da enzima por aquecimento a 65°C por 15 minutos. Em seguida, todo o volume da reação anterior foi incubado com mais 1,25µL de Tampão K, 1,5 µL de SphI (10U/µL) e água livre de nucleases em quantidade suficiente para completar 20 µL. A reação foi incubada por quatro horas a 37°C e a enzima inativada da mesma forma. Após a inativação, todo o volume das amostras foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, para produto da reação do Plasmídeo 2, e 3% e para as reações do Plasmídeo 1, como demonstrado na Figura 11.

As bandas de interesse foram excisadas do gel e o DNA purificado com o *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE), de acordo com as recomendações do fabricante.

O DNA obtido através da digestão do Plasmídeo 2 foi então recuperado em 26 µL de água livre de nucleases e submetido à

defosforilação, por meio da incubação com 1U de *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP, Promega) e 3  $\mu\text{L}$  de tampão SAP 10x, a 37°C por 15 minutos, seguido de inativação a 65°C por 15 minutos. O DNA recuperado da digestão do Plasmídeo 1 foi diluído em 20  $\mu\text{L}$ , e todas as amostras foram então dosadas por espectrofotometria usando *NanoVue* (GE).

Em seguida realizamos a ligação dos pequenos fragmentos de 100 pares de bases (resultantes da digestão do Plasmídeo 1), aqui nominados como inserto, no vetor resultante da digestão do Plasmídeo 2. Para a ligação foram utilizados 0,5  $\mu\text{L}$  da enzima T4 DNA ligase (5U/ $\mu\text{L}$ , Fermentas), 3  $\mu\text{L}$  de tampão T4 10x, 3  $\mu\text{L}$  do vetor, inserto em quantidade suficiente para uma concentração 10 vezes maior que a do vetor, e água livre de nucleases para completar 30  $\mu\text{L}$ . A reação permaneceu a 4°C por pelo menos 16 horas.

Os plasmídeos resultantes dessa ligação, bem como o vetor linearizado e defosforilado, foram usados na transformação de células Dh5 $\alpha$  (Invitrogen™) por eletroporação, que foram distribuídas em placas em meio LB-ágar com ampicilina, e incubadas como anteriormente descrito.

As colônias obtidas foram testadas quanto à presença do gene de interesse pela técnica do PCR de colônia (ver item 3.3.2.2), e o produto de PCR visualizado através de uma eletroforese em gel de agarose 1,5% como demonstrado no gel representativo da Figura 12.

As colônias positivas foram selecionadas, inoculadas em 10 mL meio LB com ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), e permaneceram incubadas a 37°C, 120 rpm, por 16 horas. Após o crescimento, o DNA plasmidial foi extraído pelo método de minipreparação em tubo descrito no item 3.3.2.1. A integridade do DNA obtido foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose 1%. Além disso, a confirmação da presença dos genes de interesse nas minipreparações foi realizada através de PCR (item 3.3.2.2) e sequenciamento, ambos usando iniciadores M13. O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Protozoologia da UFSC.

### 3.3.2.1 Extração de DNA plasmidial: minipreparação em tubo

Inicialmente as culturas bacterianas foram centrifugadas a 12.100 x g por cinco minutos, para recuperação das células. Após descarte do sobrenadante, as células foram homogeneizadas em tampão GET (item 3.13: meios e soluções) e incubadas por cinco minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas com

tampão de lise por 10 minutos à temperatura ambiente; com tampão de neutralização por mais 10 minutos e centrifugadas a 12.100 x g por 10 minutos.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para os poços de uma placa com filtro, posicionada e presa sobre uma placa de 96 poços. As placas foram centrifugadas a 2.254 x g, por cinco minutos. A fase aquosa filtrada foi então transferida para microtubos, adicionada de isopropanol absoluto para precipitação do DNA, e centrifugada novamente a 12.100 x g, por 30 minutos. O DNA precipitado foi lavado por meio da adição de etanol 70% gelado, e centrifugado a 12.100 x g por cinco minutos. Por fim, o sobrenadante foi descartado, o DNA deixado secar a 37°C, e, então diluído em 30 µL de água livre de nucleases (Gibco), e tratado com 1 µg de ribonuclease (RNase, Invitrogen™).

### 3.3.2.2 PCR dos genes em *pUC Simple*

Todas as PCR realizadas até a primeira clonagem utilizaram os iniciadores M13 (M13 Forward: CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC, M13 Reverse: TCACACAGGAAACAGCTATGAC) e reagentes da *GoTaq® DNA Polymerase* (Promega). Sendo que cada uma das reações continha: 1U de Taq DNA polimerase, 10 pmol de cada um dos iniciadores, 1 µL tampão *GoTaq* 10X, 0,2 µL dNTP (10 mM), 0,3 µL de cloreto de magnésio (50 mM), 0,1 µL de DNA (minipreparações) ou o raspado da colônia, e água livre de nucleases em quantidade suficiente para completar 10 µL. As condições de amplificação podem ser observadas no Quadro 1.

**Quadro 1** - Condições de amplificação utilizando iniciadores M13

Nº	Etapa	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação inicial	95°C	4 minutos
2*	Desnaturação	95°C	30 segundos
3*	Anelamento	57°C	30 segundos
4*	Extensão	72°C	2 minutos: P1 de B-O; 4 minutos: P2 e plasmídeos resultantes da 1ª clonagem.
5	Extensão final	72°C	4 minutos

\*Os passos 2,3 e 4 foram repetidos 35 vezes antes da extensão final.

### 3.3.3 Segunda clonagem

#### 3.3.3.1 Extração do DNA de pBACDV1

Inicialmente, as células transformadas com pBACDV1 recebidas do ICC foram estriadas em placas de meio *Terrific Broth* (TB, Invitrogen™) -ágar com cloranfenicol (15 µg/mL) e incubadas a 30°C, por pelo menos 30 horas. As colônias obtidas foram testadas por PCR utilizando iniciadores Mut (ver item 3.3.3.4).

Uma colônia positiva foi selecionada e inoculada em 10 mL meio TB com cloranfenicol (15 µg/mL), e permaneceu a 30°C, 120 rpm por 16 horas. Em seguida, a cultura foi adicionada a 500 mL de meio TB com cloranfenicol, e incubada novamente a 30°C, 200 rpm por 24 horas. As células foram então recuperadas através de centrifugação e utilizadas para extração do DNA plasmidial em duas maxipreparações, utilizando o *HiSpeed® Plasmid Maxi Kit* (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante.

A integridade do DNA obtido a partir da maxipreparação foi verificada em eletroforese em gel de agarose 0,8%, e a presença do gene de interesse por PCR (item 3.3.3.4).

#### 3.3.3.2 Digestão de pBACDV1 e dos plasmídeos resultantes da primeira clonagem

A reação de digestão de pBACDV1 foi realizada em etapa única, seguindo as recomendações e reagentes fornecidos pelo fabricante das enzimas (Promega). Para tal utilizamos cerca de 2 a 2,5 µg de DNA, 2 µL de Tampão D, 3 µL de NotI (10U/µL), 3 µL de MluI (10U/µL), 0,2 µL de BSA 100x e água livre de nucleases em quantidade suficiente para completar 20 µL. As reações permaneceram a 37°C, por quatro horas. Em seguida, todo o volume foi aplicado em uma eletroforese em gel de agarose 0,5% (Figura 13a).

Após eletroforese, as bandas correspondentes ao vetor linearizado foram excisadas do gel, e o DNA purificado com o *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA foi recuperado em 20 µL de água livre de nucleases e submetido à defosforilação. Para tal foi incubado com 1U de SAP (Promega), 3 µL de Tampão SAP 10x e 6 µL de água livre de nucleases, a 37°C por 15 minutos, seguido da inativação a 65°C por 15 minutos. As amostras foram então dosadas por espectrofotometria usando *NanoVue* (GE).

Para a restrição dos plasmídeos resultantes da primeira clonagem incubamos 3  $\mu\text{L}$  de DNA com 1,5  $\mu\text{L}$  de Tampão D, 0,15  $\mu\text{L}$  de BSA 100x, 0,5  $\mu\text{L}$  de PvuI e água livre de nucleases em quantidade suficiente para completar 15  $\mu\text{L}$ . Para cada um dos plasmídeos, três reações foram preparadas, que permaneciam incubadas por três horas, a 37°C. Em seguida, foram adicionados 0,8  $\mu\text{L}$  de Tampão D, 0,5  $\mu\text{L}$  de NotI (10 U/ $\mu\text{L}$ ), 0,5  $\mu\text{L}$  de MluI (10 U/ $\mu\text{L}$ ), 0,1  $\mu\text{L}$  de BSA 100x e água livre de nucleases em quantidade suficiente para completar 20  $\mu\text{L}$ . As reações permaneceram por quatro horas, a 37°C. Para alguns dos mutantes a primeira etapa de restrição com PvuI foi suprimida, e, nesse caso, a reação de restrição com NotI e MluI foi ajustada para 20  $\mu\text{L}$ . Todo o volume das reações foi aplicado em uma eletroforese em gel de agarose 2% como demonstrado em um gel representativo na Figura 13b.

As bandas correspondentes aos genes mutados foram excisadas do gel e o DNA purificado com o *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE) de acordo com as recomendações do fabricante, e dosado em *NanoVue* (GE).

### 3.3.3.3 Ligação em pBACDV1

Para a ligação dos fragmentos de 2.635 pb, aqui nominados como inserto, no vetor pBACDV1, foram utilizados 0,5  $\mu\text{L}$  da enzima T4 DNA ligase (Fermentas), 3  $\mu\text{L}$  de tampão T4 10x, 3  $\mu\text{L}$  do vetor, inserto em quantidade suficiente para uma concentração de três a 10 vezes maior que a do vetor (dependendo da disponibilidade de DNA de cada inserto), e água livre de nucleases para completar 30  $\mu\text{L}$ . A reação permaneceu a 4°C por pelo menos 16 horas.

Metade do volume de cada uma das reações de ligação, e também 3  $\mu\text{L}$  do vetor defosforilado, foram utilizados para a transformação de bactérias TOP10 F' (Life Technologies) quimiocompetentes. Para transformação pelo método de “choque-térmico”, adicionamos o DNA às células competentes após o descongelamento das mesmas e homogeneizamos delicadamente. As células permaneceram em gelo por 30 minutos. Em seguida, foram incubadas a 42°C por 45 segundos e novamente no gelo por 2 minutos. Adicionamos então 300  $\mu\text{L}$  de meio TB sem antibiótico e as mantivemos a 30°C, 120 rpm, durante uma hora. As células foram então distribuídas em placas de meio TB-ágar, com cloranfenicol (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), que foram incubadas a 30°C por pelo menos 30 horas.

As colônias obtidas foram testadas pela técnica do PCR de colônia (item 3.3.3.4), e o produto de PCR visualizado através de uma

eletroforese em gel de agarose 2%, como demonstrado no gel representativo da Figura 14. As colônias positivas foram então selecionadas, inoculadas em 10 mL de meio TB com cloranfenicol (15 µg/mL), e incubadas a 30°C, 120 rpm por 16 horas. A cultura resultante foi utilizada para extração de DNA de acordo com o protocolo de minipreparação descrito no item 3.3.2.1.

O DNA plasmidial extraído de cada mutante, agora denominados pBACMutA-O, foi testado quanto à presença dos genes de interesse, por PCR e sequenciamento parcial (realizado no Laboratório de Protozoologia da UFSC), ambos usando os iniciadores Mut. As amostras positivas foram então preparadas na forma de maxipreparações (conforme protocolo descrito no item 3.3.3.1 para pBACDV1), e encaminhadas para sequenciamento completo pela empresa Macrogen. Por fim, alguns mutantes foram parcialmente re-sequenciados para verificação de mutações espúrias pela empresa Myleus Biotecnologia.

#### 3.3.3.4 PCR para amplificação do segmento de E<sub>250-270</sub>

Novos iniciadores (Mut) foram desenhados para confirmar a presença da região de E<sub>250-270</sub> em pBACDV1 e pBACMut através de PCR. Cada reação era preparada contendo: 0,5U de *Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase* (Fermentas), 10 pmol de cada um dos iniciadores (Mut *Forward*: CTTACCACTGCCTTGGACTTCG; Mut *Reverse*: AGAACAGTTCCATGCTGGGTCTCA), 1 µL tampão *Maxima Hot Start 10x*, 1 µL dNTP (2 mM), 0,6 µL de cloreto de magnésio (25 mM), 0,1 µL de DNA (minipreparações) ou o raspado da colônia, e água livre de nucleases em quantidade suficiente para completar 10 µL. As condições de amplificação podem ser observadas no Quadro 2.

**Quadro 2** - Condições de amplificação utilizando iniciadores Mut

Nº	Etapa	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação inicial	95°C	10 minutos
2*	Desnaturação	95°C	1 minuto
3*	Anelamento	60°C	45 segundos
4*	Extensão	72°C	30 segundos
5	Extensão final	72°C	5 minutos

\*Os passos 2,3 e 4 foram repetidos 40 vezes antes da extensão final.

### 3.4 TRANSCRIÇÃO *in vitro*

Os procedimentos de transcrição *in vitro* e transfecção foram realizados da mesma forma, e em paralelo para pBACDV1 e pBACMutJ. Aqui a descrição do método será dada genericamente.

Primeiramente o DNA plasmidial foi linearizado com a enzima de restrição SmaI (New England Biolabs) de acordo com as recomendações do fabricante. A reação foi preparada pela mistura de 2 µg de DNA plasmidial, 5 µL tampão (NEBuffer 3.1), 2,5 µL de BSA 10x, 5 µL de enzima e água em quantidade suficiente para 50 µL. Após o preparo a reação foi incubada por 16 horas a 25°C.

Para verificar a digestão do plasmídeo, 2 µL da reação foram utilizados em uma eletroforese em gel de agarose 0,8%, como pode ser observado na Figura 15a, e o restante foi purificado pelo método do fenol/clorofórmio/álcool isoamílico.

Brevemente, para precipitação do DNA linearizado, foram adicionados ao produto da restrição 12 µL de solução de cloreto de sódio (NaCl) 1 M, 1 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, 2 µL de ácido etilenodiamino teracético (EDTA) 0,5 M, 1 µL de glicogênio de ostra (10 mg/mL) e 60µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1, ver item 3.13: meios e soluções). A mistura foi então homogeneizada e centrifugada a 14.000 rpm por 2 minutos. Após centrifugação, toda fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e a esta foram adicionados 60 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:24:1). Novamente a mistura foi homogeneizada e centrifugada nas mesmas condições, e a fase aquosa transferida para um novo microtubo onde foram adicionados de 60 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após nova centrifugação e transferência da fase aquosa, foram adicionados à solução três volumes de etanol absoluto e esta permaneceu incubada a -20°C por 16 horas.

Após a incubação as amostras foram centrifugadas a 16.000 x g por 20 minutos, a 4°C. O etanol foi então descartado e foram adicionados aos tubos três volumes de etanol 70%, que foram novamente centrifugados a 16.000 x g, 4°C, por 10 minutos. O etanol foi novamente descartado e os tubos incubados a 37°C para secagem do DNA precipitado. O DNA foi recuperado em 10 µL de água livre de nucleases. Uma alíquota foi separada para dosagem (*NanoVue*) e eletroforese em gel de agarose 0,8%, e o restante armazenado a -20°C até o momento do uso.

Para a reação de transcrição *in vitro* utilizamos o *MEGAscript® T7 High Transcription Kit* (Ambion) com adaptações às recomendações

do fabricante. Cada uma das reações foi preparada de modo a conter 0,8 µg de DNA plasmidial linearizado e purificado, 2 µL da solução de ATP (75 mM), 2 µL da solução de CTP (75 mM), 1 µL da solução de GTP (75 mM), 2 µL da solução de UTP (75 mM), 2 µL do tampão 10X, 1 µL de 40 mM *RNA cap structure analog m7G(5')ppp(5')G* (New England Biolabs), 2 µL da enzima T7 e água livre de nucleases em quantidade suficiente para completar 20 µL. A reação foi incubada em termociclador a 37°C por três horas e, em seguida, tratada com 2 U de TURBO DNase (Ambion) por 15 minutos a 37°C. Da amostra obtida 0,5 µL foram utilizados em uma eletroforese em gel de agarose 0,8% livre de RNases, e o restante foi purificado seguindo protocolo a seguir.

### 3.4.1 Purificação do RNA transcrito

Para a purificação do RNA transcrito utilizamos o *RNeasy® mini kit* (Qiagen) com algumas adaptações às recomendações do fabricante. Primeiramente, ajustamos o volume da amostra de RNA transcrito para 100 µL com água livre de nucleases. Adicionamos então às amostras 350 µL de tampão RLT contendo β-mercaptoetanol (na proporção de 1:100). Homogeneizamos a amostra por pipetagem e adicionamos a esta 250 µL de etanol 96%. Homogeneizamos novamente e, em seguida, todo o volume foi transferido para a coluna do *kit*, que foi centrifugada por 15 minutos a 8.000 x g. Após a centrifugação o volume líquido do tubo coletor foi descartado e adicionamos 500 µL de tampão RPE à coluna. Centrifugamos novamente a 8.000 x g por dois minutos. A coluna foi transferida para novo tubo coletor e a ela adicionamos 30 µL de água livre de nucleases para diluição do RNA. Após um minuto de incubação à temperatura ambiente, centrifugamos a 8.000 x g por um minuto. Uma alíquota da amostra obtida foi usada para dosagem (*NanoVue*) e eletroforese em gel de agarose 0,8% livre de RNases (Figura 15 b), e o restante foi armazenado a -80°C até o momento do uso.

## 3.5 CULTURA DE CÉLULAS

### 3.5.1 Células Huh-7.5

As células de linhagem de hepatoma humano, Huh-7.5, foram mantidas e propagadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F12, Gibco) 1X, suplementado 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) e 1% de penicilina/estreptomicina



(Gibco), à temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

As células utilizadas em ensaios de transfecção, titulação viral e imunofluorescência indireta (IFI) foram normalmente propagadas em placas para cultura celular de 24 poços. Para tal, a monocamada de células das garrafas de cultura foi lavada duas vezes com solução salina 0,9% estéril (Eurofarma), e as células aderentes removidas através da adição de tripsina/EDTA 0,05% (Lonza). As células permaneceram incubadas com tripsina a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por seis minutos. As células foram então individualizadas através do jateamento vigoroso por pipetagem. Uma alíquota das células foi então diluída 20 vezes em reagente azul de tripan (Gibco) para contagem em Câmara de Neubauer. Após a contagem, as células foram diluídas em meio DMEM/F12 com SFB e antibiótico, e distribuídas homogeneamente nos poços. Para placas de 24 poços utilizamos 6 a 7 x 10<sup>4</sup> células e para placas de seis poços 2 x 10<sup>5</sup>. As placas permaneceram incubadas por 16 a 24 horas, quando a monocamada celular atingiu a confluência ideal para realização dos experimentos (70 a 80%).

Em alguns ensaios de IFI foram utilizadas lamínulas de vidro circulares, estéreis e livres de RNases, recobrando o fundo dos poços.

### 3.5.2 Células C6/36

As células de *Aedes albopictus*, da linhagem C6/36, foram mantidas e propagadas em meio *Leibovitz's L-15* (Gibco) 1X, suplementado 10% de SFB (Gibco), 0,26% de triptose e 50 µg/mL de gentamicina, à temperatura de 28°C em estufa tipo B.O.D. (*Biochemical oxygen demand*).

Para as transfecções, as células foram preparadas em placas para cultura celular de 24 poços. Inicialmente, a monocamada de células das garrafas de cultura foi lavada duas vezes com solução salina 0,9% estéril (Eurofarma). Um volume pequeno de meio foi adicionado e as células aderentes removidas com auxílio de um rodo para cultura celular. Para completa separação, as células foram individualizadas através do jateamento vigoroso por pipetagem. A contagem e diluição das células foram realizadas da mesma forma que para Huh-7.5, mas nesse caso as células eram distribuídas na ordem de 1 x 10<sup>5</sup> células por poço. As placas permaneceram incubadas por 16 a 24 horas, até que a monocamada celular atingisse a confluência ideal.

### 3.6 TRANSFECCÃO

Para transfecção as células foram preparadas no dia anterior, em placas de cultura celular de 24 poços conforme descrito no item 3.5. A técnica utilizada foi a de transfecção por lipossomos.

As reações foram feitas em paralelo para o RNA proveniente do pBACDV1, pBACMutJ e controle da transfecção. Inicialmente para cada reação preparamos uma mistura de 2,5 µg de Lipofectin (Invitrogen) com meio Opti-MEM (Gibco) na proporção de 1:8 em um microtubo mantido a temperatura ambiente por 30 minutos. Durante o tempo de incubação, as células foram lavadas, através do descarte do meio em que elas foram mantidas, substituição por 1 mL de Opti-MEM, e incubação a 37°C ou 28°C (Huh-7.5 e C6/36 respectivamente) pelos mesmos 30 minutos.

Nos últimos minutos da incubação, preparamos a solução de RNA. Para tal 1 µg de RNA purificado foi diluído em meio Opti-MEM, em quantidade suficiente para 20 µL. Para o controle da transfecção preparamos um microtubo com Opti-MEM sem RNA (*mock*). Passados os trinta minutos, adicionamos a solução de RNA ou *mock* à mistura de Lipofectin e Opti-MEM na proporção de 1:1. Então transferimos todo o volume para outros microtubos contendo seis volumes de Opti-MEM (proporção de 1:6).

Em seguida, o meio das células foi removido e substituído pela mistura contendo RNA, Lipofectin e Opti-MEM. As células permaneceram incubadas por três horas, a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> ou 27°C em B.O.D (Huh-7.5 ou C6/36 respectivamente). O sobrenadante foi então descartado e substituído pelo meio usual de cada tipo celular, contendo SFB e antibiótico. As placas foram novamente incubadas nas mesmas condições por 120 horas.

Passadas 120 horas (ou para alguns experimentos em tempos de 8, 24, 72 e 120 horas) após a transfecção, aspiramos todo o sobrenadante e armazenamos a -80°C. As células por sua vez, foram removidas para extração de RNA e citometria de fluxo ou, quando destinadas à imunofluorescência, foram fixadas à placa pela adição de metanol/acetona (1:1) e incubação a -20°C por pelo menos 16 horas.

### 3.7 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR

#### 3.7.1 Extração de RNA

A extração de RNA das células transfectadas foi feita mediante uso do *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Já a extração a partir do sobrenadante foi realizada com o *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen), utilizando 140  $\mu\text{L}$  de cada amostra. Ambos de acordo com as recomendações do fabricante. Anteriormente à extração do RNA do sobrenadante, cada uma das amostras foi adicionada de 1  $\mu\text{L}$  de norovírus murino (titulação de  $6,75 \times 10^6$  unidades formadoras de placa (pfu) /mL), que serviu como controle endógeno da extração no ensaio de transcrição reversa, seguida de PCR quantitativo em tempo real (RTq-PCR).

### 3.7.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para síntese do cDNA usamos o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, que utiliza iniciadores randômicos), de acordo com as recomendações do fabricante. Para a maioria dos experimentos a quantidade de RNA utilizada por amostra foi de 2  $\mu\text{g}$ . No caso de experimentos com amostras menos concentradas, a quantidade de RNA utilizada foi limitada pela concentração da amostra menos concentrada.

Após a síntese, as amostras de cDNA foram armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$ . Na solução de uso o cDNA foi diluído cinco vezes, quando proveniente de 2  $\mu\text{g}$  de RNA, ou proporcionalmente nos experimentos que partiram de amostras de RNA menos concentradas.

### 3.8 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

Para todos os experimentos de qPCR utilizamos o *QuantiFast® SYBR® Green PCR* (Qiagen). Com adaptações às recomendações do fabricante, cada reação de PCR continha: 5  $\mu\text{L}$  de *2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix*, 250 nM de cada um dos iniciadores, 1  $\mu\text{L}$  de cDNA e água livre de nucleases em quantidade suficiente para completar 10  $\mu\text{L}$ . Os iniciadores utilizados e as condições de amplificação podem ser observados nos Quadro 3 e 4, respectivamente. A curva de dissociação dos iniciadores foi mensurada em todos os experimentos.

**Quadro 3** - Iniciadores utilizados na qPCR

<b>Iniciador</b>	<b>Sequência</b>	<b>Alvo</b>	<b>Referência</b>
DV1/NS5	<i>Forward:</i> GCAAACATCTTCAGGGGAAGT <i>Reverse:</i> GCTCCCGTACCTCTCCTACC	Proteína NS5 do DENV-1	Laboratório RNA de Interferência (UFMG)
18S	<i>Forward:</i> TAGAGGGACAAGTGGCGTTC <i>Reverse:</i> CGCTGAGCCAGTCAGTGT	Gene 18S humano e murino	(TAL et al., 2009)
Noro	<i>Forward:</i> CACGCCACCGATCTGTTCTG <i>Reverse:</i> GCGCTGCGCCATCACTC	Junção ORF1-2 do genoma do norovírus murino	(BAERT et al., 2008)

**Quadro 4** - Condições de amplificação: PCR quantitativo em tempo real

<b>Nº</b>	<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
<b>1</b>	Ativação inicial	95°C	5 minutos
<b>2*</b>	Desnaturação	95°C	10 segundos
<b>3*</b>	Anelamento e extensão	60°C	30 segundos
*Os passos 2,3 foram repetidos 40 vezes.			

A expressão do gene do RNA ribossomal 18S, foi utilizada como controle endógeno para as amostras derivadas de células, já a amplificação do gene de norovírus murino foi mensurada como controle endógeno das amostras de sobrenadante.

Todas as reações foram preparadas em placas do tipo *MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate* (Applied Biosystems®), e a PCR realizada no *Applied Biosystems StepOne™ PCR System*. Os dados de *threshold*, *baseline* e *Cq*, foram obtidos e analisados inicialmente através do *StepOne™ Software v2.1*.

A análise da expressão relativa dos genes foi feita pelo método do  $\Delta\Delta Cq$ , sendo que nos gráficos, os dados estão plotados de acordo com a expressão relativa de cada gene em relação ao *mock*, ao qual foi atribuído o valor de 1.

### 3.9 TITULAÇÃO VIRAL ATRAVÉS DA DETECÇÃO DE PLACAS DE LISE

As placas de 24 poços utilizadas nas titulações eram preparadas no dia anterior com células da linhagem Huh7.5 conforme descrito no item 3.5.1.

Inicialmente, preparamos diluições seriadas dos vírus (de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) em microtubos contendo meio DMEM/F12 com antibiótico e sem SFB, em um volume final de 900  $\mu\text{L}$ . Em seguida, incubamos as células Huh-7.5 com 400  $\mu\text{L}$  de cada diluição de vírus por poço (em duplicata, dois poços por diluição). O mesmo foi feito com os poços *mock* em duplicata, nesse caso utilizando 400  $\mu\text{L}$  de meio sem adição de vírus. As placas permaneceram incubadas a 37°C, em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , por 90 minutos. Então retiramos o meio e acrescentamos 500  $\mu\text{L}$  de meio DMEM/CMC por poço. As placas permaneceram incubadas por seis dias, a 37°C, em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ .

Passados os seis dias, adicionamos 1 mL de paraformaldeído 3% (em PBS 1x, pH 7), a cada um dos poços e mantivemos a placa incubada por uma hora a temperatura ambiente. As células foram então lavadas três vezes com PBS 1X, e incubadas com solução de cristal violeta por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas em água corrente e as pfus contadas para o cálculo do número de pfu/mL.

### 3.10 IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA

Inicialmente o sobrenadante das células foi coletado e a monocamada celular lavada três vezes com solução salina 0,9% (Eurofarma). Após a lavagem as células foram fixadas com uma solução de metanol acetona (1:1) e as placas foram incubadas a  $-20^\circ$  por pelo menos 16 horas. Após a fixação, a solução de metanol/ acetona foi removida e a placa deixada secar a temperatura ambiente. Quando secas, as células foram incubadas com o anticorpo primário anti-E de flavivírus, 4G2 (derivado do hibridoma D1-4G2-4-15 (ATCC® HB-112™)), em PBS 1X, em uma diluição de 1:100, por uma hora e trinta minutos a 37°C. A solução com anticorpo foi então removida e as células lavadas três vezes com PBS 1X. Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo secundário *Alexa Fluor® 488 rabbit anti-mouse IgG* (Invitrogen), numa diluição de 1:500, por uma hora, a 37°C, protegidas da luz.

Então as células foram novamente lavadas e incubadas com uma solução de DAPI 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , por 20 minutos, à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após nova lavagem adicionamos uma solução de glicerol 10% em PBS 1x.

O tratamento com DAPI diferiu no caso de placas onde as células foram propagadas sobre lamínulas circulares. Nesse caso, após incubação com anticorpo secundário e lavagem, as lamínulas foram

recolhidas e montadas em lâminas de microscopia, sobre uma gota de uma solução de *ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI* (Molecular Probes®). E permaneceram incubadas a 4°C, por pelo menos 16 horas antes da visualização no microscópio. As imagens de imunofluorescência foram adquiridas em microscópio de fluorescência convencional (*Olympus BX40*), ou invertido (*Olympus IX71*), acoplado a uma câmera (*Olympus DP72*). A visualização e formatação das imagens foram feitas através dos softwares *Olympus Cell P* e *Image J*.

### 3.11 MARCAÇÃO INTRACELULAR DE CÉLULAS Huh-7.5 TRANSFECTADAS PARA CITOMETRIA DE FLUXO

Inicialmente a monocamada celular foi lavada duas vezes com solução salina 0,9% estéril (Eurofarma). As células foram então recuperadas através da incubação com tripsina/EDTA 0,05% (Lonza), a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por três minutos; adição de meio com SFB e centrifugação por cinco minutos a 1.500 x g.

O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e as células homogeneizadas em tampão de bloqueio (PBS 1x (Lonza), 5% de SFB (Gibco) e 1% soro AB humano (Lonza)), no qual permaneceram incubadas por 20 a 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, os tubos com a suspensão celular foram centrifugados por cinco minutos a 1.500 x g; o sobrenadante descartado; e as células homogeneizadas em 100 µL de *Cytofix* (*BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit*, BD), com o qual permaneceram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente. Adicionamos 100 µL de *Perm/Wash 1X* (BD) por tubo e centrifugamos por mais cinco minutos a 1.500 x g. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado, as células homogeneizadas em 50 µL da solução de anticorpo primário, 4G2, diluído na ordem de 1:200 em *Perm/Wash 1X*, e incubadas por 30 minutos, a 37°C.

Após a incubação, adicionamos mais 150 µL de *Perm/Wash 1X* por tubo e centrifugamos por cinco minutos, a 1.500 x g. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado, as células levemente homogeneizadas em 50 µL de *Alexa Fluor® 488 rabbit anti-mouse IgG* (Invitrogen) diluído na ordem de 1:600 em *Perm/Wash 1X*, e incubadas por 30 minutos a 37°C. Mais 150 µL de *Perm/Wash 1X* foram adicionados aos tubos e estes foram centrifugados por cinco minutos a 1.500 x g. O sobrenadante novamente foi descartado e as células levemente homogeneizadas em 200 µL de *Perm/Wash* para lavagem. As células foram novamente centrifugadas nas mesmas condições, e realizamos mais duas lavagens com PBS 1X, intercaladas de

centrifugação. Por fim, as células foram homogeneizadas em 200 µl de PBS 1X e imediatamente analisadas utilizando equipamento *FACSVerse™* (BD). A análise dos dados foi feita pelo *software FlowJo*.

### 3.12 CERTIFICADO DE QUALIDADE EM BIOSSEGURANÇA

A pesquisa em regime de contenção, com microrganismos geneticamente modificados do Grupo II, no Laboratório de Imunobiologia está regulamentada através do Certificado de Qualidade em Biossegurança da UFSC, expedido pela Comissão Técnica Nacional em Biossegurança (número 101/99).

### 3.13 MEIOS E SOLUÇÕES

Clorofórmio: Álcool Isoamílico: 24 volumes de clorofórmio e 1 volume de álcool isoamílico.

DMEM/CMC: mistura de 1:1 de: carboximetilcelulose 3,2 % (CMC, Sigma), e meio DMEM/F12 2x contendo 1% de penicilina/estreptomicina e 10% de SFB. As porcentagens de soro e antibiótico estão em relação ao volume final.

DMEM/F12 1X: Conteúdo de um sachê de *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*, 1,2g de bicarbonato de sódio, água ultrapura em qsp 1L. Filtrado em 0,22µm e pH ajustado para 7,2 – 7,4.

Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico: 25 volumes de fenol, 24 volumes de clorofórmio e 1 volume de álcool isoamílico.

*Leibovitz's L-15*: Conteúdo de um sachê de *Leibovitz's L-15*, e água ultrapura em qsp 1L. Filtrado em 0,22µm e pH ajustado para 7,6.

Meio LB: 10g de triptona, 5g de extrato de levedura, 10g de NaCl e água destilada em quantidade suficiente para completar 1L (pH 7,0).

Meio LB-ágar: 10g de triptona, 5g de extrato de levedura, 10g de NaCl, 15g de ágar e água destilada em quantidade suficiente para completar 1L (pH 7,0).

Meio TB: 47g de meio Terrific Broth (Invitrogen), 4mL de glicerol e água destilada em quantidade suficiente para completar 1L.

Meio TB-ágar: 47g de meio Terrific Broth (Invitrogen), 4mL de glicerol, 15 de ágar e água destilada em quantidade suficiente para completar 1L.

PBS 1x: 1 volume PBS 10x e 9 volumes de água ultrapura.

PBS 10x: 80g de cloreto de sódio, 2g de cloreto de potássio, 14,4g de fosfato dissódico, 2,4g de fosfato de potássio monobásico, água ultrapura em qsp 1L. pH ajustado para 7,4.

Tampão de lise: 2 mL hidróxido de sódio, 16 mL de água ultrapura e 2 mL SDS 10%.

Tampão de neutralização: 30 mL de acetato de potássio 5M, 5,75 mL de ácido acético glacial e 14,25 mL água ultrapura autoclavada.

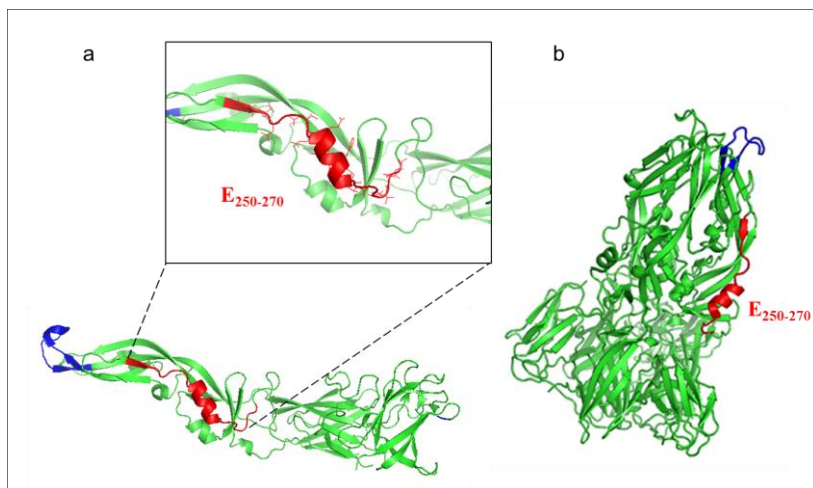
Tampão GET: 23 mL de glicose 20%, 10 mL de EDTA 0,5M e pH 8, 13 mL de Tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto (Tris-HCl) 1M e pH 7.4 e água ultrapura em qsp completar 500 mL.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 REGIÕES CONSERVADAS NA PROTEÍNA “E”

Através do alinhamento de sequências da proteína E dos quatro sorotipos virais (Apêndice A), nós identificamos duas regiões bem conservadas entre os sorotipos. A primeira delas corresponde ao peptídeo de fusão do vírus, em azul no Apêndice A e Figura 8. A segunda região (destacada em vermelho no Apêndice A e Figura 8) foi denominada E<sub>250-270</sub>, e corresponde a um peptídeo de 21 aminoácidos (resíduos 250 a 270 da proteína E), bem conservados em DENV-1, 2 e 3, e parcialmente conservados em DENV-4. E<sub>250-270</sub> encontra-se exposto na forma trimérica da proteína, como pode ser observado na Figura 8b.



**Figura 8** - Regiões conservadas da proteína do envelope dos DENV. Um dos monômeros (da estrutura dimérica, PDB: 1TG8) está representado em “a”. Em verde a proteína E, onde está destacado em azul o peptídeo de fusão e em vermelho, e no detalhe, E<sub>250-270</sub>. A posição de cada um dos peptídeos na estrutura trimérica (PDB: 1OK8) está demonstrada em “b” nas mesmas cores.

Uma vez que a sequência dos DENV apresenta consideráveis variações, inclusive em isolados do mesmo sorotipo, nós procuramos avaliar, nesse mesmo contexto, um número maior de genomas, que melhor representaria a variabilidade dos vírus na natureza. Para tal, 480 genomas de DENV disponíveis no *GenBank* (120 de cada sorotipo), foram aleatoriamente sorteados e as suas sequências proteicas alinhadas.

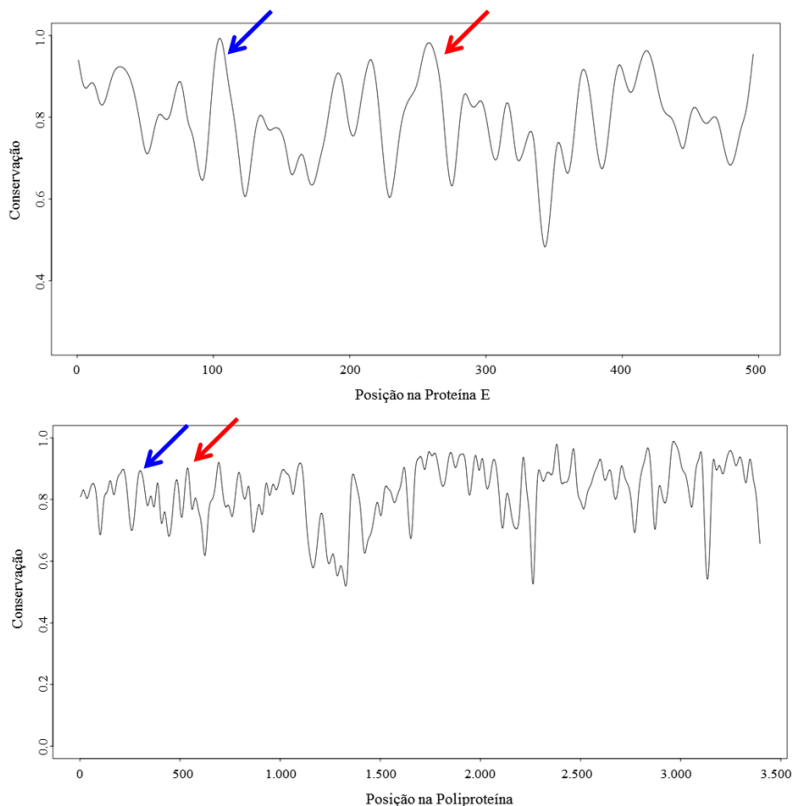
Em seguida, um programa escrito na linguagem *Perl* foi utilizado para calcular o aminoácido ou *gap* mais presente em cada posição do alinhamento, e a frequência do mesmo (dados não mostrados). Os aminoácidos mais frequentes, ou mais conservados, para cada posição apareceram em no máximo 478 sequências (dados não mostrados). Em E<sub>250-270</sub>, 16 dos 21 aminoácidos apresentaram o nível máximo de conservação, como demonstrado no Quadro 5.

**Quadro 5** – Frequência dos aminoácidos de peptídeos altamente conservados de E em 480 sequências da poliproteína viral

Peptídeo	Posição na poliproteína	Aminoácido	Frequência
Peptídeo de Fusão	376	V	478
	377	D	478
	378	R	478
	379	G	478
	380	W	478
	381	G	478
	382	N	478
	383	G	478
	384	C	478
	385	G	478
	386	L	478
	387	F	478
	388	G	478
	389	K	478
	390	G	478
	391	G	240

Peptídeo	Posição na poliproteína	Aminoácido	Frequência
E <sub>250-270</sub>	529	V	478
	530	V	358
	531	V	473
	532	L	478
	533	G	478
	534	S	478
	535	Q	478
	536	E	478
	537	G	478
	538	A	478
	539	M	478
	540	H	478
	541	T	358
	542	A	478
	543	L	478
	544	T	366
545	G	478	
546	A	478	
547	T	478	
548	E	478	
549	I	358	

Usando o ambiente estatístico R, os dados de frequência foram plotados em gráficos de acordo com valores relativos estabelecidos de zero a um. A partir deles constatamos que as regiões do peptídeo de fusão e E<sub>250-270</sub> estão realmente entre as mais conservadas no contexto da proteína E, como demonstrado pelos picos destacados na Figura 9a. Além disso, esses peptídeos são também conservados se comparados à poliproteína como um todo, mesmo com E apresentando um perfil de conservação global menos pronunciado em relação a algumas proteínas não estruturais (Figura 9b).



**Figura 9** – Perfil de conservação dos aminoácidos nos DENV. A frequência de cada aminoácido por posição está expressa em valores relativos, onde zero (0) representa nenhuma identidade ou um *gap*, e um (1) representa cem por cento de identidade. Em “a” estão representados os 495 aminoácidos que compõe a proteína E (posição 281 a 776 no alinhamento), em “b” estão representados todos os aminoácidos da poliproteína. Setas em azul indicam os picos correspondentes ao peptídeo de fusão, e em vermelho, os picos de  $E_{250-270}$ .

#### 4.2 OS MUTANTES DE $E_{250-270}$

De posse da estrutura da proteína E (PDB: 1TG8 e 1OK8), pudemos analisar o contexto em que se encontra  $E_{250-270}$  e desenhar alterações que modificassem a interação deste com outras proteínas, mas não alterassem drasticamente sua estrutura. Foram escolhidas 14 diferentes modificações com base nas propriedades físico-químicas de cada aminoácido ou conjunto de aminoácidos. Essas modificações

encontram-se representadas na Figura 10. Analisando a distribuição de cargas em E<sub>250-270</sub>, pudemos verificar dois padrões distintos, um de aminoácidos carregados negativamente (Figura 10a, em vermelho) e um de aminoácidos hidrofóbicos (Figura 10a, em azul). Os resíduos com acessibilidade maior que 50% estão sublinhados na figura 10a. A partir dessas análises foram inicialmente desenhados 2 grupos de mutações.



**Figura 10** – Sequência dos mutantes de E<sub>250-270</sub>. A sequência do peptídeo original (a), e mutantes dos grupos 1 (b), 2 (c) e 3 (d) estão mostradas. Em “a” aminoácidos carregados negativamente estão em vermelho, e hidrofóbicos com cadeias laterais expostas em azul; aqueles com acessibilidade maior que 50% estão sublinhados; os números sobre as letras representam a frequência de cada resíduo nas 480 sequências analisadas (ver Quadro 5); sobre os números encontra-se representada a estrutura secundária da região de acordo com o PDB: 1TG8. Em “b”, “c” e “d” os resíduos mutados estão destacados em vermelho.

O primeiro grupo de mutantes visou modificar a carga dessa região da proteína (Figura 10b). Nesse contexto, o mutante A remove todas as cargas e cadeias laterais polares substituindo os aminoácidos indicados por alaninas. O mutante B remove somente glutamatos negativamente carregados (E243 e E255), enquanto o mutante C muda esses dois glutamatos por aminoácidos carregados positivamente. O mutante D remove as cadeias laterais hidrofóbicas de E<sub>250-270</sub>, o mutante E transforma esses resíduos hidrofóbicos em resíduos polares enquanto o mutante F deixa essa região apolar carregada.

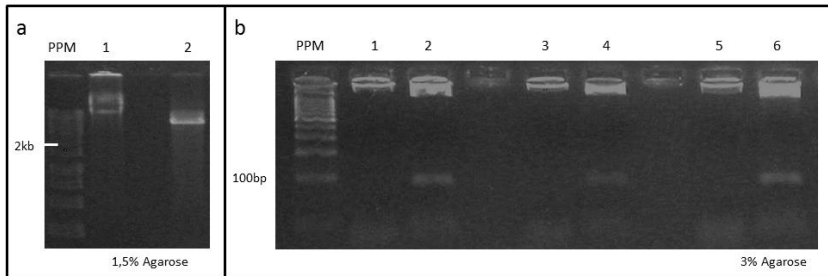
O segundo grupo foi desenhado para modificar o peptídeo mais radicalmente, alterando a estrutura secundária da região (Figura 10c). Assim sendo, o mutante G elimina todas as cadeias laterais do peptídeo e o mutante H remove as cadeias laterais dos aminoácidos que formam uma pequena alfa-hélice central. O mutante I foi desenhado para alterar as características do *loop* na região C-terminal, e o mutante J remove as cadeias laterais hidrofóbicas presentes na região amino-terminal de E<sub>250-270</sub>.

Um terceiro grupo de mutantes foi desenhado a partir do alinhamento da sequência aminoacídica de E<sub>250-270</sub> do DENV1-BR/90 com outros flavivírus, como demonstrado no Apêndice B. Identificamos a conservação de oito dos 21 aminoácidos de E<sub>250-270</sub> entre esses flavivírus (V250, L253, G254, Q256, G258, A263, L264 e G266), que são também muito conservados entre os DENV (como demonstrado no quadro 5). A maior identidade com DENV1-BR/90 foi observada entre as cepas de JEV e WNV, e menor com TBEV. Partindo desses dados, o mutante L é uma construção onde esses oito aminoácidos são substituídos por alaninas (Figura 10d). O mutante M substitui os demais aminoácidos por alaninas, mantendo os oito conservados. E nos mutantes N e O, a sequência de E<sub>250-270</sub> do DENV1-BR/90 é substituída pela sequência do mesmo peptídeo em WNV e TBEV, respectivamente. A construção dos mutantes M e N seguiu o mesmo princípio, isto é, substituir os treze aminoácidos variantes entre os flavivírus, com a diferença de que o mutante N carrega uma sequência já existente na natureza e “evolutivamente testada”.

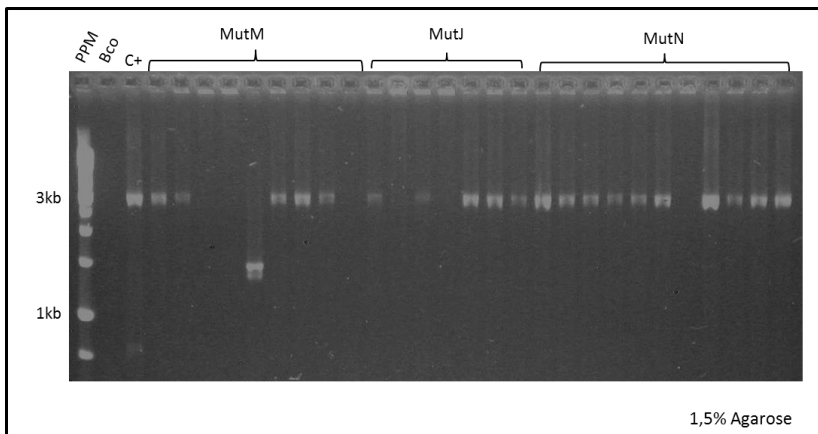
A predição do efeito das mutações de cada aminoácido pontualmente, pelo *software* *SDM/Mordred*, demonstra que algumas substituições podem ser altamente desestabilizantes, e causar alterações na acessibilidade ao solvente e formação de pontes de hidrogênio (Apêndice C). As alterações globais na estrutura secundária da proteína

e estabilidade etc., não puderam ser aferidas, uma vez que o *software* considera somente mutações pontuais.

Após o desenho dos mutantes, estes foram sintetizados em genes sintéticos como demonstrado no item 3.3.1, e utilizados em duas etapas de clonagens. Na primeira etapa de clonagens foi realizada a digestão dos insertos do Plasmídeo 1 e do vetor Plasmídeo 2 (Figura 11) para posterior ligação. A presença do gene de interesse foi verificada por PCR (exemplo na Figura 12).



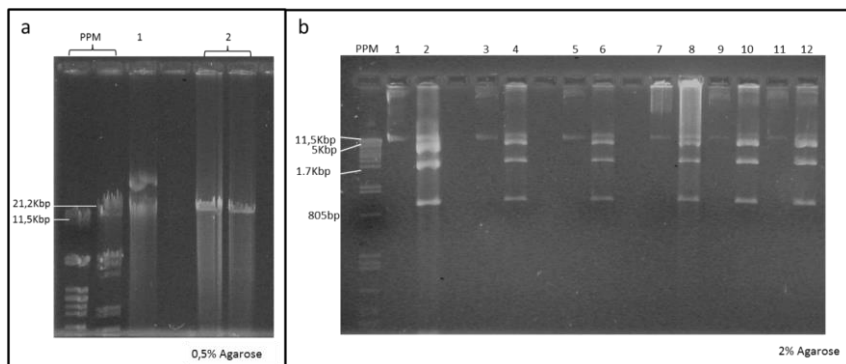
**Figura 11** – Eletroforese em gel de agarose do produto das restrições de AatII e SphI. Em “a” eletroforese do plasmídeo 2. Em “b” eletroforese do plasmídeo 1, contendo mutações de J (1 e 2), L (3 e 4) e M (5 e 6). Os números ímpares indicam os plasmídeos fechados, os pares indicam o produto das restrições. PPM: Padrão de peso molecular para DNA.



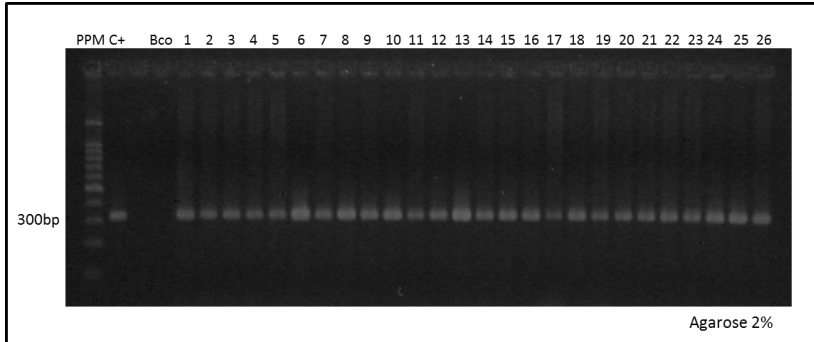
**Figura 12** – Eletroforese em gel de agarose: PCR das colônias transformadas com plasmídeos resultantes da primeira clonagem. As células transformadas com plasmídeos contendo a sequência dos mutantes M, J e N foram testadas quanto à presença do gene de interesse. *Amplicon* esperado: 2.759 pb. PPM:

Padrão de peso molecular para DNA; Bco: branco, *mix* de PCR sem DNA; C+: controle positivo, *pUC-simple* “*knock-out*” sem inserto.

As amostras positivas na PCR tiveram suas sequências confirmadas por sequenciamento parcial (resultados não mostrados) para 11 dos genes mutantes (todos, exceto aqueles contendo os mutantes E, G e H). Todos os 11 foram utilizados na segunda etapa de clonagens. Nessa etapa os plasmídeos contendo as mutações foram inicialmente digeridos, como demonstrado na Figura 13, e ligados no vetor pBACDV1. A presença do gene de interesse verificada por PCR (Figura 14), e então foram encaminhados para sequenciamento parcial e completo.



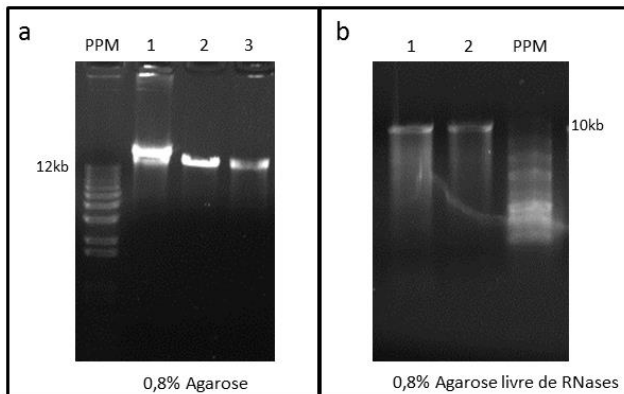
**Figura 13** – Eletroforese em gel de agarose do produto das restrições de PvuI, NotI e MluI. Em “a” eletroforese de pBACDV1. Em “b” eletroforese dos plasmídeos resultantes da primeira clonagem, contendo mutações de A (1 e 2), D (3 e 4), F (5 e 6), I (7 e 8), J (9 e 10) e L (11 e 12). Os números ímpares indicam os plasmídeos fechados, os pares indicam o produto das restrições. A restrição com as três enzimas gera fragmentos de 152, 896, 1.662 e 2.635 pb, sendo esse último o gene de interesse. PPM: Padrão de peso molecular para DNA.



**Figura 14** – Eletroforese em gel de agarose: PCR das colônias transformadas com pBACMut. Nas canaletas o produto de PCR das colônias transformadas com pBACMutF (1, 16-26), pBACMutD (2), pBACMutJ (3 e 4), pBACMutI (5-15). PPM: Padrão de peso molecular para DNA; Bco: branco, *mix* de PCR sem DNA; C+: controle positivo pBACDV1. *Amplicon* esperado iniciadores Mut: 318 pb.

Os pBAC contendo genes dos mutantes B, C, M, N e O apesar de positivos na PCR, apresentaram um problema no sequenciamento parcial, com qualidade inferior à necessária para a definição das seqüências; e pBACMutI no sequenciamento completo. Os demais foram parcial e completamente sequenciados. No entanto foram encontradas mutações espúrias nas seqüências de pBACMutA, pBACMutD, pBACMutF, em regiões não relacionadas às clonagens e em pBACMutL na seqüência do envelope. Assim sendo, ao final deste, somente pBACMutJ pôde ser utilizado para as reações de transcrição *in vitro* (Figura 15b) e transfecção em células.

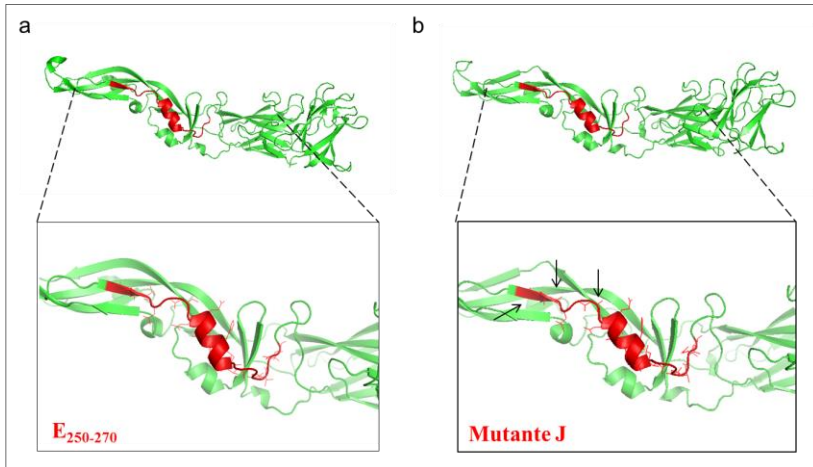




**Figura 15** – Eletroforeses do produto de restrição e transcrição *in vitro* de pBACDV1 e pBACMutJ. Em “a” a eletroforese pBACMutJ não digerido (1), e pBACMutJ e pBACDV1 digeridos com SwaI (2 e 3 respectivamente). Em “b” a eletroforese do RNA purificado, produzido a partir da transcrição de pBACDV1 (1) e pBACMutJ (2). PPM: padrão de peso molecular de DNA (a) e RNA (b).

#### 4.3 O MUTANTE J

O mutante J faz parte do segundo grupo de mutações proposto, e, como demonstrado na Figura 10c, consiste da remoção de cadeias laterais hidrofóbicas através da substituição de três valinas (V), uma leucina (L) e uma serina (S), por alaninas (A) na região amino-terminal de E<sub>250-270</sub> (V250A, V251A, V252A, L253A e S255A). Pelo menos quatro desses aminoácidos são altamente conservados entre os DENV, como demonstrado no Quadro 5. Apesar das substituições das valinas e leucina terem sido preditas como desestabilizantes, e S255A como estabilizante (Apêndice C, ver J1, J2, J3, J4 e J6), essas mutações não parecem afetar substancialmente o dobramento da proteína, como pode ser observado na modelagem de E da Figura 16b



**Figura 16** – Modelagem da proteína E contendo o Mutante J. Um dos monômeros da estrutura dimérica (PDB: 1TG8) está representado em “a”, no detalhe a região de E<sub>250-270</sub>. Essa mesma estrutura (PDB: 1TG8) foi utilizada para a modelagem de E contendo o mutante J, como pode ser observado em “b”, no detalhe a região de E<sub>250-270</sub> mutada, onde as setas indicam a posição dos resíduos mutados em vBACMutJ.

## 4.4 ENSAIOS COM vBACMutJ

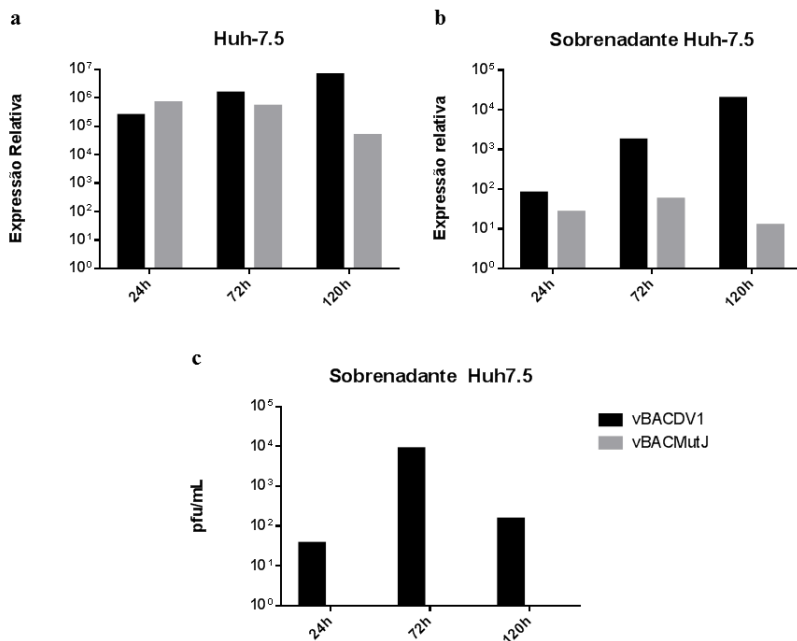
### 4.4.1 Ensaios em células de linhagem humana

Após a transcrição de pBACMutJ e transfecção em células de linhagem humana (Huh-7.5), a replicação e o espalhamento do vírus resultante, vBACMutJ, foram avaliados por PCR quantitativo em tempo real, titulação, citometria de fluxo e IFI.

A replicação dos clones nas células transfectadas foi avaliada inicialmente pela expressão relativa (ao *Mock*) do RNA viral. Os dados de qPCR revelaram uma queda no nível de expressão do RNA viral, nas células transfectadas com vBACMutJ, principalmente após 120 horas da transfecção. O contrário foi encontrado para as células transformadas com vBACDV1 (Figura 17a). E a mesma tendência foi observada no sobrenadante das células (Figura 17b).

A partir de uma diluição de 10 vezes, não foi observada a formação de placas de lise na titulação dos sobrenadantes de células

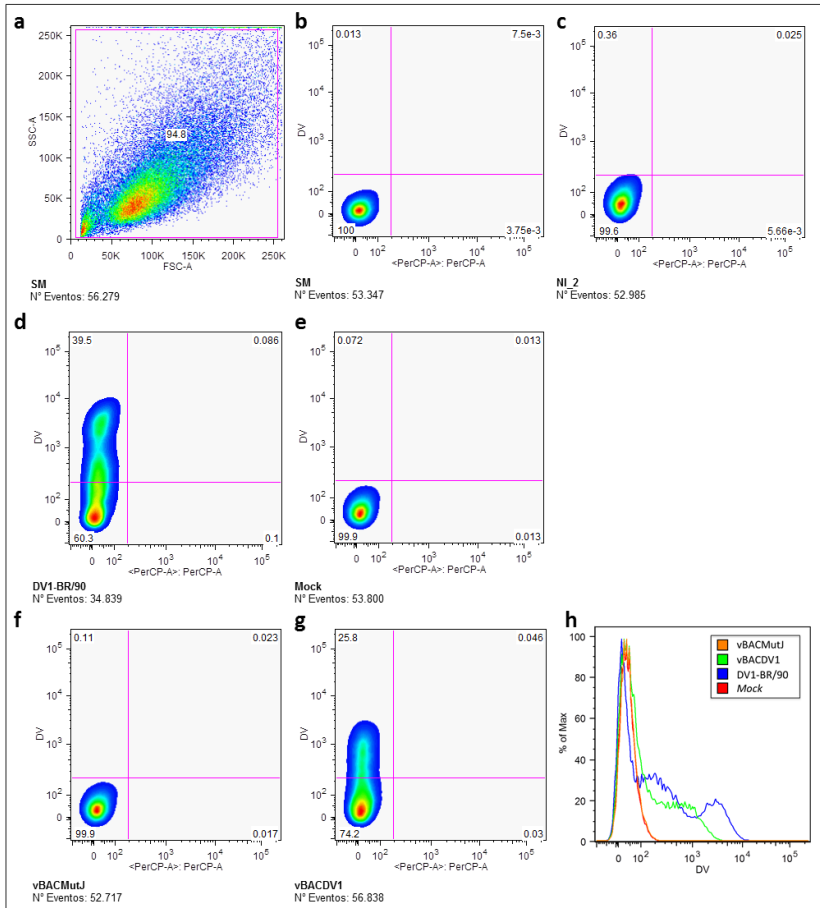
transfectadas com RNA de vBACMutJ em nenhum dos tempos testados (Figura 17c). Já a titulação dos sobrenadantes das células transfectadas com o BAC original, revelou um aumento de mais de 200 vezes na quantidade de unidades formadoras de placas, entre os tempos de 24 e 72 horas pós-transfecção, seguido de uma queda entre 72 e 120 horas (Figura 17c).



**Figura 17** – Avaliação da curva de replicação viral por RTq-PCR e titulação. A expressão relativa do RNA viral foi avaliada por RTq-PCR nas células (a) e sobrenadante (b) após 24, 72 e 120 horas de transfecção (*Lipofectin*) com vBACDV1 (barras em preto) e vBACMutJ (barras em cinza). A titulação viral no sobrenadante das células transfectadas foi aferida pelo método de detecção de placas de lise (c). Em “a” e “b” dados representativos de dois experimentos de transfecção independentes, um usando *Lipofectin* e outro por eletroporação, realizado no ICC-Fiocruz.

Células transfectadas com ambos os RNAs foram submetidas à marcação intracelular e citometria de fluxo. Surpreendentemente, as células transfectadas com RNA de vBACMutJ não expressaram proteína E após 120 horas da transfecção, como demonstrado na Figura 18f, ou ainda, esta não pode ser diferenciada do ruído presente no *Mock*. Em

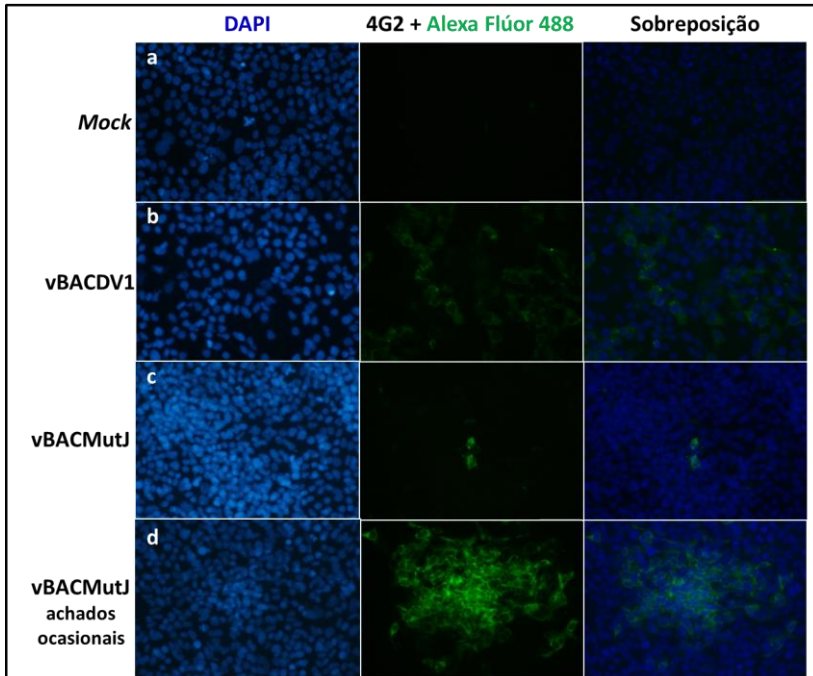
contrapartida, a proteína estava presente em 25,8% das células transfectadas com vBACDV1 (Figura 18g).



**Figura 18** – Expressão da proteína E nas células transfectadas. De “a” a “e” os parâmetros de compensação. Em “a” o perfil das células Huh-7.5 não infectadas e não marcadas (SM-sem marcação), quanto ao tamanho e granulosidade; o quadro em rosa delimita o perfil das células avaliadas nas demais análises. Em “b”, “c” e “d” estão mostradas a expressão de E nos controles: células sem marcação (b), não infectadas e marcadas somente com anticorpo secundário (c); e controle positivo (d, células marcadas, infectadas com vírus DENV-1 sorotipo BR/90). Em “e”, “f” e “g” a expressão de E em células Huh-7.5 após 120 horas da transfecção (*Lipofectin*) sem RNA e com RNA de vBACMutJ e vBACDV1, respectivamente. A expressão de E nos diferentes tratamentos, junto ao controle

positivo, é demonstrada no histograma (h). Marcação: anticorpo primário murinho 4G2, anti proteína E dos *Flavivirus* (1:200); anticorpo secundário *Alexa Fluor® 488 rabbit anti-mouse IgG* (1:600). Dados de um experimento paralelo ao representado na Figura 17.

A expressão da proteína do Envelope e espalhamento viral em células transfectadas com RNA de vBACDV1 e vBACMutJ foram avaliados também por imunofluorescência indireta, como demonstrado na Figura 19. Observamos nesse caso que expressão de E se dá de forma disseminada após 120 horas de transfecção com vBACDV1 (Figura 19b). No mesmo período, poucas células expressando E foram detectadas na transfecção com vBACMutJ. Nesse caso, foram encontrados poucos campos com células positivas, e a expressão não foi disseminada (Figura 19c). No entanto, alguns achados como “ilhas de infecção” (Figura 19d) foram observados ocasionalmente neste tratamento (na ordem de 0-1 por poço). Resultados muito semelhantes aos da transfecção com *Lipofectin* (representados na Figura 19), inclusive quanto aos achados ocasionais, foram obtidos na transfecção por eletroporação, seguida de IFI com anticorpo primário anti-NS3, em um experimento independente, realizado em colaboração com a Dra. Daisy Maria Strottmann, no ICC-Fiocruz.

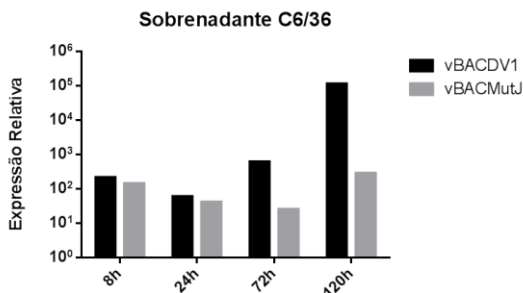


**Figura 19** – Espalhamento do vírus em células transfectadas com vBACDV1 e vBACMutJ. A expressão da proteína E e o espalhamento viral foram avaliados por IFI das células Huh-7.5 transfectadas com *Lipofectin*, sem RNA (a, *mock*), e com RNA de vBACDV1 (b) e vBACMutJ (c). Os achados ocasionais da transfecção com vBACMutJ estão representados em d. O corante fluorescente DAPI foi utilizado como marcador nuclear (primeira coluna). Na segunda coluna, a detecção das células marcadas com anticorpo primário murino 4G2, anti-E de *Flavivirus* (1:100), e anticorpo secundário *Alexa Fluor® 488 rabbit anti-mouse IgG* (1:500). A sobreposição das imagens da primeira e segunda coluna pode ser observada na terceira. As imagens foram capturadas no aumento de 400 vezes, e são representativas de dois experimentos independentes.

#### 4.4.2 Ensaio em células de inseto

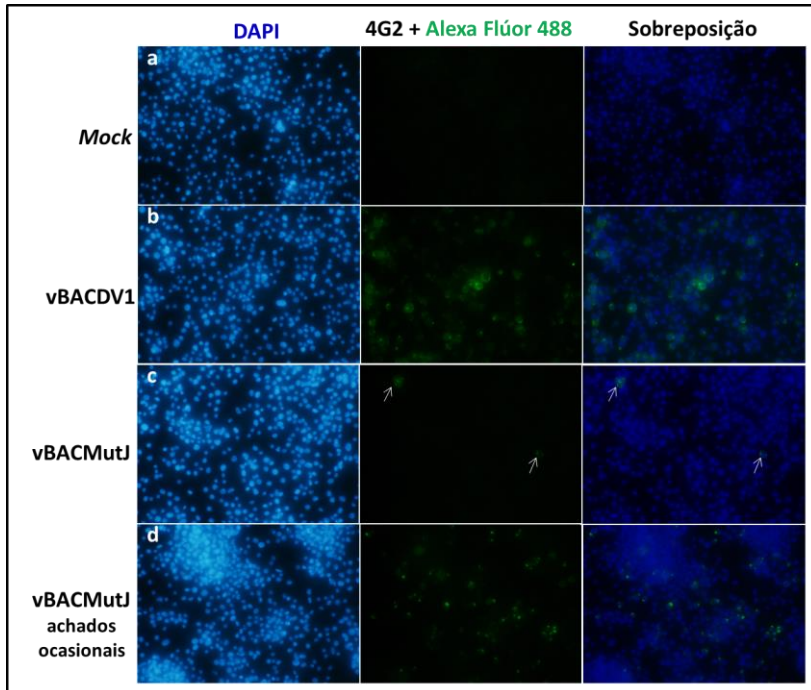
A fim de avaliar se o fenótipo apresentado em células humanas se repetia em células de linhagem de inseto, a replicação e o espalhamento de vBACDV1 e vBACMutJ, foram avaliados no sobrenadante de células C6/36 transfectadas. A mensuração da expressão relativa do RNA viral foi feita também por RTq-PCR. Nesse ensaio observamos que a expressão de vBACDV1 aumenta

gradativamente entre 24 e 120 horas, como demonstrado na Figura 20. Já a expressão de vBACMutJ só aumenta nas 120 horas após a transfecção e, mesmo assim, é cerca de 400 vezes menor do que aquela observada para vBACDV1 no mesmo período (Figura 20). Nesse experimento, o tempo de oito horas foi usado para avaliar o nível de RNA “basal”, proveniente diretamente da transfecção.



**Figura 20** – Avaliação da curva de replicação viral no sobrenadante de células C6/36. A expressão relativa do RNA viral foi avaliada por RTq-PCR no sobrenadante das células transfectadas após 8, 24, 72 e 120 horas de transfecção (*Lipofectin*) com vBACDV1 (barras em preto) e vBACMutJ (barras em cinza).

O espalhamento do vírus nessas células foi avaliado por IFI, através do mesmo protocolo utilizado para Huh-7.5. Da mesma forma que nas células humanas, na transfecção com RNA de vBACDV1 nós observamos uma grande quantidade de células expressando a proteína E após 120 horas, e estas células estavam disseminadas por todo poço, de acordo com o padrão apresentado na Figura 21a. Por outro lado, poucas células expressando E foram observadas após 120 horas de transfecção com RNA de vBACMutJ (Figura 21c). Além disso, essas células positivas não eram encontradas em todos os campos (aumento de 400 vezes), e apresentavam-se de forma isolada, entre células negativas. No entanto, achados ocasionais como “ilhas” (Figura 21d), sugerindo a disseminação viral, também foram encontrados (na ordem de três por poço).



**Figura 21** – Espalhamento do vírus em células C6/36 transfectadas. A expressão da proteína E e o espalhamento viral foram avaliados por IFI das células C6/36 transfectadas com *Lipofectin*, sem RNA (a, *mock*), e com RNA de vBACDV1 (b) e vBACMutJ (c). Em “c” as setas indicam células expressando E. Os achados ocasionais da transfecção com vBACMutJ estão representados em d. O corante fluorescente DAPI foi utilizado como marcador nuclear (primeira coluna). Na segunda coluna, a detecção das células marcadas com anticorpo primário murino 4G2, anti-E de *Flavivirus* (1:100), e anticorpo secundário *Alexa Fluor® 488 rabbit anti-mouse IgG* (1:500). A sobreposição das imagens da primeira e segunda coluna pode ser observada na terceira. As imagens foram capturadas no aumento de 400 vezes.



## 5 DISCUSSÃO

Os vírus de genoma RNA apresentam uma ampla variabilidade genética, devido à alta taxa de mutação intrínseca associada à RdRP. Apesar das mutações ocorrerem de forma randômica, a variabilidade é desigual ao longo do genoma, uma vez que, as mutações que resultam em efeitos deletérios sobre a aptidão (*fitness*) são restritas. Nesse caso o agente seletor, que pode ser a resposta imune do hospedeiro, impõe um filtro à variação genética da população viral, eliminando algumas variantes do *pool* genético e fixando outras. A adaptação viral é, por sua vez, contra-atacada pela adaptação do hospedeiro, que é contra-atacada pela adaptação viral novamente. Essas interações hospedeiro-vírus ocorrem de forma cíclica, e exemplificam um conflito genético clássico tipo Rainha Vermelha, com ambas as partes evoluindo rapidamente para desviar ou restaurar o *status quo* (DAUGHERTY; MALIK, 2012; DRAKE; HOLLAND, 1999). No caso dos vírus de RNA, o genoma é marcado por regiões permissivas para múltiplas mutações, que possibilitam a evasão da resposta imune do hospedeiro via variação antigênica, e locais críticos para estrutura e função viral que permanecem conservados (DRAKE; HOLLAND, 1999; KHAN et al., 2008). Essas regiões conservadas têm sido agora extensivamente estudadas, em vírus como HIV, Influenza e DENV, como possíveis alvos vacinais, para o desenvolvimento de anticorpos multineutralizantes, inibidores e antivirais.

Pertencentes ao grupo dos vírus de RNA, os DENV, tiveram sua taxa de mutações na natureza estimada entre  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  substituições por posição, por ano, dependendo do sorotipo viral (HOLMES; TWIDDY, 2003). Entre os sorotipos a mutabilidade também é alta, dando origem a populações de sequência genômica altamente similar, mas não idênticas, conhecidas como quase-espécies (KUROSU, 2011).

Ainda que a variação genômica seja tão expressiva, nossos dados demonstraram que mesmo a proteína do Envelope, principal alvo do sistema imune, mantém regiões bem conservadas em sua sequência, principalmente o peptídeo de fusão e E<sub>250-270</sub> (Figuras 13 e 14; Quadro 5; e Apêndice A). É que alguns dos resíduos são inclusive altamente conservados em outros flavivírus (Apêndice B). Corroborando nossos achados, Khan et al. (2008), descreveram 44 peptídeos de nove aminoácidos altamente conservados na sequência da poliproteína dos diferentes sorotipos virais e, dentre estes, os únicos encontrados em E foram o peptídeo de fusão e parte de E<sub>250-270</sub> (resíduos 252-260).

No entanto, apesar de mutações nesses dois peptídeos não serem comumente observadas, uma análise aleatória de várias sequências dos sorotipos virais (resultados não mostrados) demonstrou que vários isolados apresentam mutações nessa região ao nível de nucleotídeos. Estes dados tomados em conjunto, podem sugerir que as mutações nessa região, que levem a uma substituição dos resíduos, são negativamente selecionadas, pois implicam em uma perda de função ou desestruturação da proteína. Essa sugestão pôde ser em parte confirmada em estudos envolvendo mutações no peptídeo de fusão (CHRISTIAN et al., 2013; HUANG et al., 2010; SULTANA et al., 2009).

No caso de E<sub>250-270</sub> nossos resultados sugerem que a substituição simultânea dos resíduos 250-253 e 255 por alaninas (vBACMutJ) tem impacto significativo na replicação e espalhamento do vírus em células humanas (Figuras 17, 18 e 19), e de inseto (Figuras 20 e 21). Outro estudo, envolvendo a construção de clones infecciosos com mutações de ponto em E, demonstrou que a substituição V251A por si só, leva à restrição moderada da replicação viral (aproximadamente 100 vezes), em células C6/36 e Vero; e à redução de 25% na detecção de E na imunofluorescência de células C6/36 e BHK-21 transfectadas (KROSCHESKI; SAGRIPANTI; DAVIDSON, 2009). No entanto, diferentemente de nosso vBACMutJ, nesse estudo o vírus mutante pode ser recuperado e utilizado em testes de infectividade, nos quais foi recuperado em quantidades cerca de 10 e 100 vezes menores que o vírus não mutado, no sobrenadante de células C6/36 e Vero, respectivamente.

Envolvendo outra região de E<sub>250-270</sub>, o grupo de Butrapet et al. (2011) relatou, num estudo visando mutações pontuais únicas em resíduos da região da dobradiça de E, que a substituição de G266 ou I270 por triptofano afetou a replicação viral em células de mamíferos e mosquitos, e que a substituição I270W levou também à redução da fusão.

O trabalho de Christian et al.(2013), publicado durante o desenvolvimento deste, avaliou pelo menos uma mutação de ponto isolada em cada um dos aminoácidos de E, identificando resíduos críticos na infectividade viral, mas que não afetariam a expressão e dobramento de E, a montagem do virion ou o brotamento. Nesse contexto, a mutação dos resíduos M258, H259, A265 diminuiu muito ou praticamente extinguiu a replicação viral. Nesse caso, a sugestão foi que os aminoácidos estariam envolvidos na interação tipo “trava” entre as proteínas E e M (interagindo diretamente com V2, H7 e W19 de M), de forma a manter as proteínas juntas nos virions maduros, e desencadear a dissociação no endossomo. Nas condições de baixo pH, a protonação de

H259, assim como de H7 da proteína M, desfaz a interação tipo trava, liberando os dímeros (KOSTYUCHENKO et al., 2013; ZHANG et al., 2013). Os autores sugerem também, que alguns dos resíduos envolvidos nessa “trava” perdem seus contatos quando da dissociação dos dímeros, e formam novos contatos no trímero que seriam fundamentais nos estágios tardios da fusão. Em particular, M258 forma, em conjunto com outros resíduos de E-DII, uma região hidrofóbica que interage com F400 da região *stem* de E, permitindo que esta região aproxime-se aos componentes dos monômeros no trímero (KLEIN; CHOI; HARRISON, 2013).

Embora esses trabalhos contribuam para elucidação do papel dos resíduos de E<sub>250-270</sub> individualmente na infectividade viral, eles não consideram a possibilidade de múltiplas mutações, como as projetadas em nosso trabalho, que podem ter efeito aditivo e sinérgico. Mesmo que não tenha sido possível recuperar o vírus mutante para avaliação da infectividade em outras passagens, a disseminação reduzida de vBACMutJ em células transfectadas de humanos e insetos (Figura 19c e 21c, respectivamente), sugere uma redução da infectividade viral. No entanto, ensaios adicionais serão necessários para determinar qual o efeito dessas mutações nas diversas etapas do ciclo viral.

A modelagem da proteína E contendo as mutações de vBACMutJ, demonstrou que a princípio elas não afetam o dobramento dos monômeros da forma dimérica, mas uma vez que, a maioria dessas mutações foi predita como desestabilizante (Apêndice C), a avaliação da forma como são montadas, e se são montadas, as partículas virais seria necessária. Além disso, a formação das “ilhas” de infecção precisa ser investigada, e o sequenciamento da progênie viral aferido a cada passagem, para identificação de possíveis reversões. Por fim, a partir da elucidação do mecanismo pelo qual as mutações de vBACMutJ afetam o ciclo viral, repetiremos os ensaios para os demais mutantes aqui propostos, sob a perspectiva de determinar o papel de global de E<sub>250-270</sub> na infectividade viral.



## 6 CONCLUSÃO

1. E<sub>250-270</sub> pode ser considerado o segundo peptídeo mais bem conservado da proteína E dos DENV. Além disso, vários de seus resíduos são conservados em outros flavivírus.

2. vBACMutJ apresentou replicação e disseminação reduzidas, em células transfectadas de humanos e insetos, sugerindo que mutações nessa sequência têm implicações importantes na infectividade viral.



## REFERÊNCIAS

- ACOSTA, E. G.; CASTILLA, V.; DAMONTE, E. B. Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. **Cellular microbiology**, v. 11, n. 10, p. 1533–49, out. 2009.
- AGUIRRE, S. et al. DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human STING. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 10, p. e1002934, jan. 2012.
- AKEY, D. L. et al. Flavivirus NS1 Structures Reveal Surfaces for Associations with Membranes and the Immune System. **Science (New York, N.Y.)**, v. 881, 6 fev. 2014.
- ALCARAZ-ESTRADA, S. L.; YOCUPICIO-MONROY, M.; DEL ANGEL, R. M. Insights into dengue virus genome replication. **Future Virology**, v. 5, n. 5, p. 575–592, set. 2010.
- ALHOOT, M. A. et al. Inhibition of dengue virus entry into target cells using synthetic antiviral peptides. **International journal of medical sciences**, v. 10, n. 6, p. 719–29, jan. 2013.
- ALLISON, S. et al. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. **J. Virol.**, v. 69, n. 2, p. 695–700, 1 fev. 1995.
- ARIAS, C. F.; PREUGSCHAT, F.; STRAUSS, J. H. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. **Virology**, v. 193, n. 2, p. 888–99, abr. 1993.
- ASHOUR, J. et al. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. **Journal of virology**, v. 83, n. 11, p. 5408–18, jun. 2009.
- AVIRUTNAN, P. et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. **The Journal of infectious diseases**, v. 193, n. 8, p. 1078–88, 15 abr. 2006.
- AVIRUTNAN, P. et al. Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 187, n. 1, p. 424–33, 1 jul. 2011.

BAERT, L. et al. Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 2, p. 543–6, jan. 2008.

BALSITIS, S. J. et al. Lethal antibody enhancement of dengue disease in mice is prevented by Fc modification. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 2, p. e1000790, fev. 2010.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 25 abr. 2013.

BORDIGNON, J. et al. Dengue neurovirulence in mice: identification of molecular signatures in the E and NS3 helicase domains. **Journal of medical virology**, v. 79, n. 10, p. 1506–17, out. 2007.

BRASIL. Ministério Da Saúde. **Casos de Dengue. Brasil, Grandes regiões e Unidades Federadas. 1997 a 2009.** Disponível em: < [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tab\\_casos\\_dengue\\_bra\\_gr\\_uf\\_97\\_09.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tab_casos_dengue_bra_gr_uf_97_09.pdf) > Acesso em: 10 out. 2011.

\_\_\_\_\_. **Balanco Dengue: Semana Epidemiológica 1 a 39 de 2011.** Disponível em < [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe\\_dengue\\_2011\\_37\\_39.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_2011_37_39.pdf) > Acesso em: 10 out. 2011.

BUTRAPET, S. et al. Amino acid changes within the E protein hinge region that affect dengue virus type 2 infectivity and fusion. **Virology**, v. 413, n. 1, p. 118–27, 25 abr. 2011.

CASTLE, E. et al. Sequence analysis of the viral core protein and the membrane-associated proteins V1 and NV2 of the flavivirus West Nile virus and of the genome sequence for these proteins. **Virology**, v. 145, n. 2, p. 227–36, set. 1985.

CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual review of microbiology**, v. 44, p. 649–88, jan. 1990a.

CHAMBERS, T. J. et al. Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polypeptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 22, p. 8898–902, nov. 1990b.



CHAMBERS, T. J.; MCCOURT, D. W.; RICE, C. M. Yellow fever virus proteins NS2A, NS2B, and NS4B: identification and partial N-terminal amino acid sequence analysis. **Virology**, v. 169, n. 1, p. 100–9, mar. 1989.

CHAMBERS, T. J.; MCCOURT, D. W.; RICE, C. M. Production of yellow fever virus proteins in infected cells: identification of discrete polyprotein species and analysis of cleavage kinetics using region-specific polyclonal antisera. **Virology**, v. 177, n. 1, p. 159–74, jul. 1990.

CHEN, L. H.; WILSON, M. E. Non-Vector Transmission of Dengue and Other Introduction : Flavivirus Transmission. **Dengue Bulletin**, v. 29, p. 18–31, 2005.

CHEN, Y. et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nature medicine**, v. 3, n. 8, p. 866–71, ago. 1997.

CHEN, Y. C.; WANG, S. Y.; KING, C. C. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. **Journal of virology**, v. 73, n. 4, p. 2650–7, abr. 1999.

CHERRIER, M. V et al. Structural basis for the preferential recognition of immature flaviviruses by a fusion-loop antibody. **The EMBO journal**, v. 28, n. 20, p. 3269–3276, 21 out. 2009.

CHRISTIAN, E. A et al. Atomic-level functional model of dengue virus Envelope protein infectivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 46, p. 18662–18667, 12 nov. 2013.

CLUM, S.; EBNER, K. E.; PADMANABHAN, R. Cotranslational membrane insertion of the serine proteinase precursor NS2B-NS3(Pro) of dengue virus type 2 is required for efficient in vitro processing and is mediated through the hydrophobic regions of NS2B. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 49, p. 30715–23, 5 dez. 1997.

COCKBURN, J. J. B. et al. Structural insights into the neutralization mechanism of a higher primate antibody against dengue virus. **The EMBO journal**, v. 31, n. 3, p. 767–779, 1 fev. 2012.

COSTIN, J. M. et al. Mechanistic study of broadly neutralizing human monoclonal antibodies against dengue virus that target the fusion loop. **Journal of virology**, v. 87, n. 1, p. 52–66, jan. 2013.

CRILL, W. D. et al. Humoral immune responses of dengue fever patients using epitope-specific serotype-2 virus-like particle antigens. **PLoS one**, v. 4, n. 4, p. e4991, jan. 2009.

CRILL, W. D.; ROEHRIG, J. T. Monoclonal Antibodies That Bind to Domain III of Dengue Virus E Glycoprotein Are the Most Efficient Blockers of Virus Adsorption to Vero Cells. **Journal of virology**, v. 75, n. 16, p. 7769–7773, 2001.

DAUGHERTY, M. D.; MALIK, H. S. Rules of engagement: molecular insights from host-virus arms races. **Annual review of genetics**, v. 46, p. 677–700, jan. 2012.

DE ALWIS, R. et al. Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex epitopes on dengue virions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 19, p. 7439–7444, 8 maio 2012.

DE BORBA, L. et al. Synergistic interactions between the NS3(hel) and E proteins contribute to the virulence of dengue virus type 1. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 4, p. e1624, jan. 2012.

DEJNIRATTISAI, W. et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. **Science (New York, N.Y.)**, v. 328, n. 5979, p. 745–748, 7 maio 2010.

DEJNIRATTISAI, W.; DUANGCHINDA, T. A complex interplay among virus, dendritic cells, T cells, and cytokines in dengue virus infections. **The Journal of ...**, v. 181, n. 9, p. 5865–5874, 2008.

DENG, Y.-Q. et al. A broadly flavivirus cross-neutralizing monoclonal antibody that recognizes a novel epitope within the fusion loop of E protein. **PLoS one**, v. 6, n. 1, p. e16059, jan. 2011.

DRAKE, J. W.; HOLLAND, J. J. Mutation rates among RNA viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 24, p. 13910–3, 23 nov. 1999.

DUANGCHINDA, T. et al. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. **Proceedings of the**

**National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 39, p. 16922–7, 28 set. 2010.

EDELING, M. A.; DIAMOND, M. S.; FREMONT, D. H. Structural basis of Flavivirus NS1 assembly and antibody recognition.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, p. 1322036111–, 4 mar. 2014.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, p. 1792–1797, 2004.

FALCONAR, A. K. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. **Archives of virology**, v. 142, n. 5, p. 897–916, jan. 1997.

FALGOUT, B. et al. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. **Journal of virology**, v. 65, n. 5, p. 2467–75, maio 1991.

FALGOUT, B.; MARKOFF, L. Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. **Journal of virology**, v. 69, n. 11, p. 7232–43, nov. 1995.

FALGOUT, B.; MILLER, R. H.; LAI, C. J. Deletion analysis of dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: identification of a domain required for NS2B-NS3 protease activity. **Journal of virology**, v. 67, n. 4, p. 2034–42, abr. 1993.

FLAMAND, M. et al. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. **Journal of virology**, v. 73, n. 7, p. 6104–10, jul. 1999.

FRIBERG, H. et al. Cross-reactivity and expansion of dengue-specific T cells during acute primary and secondary infections in humans. **Scientific reports**, v. 1, p. 1–7, jan. 2011a.

FRIBERG, H. et al. Memory CD8+ T cells from naturally acquired primary dengue virus infection are highly cross-reactive. **Immunology and cell biology**, v. 89, n. 1, p. 122–9, jan. 2011b.

GEBHARD, L. G.; KAUFMAN, S. B.; GAMARNIK, A. V. Novel ATP-independent RNA annealing activity of the dengue virus NS3 helicase. **PLoS one**, v. 7, n. 4, p. e36244, jan. 2012.

GORBALENYA, A. E. et al. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. **Nucleic acids research**, v. 17, n. 12, p. 4713–30, 26 jun. 1989.

GUBLER, D. J.; KUNO, G.; MARKOFF, L. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Org.). **Fields Virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1101-1152.

GUIRAKHOO, F.; BOLIN, R. A; ROEHRIG, J. T. The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein. **Virology**, v. 191, n. 2, p. 921–31, dez. 1992.

GUNTHER, V. J. et al. A human challenge model for dengue infection reveals a possible protective role for sustained interferon gamma levels during the acute phase of illness. **Vaccine**, v. 29, n. 22, p. 3895–904, 17 maio 2011.

GUTSCHE, I. et al. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 19, p. 8003–8, 10 maio 2011.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7–16, dez. 2010.

HALSTEAD, S. B. In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. **The Journal of infectious diseases**, v. 140, p. 527–533, 1979.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Flaviviruses and their antigenic structure. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 55, n. 4, p. 289–295, dez. 2012.

HIRAMATSU, K. et al. Mutational analysis of a neutralization epitope on the dengue type 2 virus (DEN2) envelope protein: monoclonal antibody resistant DEN2/DEN4 chimeras exhibit reduced mouse neurovirulence. **Virology**, v. 224, n. 2, p. 437–445, 15 out. 1996.

HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 3, n. 1, p. 19–28, maio 2003.

HUANG, C. Y.-H. et al. The dengue virus type 2 envelope protein fusion peptide is essential for membrane fusion. **Virology**, v. 396, n. 2, p. 305–315, 20 jan. 2010.

JESSIE, K. et al. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. **The Journal of infectious diseases**, v. 189, n. 8, p. 1411–1418, 15 abr. 2004.

JINDADAMRONGWECH, S.; THEPPARIT, C.; SMITH, D. R. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. **Archives of virology**, v. 149, n. 5, p. 915–27, maio 2004.

JOHANSSON, M. et al. A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin-beta and the viral helicase, NS3. **The Journal of general virology**, v. 82, n. Pt 4, p. 735–45, abr. 2001.

KATO, D. et al. Antiviral activity of chondroitin sulphate E targeting dengue virus envelope protein. **Antiviral research**, v. 88, n. 2, p. 236–43, nov. 2010.

KHAN, A. M. et al. Conservation and variability of dengue virus proteins: implications for vaccine design. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 8, p. e272, jan. 2008.

KILLEN, H.; O’SULLIVAN, M. A. Detection of dengue virus by in situ hybridization. **Journal of virological methods**, v. 41, n. 2, p. 135–46, fev. 1993.

KLEIN, D. E.; CHOI, J. L.; HARRISON, S. C. Structure of a dengue virus envelope protein late-stage fusion intermediate. **Journal of virology**, v. 87, n. 4, p. 2287–93, fev. 2013.

KOSTYUCHENKO, V. A et al. Immature and mature dengue serotype 1 virus structures provide insight into the maturation process. **Journal of virology**, v. 87, n. 13, p. 7700–7, jul. 2013.

KROSCHEWSKI, H.; SAGRIPANTI, J.-L.; DAVIDSON, A. D. Identification of amino acids in the dengue virus type 2 envelope glycoprotein critical to virus infectivity. **The Journal of general virology**, v. 90, n. 10, p. 2457–2461, out. 2009.

KUHN, R. J. et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717–725, 8 mar. 2002.

KÜMMERER, B. M.; RICE, C. M. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. **Journal of virology**, v. 76, n. 10, p. 4773–84, maio 2002.

KURANE, I.; JANUS, J.; ENNIS, F. A. Dengue virus infection of human skin fibroblasts in vitro production of IFN-beta, IL-6 and GM-CSF. **Archives of virology**, v. 124, n. 1-2, p. 21–30, jan. 1992.

KUROSU, T. Quasispecies of dengue virus. **Tropical medicine and health**, v. 39, n. 4 Suppl, p. 29–36, dez. 2011.

LAI, C.-Y. et al. Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. **Journal of virology**, v. 82, n. 13, p. 6631–43, jul. 2008.

LEUNG, J. Y. et al. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. **Journal of virology**, v. 82, n. 10, p. 4731–41, maio 2008.

LIN, C.-F. et al. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. **Journal of medical virology**, v. 69, n. 1, p. 82–90, jan. 2003.

LIN, Y.-W. et al. Virus replication and cytokine production in dengue virus-infected human B lymphocytes. **Journal of virology**, v. 76, n. 23, p. 12242–9, dez. 2002.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. **Journal of virology**, v. 71, n. 12, p. 9608–17, dez. 1997.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. **Journal of virology**, v. 73, n. 6, p. 4611–21, jun. 1999.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H. J.; RICE, C. M. **Flaviviridae: The viruses and their replication**. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Org.). *Fields Virology*. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1154-1251.

LIU, W. J.; CHEN, H. B.; KHROMYKH, A. A. Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication. **Journal of virology**, v. 77, n. 14, p. 7804–13, jul. 2003.

LOK, S.-M. et al. Binding of a neutralizing antibody to dengue virus alters the arrangement of surface glycoproteins. **Nature structural & molecular biology**, v. 15, n. 3, p. 312–317, mar. 2008.

LORENZ, I. C. et al. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. **Journal of virology**, v. 76, n. 11, p. 5480–91, jun. 2002.

LUO, D. et al. Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. **Journal of virology**, v. 82, n. 1, p. 173–83, jan. 2008.

MA, L. et al. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 10, p. 3414–9, 9 mar. 2004.

MACKENZIE, J. M. et al. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. **Virology**, v. 245, n. 2, p. 203–15, 5 jun. 1998.

MACKENZIE, J. M.; JONES, M. K.; YOUNG, P. R. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. **Virology**, v. 220, n. 1, p. 232–40, 1 jun. 1996.

MACKENZIE, J. M.; WESTAWAY, E. G. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. **Journal of virology**, v. 75, n. 22, p. 10787–99, 15 nov. 2001.

MACKOW, E. et al. The nucleotide sequence of dengue type 4 virus: analysis of genes coding for nonstructural proteins. **Virology**, v. 159, n. 2, p. 217–28, ago. 1987.

MANDL, C. W. et al. Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses. **Virology**, v. 173, n. 1, p. 291–301, nov. 1989.

MARTINA, B. E. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 4, p. 564–81, out. 2009.

MATHEW, A. et al. B-cell responses during primary and secondary dengue virus infections in humans. **The Journal of infectious diseases**, v. 204, n. 10, p. 1514–1522, 15 nov. 2011.

MATUSAN, A. E. et al. Mutagenesis of the Dengue virus type 2 NS3 protein within and outside helicase motifs: effects on enzyme activity and virus replication. **Journal of virology**, v. 75, n. 20, p. 9633–43, out. 2001.

MENTOR, N. A.; KURANE, I. Dengue virus infection of human T lymphocytes. **Acta Virol**, v. 41, p. 175–176, 1997.

MESSINA, J. P. et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. **Trends in microbiology**, p. 1–9, 24 jan. 2014.

MIDGLEY, C. M. et al. An in-depth analysis of original antigenic sin in dengue virus infection. **Journal of virology**, v. 85, n. 1, p. 410–21, jan. 2011.

MILLER, J. L. et al. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 2, p. e17, 8 fev. 2008.

MILLER, S. et al. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 12, p. 8873–82, 23 mar. 2007.

MILLER, S.; SPARACIO, S.; BARTENSCHLAGER, R. Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 13, p. 8854–63, 31 mar. 2006.

MODIS, Y. et al. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 12, p. 6986–6991, 10 jun. 2003.



MODIS, Y. et al. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 313–319, 22 jan. 2004.

MODIS, Y. et al. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. **Journal of virology**, v. 79, n. 2, p. 1223–1231, jan. 2005.

MONGKOLSAPAYA, J. et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature medicine**, v. 9, n. 7, p. 921–927, jul. 2003.

MORRISON, J. et al. Dengue Virus Co-opts UBR4 to Degrade STAT2 and Antagonize Type I Interferon Signaling. **PLoS Pathogens**, v. 9, 2013.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13–22, jan. 2005.

MULLER, D. A; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral research**, v. 98, n. 2, p. 192–208, maio 2013.

MUÑOZ-JORDAN, J. L. et al. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 24, p. 14333–8, 25 nov. 2003.

NAVARRO-SANCHEZ, E. et al. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. **EMBO reports**, v. 4, n. 7, p. 723–8, jul. 2003.

NEMÉSIO, H.; PALOMARES-JEREZ, F.; VILLALÁIN, J. NS4A and NS4B proteins from dengue virus: membranotropic regions. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1818, n. 11, p. 2818–30, nov. 2012.

NESTOROWICZ, A.; CHAMBERS, T. J.; RICE, C. M. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2A/2B cleavage site: effects on proteolytic processing, viral replication, and evidence for alternative processing of the NS2A protein. **Virology**, v. 199, n. 1, p. 114–23, 15 fev. 1994.

NORMILE, D. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. **Science (New York, N.Y.)**, v. 342, n. 6157, p. 415, 25 out. 2013.

NOWAK, T.; WENGLER, G. Analysis of disulfides present in the membrane proteins of the West Nile flavivirus. **Virology**, v. 156, n. 1, p. 127–37, jan. 1987.

OLIPHANT, T. et al. Antibody recognition and neutralization determinants on domains I and II of West Nile Virus envelope protein. **Journal of virology**, v. 80, n. 24, p. 12149–59, dez. 2006.

PAHO. **Dengue Regional Information: Number of Cases**. Disponível em: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=264&Itemid=363](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=264&Itemid=363) >Acesso em: 10 mar. 2014.

PALMER, D. R. et al. Differential effects of dengue virus on infected and bystander dendritic cells. **Journal of virology**, v. 79, n. 4, p. 2432–9, fev. 2005.

PANG, T.; CARDOSA, M. J.; GUZMAN, M. G. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 1, p. 43–5, jan. 2007.

PAOLINI, C.; DE FRANCESCO, R.; GALLINARI, P. Enzymatic properties of hepatitis C virus NS3-associated helicase. **The Journal of general virology**, v. 81, n. Pt 5, p. 1335–45, maio 2000.

PERERA, R.; KUHN, R. J. Structural proteomics of dengue virus. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 4, p. 369–377, ago. 2008.

PIERSON, T. C. et al. The stoichiometry of antibody-mediated neutralization and enhancement of West Nile virus infection. **Cell host & microbe**, v. 1, n. 2, p. 135–45, 19 abr. 2007.

PREUGSCHAT, F.; STRAUSS, J. H. Processing of nonstructural proteins NS4A and NS4B of dengue 2 virus in vitro and in vivo. **Virology**, v. 185, n. 2, p. 689–697, dez. 1991.

PREUGSCHAT, F.; YAO, C. W.; STRAUSS, J. H. In vitro processing of dengue virus type 2 nonstructural proteins NS2A, NS2B, and NS3. **Journal of virology**, v. 64, n. 9, p. 4364–74, set. 1990.

PRYOR, M. J. et al. Growth restriction of dengue virus type 2 by site-specific mutagenesis of virus-encoded glycoproteins. **The Journal of general virology**, v. 79, n. 11, p. 2631–2639, nov. 1998.

RAY, D. et al. West Nile virus 5'-cap structure is formed by sequential guanine N-7 and ribose 2'-O methylations by nonstructural protein 5. **Journal of virology**, v. 80, n. 17, p. 8362–70, set. 2006.

REY, F. A. et al. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. **Nature**, v. 375, n. 6529, p. 291–8, 25 maio 1995.

RICE, C. M. et al. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. **Science (New York, N.Y.)**, v. 229, n. 4715, p. 726–733, 23 ago. 1985.

RODRIGUEZ-MADOZ, J. R. et al. Inhibition of the type I interferon response in human dendritic cells by dengue virus infection requires a catalytically active NS2B3 complex. **Journal of virology**, v. 84, n. 19, p. 9760–74, out. 2010.

ROOSENDAAL, J. et al. Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein. **Journal of virology**, v. 80, n. 9, p. 4623–32, maio 2006.

ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 8, p. 532–543, ago. 2011.

SABIN, A. B. Research on dengue during World War II. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 1, n. 1, p. 30–50, jan. 1952.

SANTA CATARINA (Estado). Diretoria de Vigilância Epidemiológica. **Programa de Controle de Dengue: Casos e Focos 2013**. Disponível em: <

<[http://vigilantos.dive.sc.gov.br/vigilantos3/dengue\\_relatorio\\_programa/dengue\\_relatorio.pdf?ano=2013&type=pdf](http://vigilantos.dive.sc.gov.br/vigilantos3/dengue_relatorio_programa/dengue_relatorio.pdf?ano=2013&type=pdf)> Acesso em: 10 mar. 2014.

\_\_\_\_\_. **Programa de Controle de Dengue: Casos e Focos 2014**. Disponível em:

<[http://vigilantos.dive.sc.gov.br/vigilantos3/dengue\\_relatorio\\_programa/dengue\\_relatorio.pdf?ano=2014&type=pdf](http://vigilantos.dive.sc.gov.br/vigilantos3/dengue_relatorio_programa/dengue_relatorio.pdf?ano=2014&type=pdf)> Acesso em: 10 mar. 2014.

\_\_\_\_\_. **Nova classificação dos casos de dengue, implantação do Sinan Online e alterações na ficha de investigação de dengue.** Disponível em: <  
[http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/Noticias/2014/Ap\\_nova\\_classif\\_dengue\\_2014.pdf](http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/Noticias/2014/Ap_nova_classif_dengue_2014.pdf) > Acesso em: 15 jun. 2014.

SCHLESINGER, J. J.; BRANDRISS, M. W.; WALSH, E. E. Protection of Mice Against Dengue 2 Virus Encephalitis by Immunization with the Dengue 2 Virus Non-structural Glycoprotein NS1. **Journal of General Virology**, v. 68, n. 3, p. 853–857, 1 mar. 1987.

SCHMIDT, A. G. et al. Small-molecule inhibitors of dengue-virus entry. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002627, jan. 2012.

SCHMIDT, A. G.; YANG, P. L.; HARRISON, S. C. Peptide inhibitors of dengue-virus entry target a late-stage fusion intermediate. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000851, abr. 2010.

SHEPARD, D. S. et al. Economic impact of dengue illness in the Americas. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 84, n. 2, p. 200–7, fev. 2011.

SHIRYAEV, S. A. et al. NS4A regulates the ATPase activity of the NS3 helicase: a novel cofactor role of the non-structural protein NS4A from West Nile virus. **The Journal of general virology**, v. 90, n. Pt 9, p. 2081–5, 1 set. 2009.

SMITH, S. A. et al. The potent and broadly neutralizing human dengue virus-specific monoclonal antibody 1C19 reveals a unique cross-reactive epitope on the bc loop of domain II of the envelope protein. **mBio**, v. 4, n. 6, p. e00873–13, jan. 2013.

STADLER, K. et al. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. **Journal of virology**, v. 71, n. 11, p. 8475–81, nov. 1997.

STIASNY, K. et al. Membrane interactions of the tick-borne encephalitis virus fusion protein E at low pH. **Journal of virology**, v. 76, n. 8, p. 3784–90, abr. 2002.

STIASNY, K.; HEINZ, F. X. Flavivirus membrane fusion. **The Journal of general virology**, v. 87, n. 10, p. 2755–2766, out. 2006.

SUKSANPAISAN, L.; CABRERA-HERNANDEZ, A.; SMITH, D. R. Infection of human primary hepatocytes with dengue virus serotype 2. **Journal of medical virology**, v. 79, n. 3, p. 300–7, mar. 2007.

SUKUPOLVI-PETTY, S. et al. Structure and function analysis of therapeutic monoclonal antibodies against dengue virus type 2. **Journal of virology**, v. 84, n. 18, p. 9227–9239, set. 2010.

SULTANA, H. et al. Fusion loop peptide of the West Nile virus envelope protein is essential for pathogenesis and is recognized by a therapeutic cross-reactive human monoclonal antibody. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 1, p. 650–60, 1 jul. 2009.

SURASOMBATPATTANA, P. et al. Dengue virus replication in infected human keratinocytes leads to activation of antiviral innate immune responses. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 11, n. 7, p. 1664–73, out. 2011.

SUZUKI, R. et al. Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1: characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1. **Virology**, v. 362, n. 2, p. 374–383, 5 jun. 2007.

TAL, M. C. et al. Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 2770–2775, 2009.

TAMBYAH, P. A et al. Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. **The New England journal of medicine**, v. 359, n. 14, p. 1526–7, 2 out. 2008.

TASSANEETRITHEP, B. et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 7, p. 823–9, 7 abr. 2003.

TEOH, E. P. et al. The structural basis for serotype-specific neutralization of dengue virus by a human antibody. **Science translational medicine**, v. 4, n. 139, p. 139ra83, 20 jun. 2012.

THULLIER, P. et al. Mapping of a dengue virus neutralizing epitope critical for the infectivity of all serotypes: insight into the neutralization

mechanism. **The Journal of general virology**, v. 82, n. Pt 8, p. 1885–92, ago. 2001.

UCHIL, P. D.; SATCHIDANANDAM, V. Architecture of the flaviviral replication complex. Protease, nuclease, and detergents reveal encasement within double-layered membrane compartments. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 27, p. 24388–98, 4 jul. 2003.

UMAREDDY, I. et al. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. **The Journal of general virology**, v. 87, n. Pt 9, p. 2605–14, set. 2006.

VALDÉS, K. et al. Human Dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 7, n. 5, p. 856–857, set. 2000.

VAN DER SCHAAR, H. M. et al. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 12, p. e1000244, dez. 2008.

VOGT, M. R. et al. Human monoclonal antibodies against West Nile virus induced by natural infection neutralize at a postattachment step. **Journal of virology**, v. 83, n. 13, p. 6494–507, jul. 2009.

WAHALA, W. M. P. B. et al. Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody. **Virology**, v. 392, n. 1, p. 103–113, 15 set. 2009.

WEI, H.-Y. et al. Dengue virus type 2 infects human endothelial cells through binding of the viral envelope glycoprotein to cell surface polypeptides. **The Journal of general virology**, v. 84, n. Pt 11, p. 3095–8, 1 nov. 2003.

WESTAWAY, E. G.; GOODMAN, M. R. Variation in distribution of the three flavivirus-specified glycoproteins detected by immunofluorescence in infected Vero cells. **Archives of virology**, v. 94, n. 3-4, p. 215–28, jan. 1987.

WHO/TDR. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. New editio ed. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2009. p. 147

WINKLER, G. et al. Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. **Virology**, v. 162, n. 1, p. 187–96, jan. 1988.

WIWANITKIT, V. Unusual mode of transmission of dengue. **Journal of infection in developing countries**, v. 4, n. 1, p. 51–4, jan. 2010.

WU, J. et al. Structure of the Flavivirus helicase: implications for catalytic activity, protein interactions, and proteolytic processing. **Journal of virology**, v. 79, n. 16, p. 10268–77, ago. 2005.

WU, S. J. et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nature medicine**, v. 6, n. 7, p. 816–20, jul. 2000.

XIE, X. et al. Membrane topology and function of dengue virus NS2A protein. **Journal of virology**, v. 87, n. 8, p. 4609–22, abr. 2013.

XU, T. et al. Structure of the Dengue virus helicase/nucleoside triphosphatase catalytic domain at a resolution of 2.4 Å. **Journal of virology**, v. 79, n. 16, p. 10278–88, ago. 2005.

YAMSHCHIKOV, V. F.; COMPANS, R. W. Formation of the flavivirus envelope: role of the viral NS2B-NS3 protease. **Journal of virology**, v. 69, n. 4, p. 1995–2003, abr. 1995.

YAUCH, L. E. et al. A protective role for dengue virus-specific CD8+ T cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 182, n. 8, p. 4865–73, 15 abr. 2009.

YAUCH, L. E. et al. CD4+ T cells are not required for the induction of dengue virus-specific CD8+ T cell or antibody responses but contribute to protection after vaccination. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 185, n. 9, p. 5405–16, 1 nov. 2010.

YOUNG, P. R. et al. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1053–7, mar. 2000.

YU, I. et al. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 319, n. 5871, p. 1834–1837, 28 mar. 2008a.

YU, L. et al. Specific requirements for elements of the 5' and 3' terminal regions in flavivirus RNA synthesis and viral replication. **Virology**, v. 374, n. 1, p. 170–85, 25 abr. 2008b.

ZHANG, W. et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. **Nature structural biology**, v. 10, n. 11, p. 907–912, nov. 2003a.

ZHANG, X. et al. Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. **Nature structural & molecular biology**, v. 20, n. 1, p. 105–10, jan. 2013.

ZHANG, Y. et al. Structures of immature flavivirus particles. **The EMBO journal**, v. 22, n. 11, p. 2604–13, 2 jun. 2003b.

ZHANG, Y. et al. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. **Structure (London, England : 1993)**, v. 12, n. 9, p. 1607–1618, set. 2004.

ZHU, W. et al. Attenuated dengue 2 viruses with deletions in capsid protein derived from an infectious full-length cDNA clone. **Virus research**, v. 126, n. 1-2, p. 226–232, jun. 2007.







## APÊNDICE B - Alinhamento da sequência aminoacídica da proteína E de DENV1-BR/90 com outros flavivírus

```

AAK47569.1|YFV      ARCIGIADRDFIEGVHGGTIVWSATLEQDKKCVTVMAFPDKFSLDISLETVAIDGPFVEARKVC 60
CAA54069.1|TBEV    BRCTHLENRDFVYTGQGTTRVTLVLELGGCVITITABGKPFMDVFLDAIYQENPAKTRREYC 60
ADM27988.1|JEV     FNCILGMGNRDFTEGASGATWVDLVLEGDSDCLTITMAMDKPFLDVRMNIIEASQQLAEVRSYC 60
ABZ10679.1|WNV     FNCILGMGNRDFTEGASGATWVDLVLEGDSDCVTITMSKDKPFLDVRMNIIEASQQLAEVRSYC 60
AAN60367.2|DVL     MRCVGIQNRDFVEGLSGATWVDLVLEHGS CVTITMARNKPTLIDIELLKTETVNPFAVLKRLC 60
      * . * : * * * : * * * * . * . * : * * * : * * : * * . * . *
AAK47569.1|YFV      YNAVLTHTVKINDKCFSTGEAHLAEENEGDMACKRTYSDRGQWQNGCGLFGKGSIVVACAKFT 120
CAA54069.1|TBEV    LHAKLSDTVVAARCFPTMGPATLAKHEHQGCTVCKRDQSDRGQWQNHCGGLFGKGSIVVACAKAA 120
ADM27988.1|JEV     LHAKLSDTVVAARCFPTTGEAHNEKRADESSVFCRQGFTRDQWQNGCGLFGKGSIDTCAKFS 120
ABZ10679.1|WNV     YLAVTVDLSTKALCFPMGGEAHLNEKRADEPAFVCRQGVVDRGQWQNGCGLFGKGSIDTCAKFA 120
AAN60367.2|DVL     IEAKISMTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRGQWQNGCGLFGKGSLLTCAKFK 120
      * . . . * * : * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
AAK47569.1|YFV      CA--KMSLSEFVDQTKIYVIRALQHVQ---AKQENKTKDIXTLK----FDALSGSQEAEF 172
CAA54069.1|TBEV    CEAKKKKATGHVVDANKIVYTVKVEPHTGQDVVAANEHSHGRKTAAS----FTVSSSEKILITM 176
ADM27988.1|JEV     CTSKAIQSMIQPENIKYEVGIFVHGTTISENHGNVSAQVGSQAARFVTVPNAPSITLTKL 180
ABZ10679.1|WNV     CSTKATGRIILKENIKYEVVAISVHGPTTIVESHGSSSTQIGATQAGRFSITPAAPSYTLTKL 180
AAN60367.2|DVL     CVTKLEGGKIVQYENLKYSVIVTVH-TGQDQWQVNETTEHGTIAT----ITPQAPTSEIQL 175
      * . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
AAK47569.1|YFV      TGYGKATLECGVQTAVDFCNSYIAEMEK-----ESWIVDRQWQAQDLTLFWQSGSGC--- 223
CAA54069.1|TBEV    GEYGDVSELLCRVAVSGVDLAQTVILELQKTVHELPTAWQVHRDWFMDLALFWKHEGQA--- 233
ADM27988.1|JEV     GDYGEVTLDOCEFRSGLATEAFYVMTVGS-----KSFVLVHREWFHDLSELPWTSPSST--- 231
ABZ10679.1|WNV     GEYGEVTVDOCEFRSGIDTNAFYVMTVGT-----KTFVLVHREWFMDLNLFPSSSAGST--- 231
AAN60367.2|DVL     TDYCALTLDOCSFRGLDFNEMVLLTKE-----KSWLVHREWFMDLNLFPSSSAGSTSQE 229
      * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * *
AAK47569.1|YFV      VVREMHHLVEFEPFPHARTIRVLAALGDQEGSLKALTGCAMRVTKDNTNDMLYKLGSGEVSC 283
CAA54069.1|TBEV    MWNNAERLVEFGAPHAVKMDVYVNLGDQTCVLLKALAG---VFWAHIEGTYKHLRSGEVTC 290
ADM27988.1|JEV     AMRVRELLMEFEFAHATKQSVVALGSGQGGLLHQALAG---AIVVEYSS-SVKLTSQGLK 287
ABZ10679.1|WNV     AMRVRELLMEFEFAHATKQSVVALGSGQEGALHQALAG---AIVVEFSSVTKLTSQGLK 288
AAN60367.2|DVL     TWRKQDLLVTFKTAHAKKQSEVDRGSGSGSNHSAALAG---AVLQTSQC-TTTIFAGHLK 285
      * . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
AAK47569.1|YFV      RVKLSALTLKGTSYRMCYD-KMSFVKNPYDTGSGCTVVMQVVKVPGK-APCRIPVIVADDLT 341
CAA54069.1|TBEV    EYGLKELKMGKLLTYTMDCKTKPTMKRAPTDSGSDTVVMEVTVFSGT-KPCRIPVRAVAHGS 349
ADM27988.1|JEV     RLKMDKLLKGTTYTGMCTE-KPSFAKNPADTCSGCTVVIELTYSGSDGPKPIPIVSVASLN 346
ABZ10679.1|WNV     RVKMEKLLKGTTYTGMCTE-APKFLRTPADTCSGCTVVIELTYTGTGCRKPIPIVSVASLN 347
AAN60367.2|DVL     RLKMDKLLKGTSYVMCTG-SPKLEKEVAETQSGCTVVLVQVVKYEGTDARCKIPFSTQDEK- 343
      . : . * * * * : * * . : . : * * : * * : * * : * * : * * : * * :
AAK47569.1|YFV      AAINKGIILVTVNPIASTN--DDEVLIENVPPFGDSYIIVGTCGDSRLTYQNHKEGSSIGKL 399
CAA54069.1|TBEV    PDVNVAMLITFNPTEIEN--GD-CPIEMQLPFGDNIIVYV---ELSBQNFQKGGSSIGRV 402
ADM27988.1|JEV     DMTFVGRLYTVNPFVATSSSNKVLVEMEPFGDSYIIVVGRCDRQINHHHWRKAGSTLCKA 406
ABZ10679.1|WNV     DLTFFVGRLYTVNPFVSVATANAKVLIIELEPFPGDSYIIVVGRGQQLNHHHWRKSSGSIQK 407
AAN60367.2|DVL     GVTQNGRLITAMPVITDK--EKPVNIETSEVFGDSYIIVVAGERAKLKLSPFKKGGSSIGRM 401
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
AAK47569.1|YFV      FTQIMKGAERLAVMGDAANDFSSAGCFPTSVCKGIHTVFCASAPQCLFQGLNWIETKVIIG 459
CAA54069.1|TBEV    FQKTKKGIERTLVIGEHANDFGSAGCFPLSSIGKAVHTVLCQAFNSIFQCVGLFKLLLG 462
ADM27988.1|JEV     FSTTLKGAQRLAALGDTANDFSGISGCVFNSIGKAVHQVFGGAPRTLFGQMSWIQQGIMGA 466
ABZ10679.1|WNV     FTTTLKGAQRLAALGDTANDFSGVGGVFTSVGRKAVHQVFGGAPRTLFGQMSWIQQGILGA 467
AAN60367.2|DVL     FEATARGARRMAIILGDIAWDFSGISGCVFVSGKRVLHQVFGGAYGRTLFGQMSWIQKIGIGI 461
      * * * * . * : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
AAK47569.1|YFV      VLIWVQINTRNDTMSMSMILVGVIMFSLGVGA 493
CAA54069.1|TBEV    ALANLGLNDRNPTMSMSFLLAGGLVLAAMTIGVGA 496
ADM27988.1|JEV     LLLWVQVNDARDSIALAFLATGGVLVFLATMVRA 500
ABZ10679.1|WNV     LLLWVQINARDSIALTFLAVGGVLLFLSVMVRA 501
AAN60367.2|DVL     LLLWVQINSRSTLSMTCIAGVGVLYLGVVQVGA 495
      * * * * * * . : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * :

```



## APENDICE C

<b>Predicting the effect of changes in the amino acid sequence of E250-270 - Mordred software</b>											
			Local structural environment of wild-type residue				Local structural environment of mutant residue				
Mutant	Wild-type residue	Residue position in wild-type pdb file	Mutant residue	Secondary structure	Solvent accessibility	Sidechain hydrogen bond satisfaction	Secondary structure	Solvent accessibility	Sidechain hydrogen bond satisfaction	Pseudo DELTA G*	Obs.
G1,I1,L1	V	250	A	extended strand	1.6% (buried)	NO_HBONDS	extended strand	2.5% (buried)	NO_HBONDS	-2.73	This mutation is predicted to be highly destabilizing and cause protein malfunction and disease.
A2,G2,I2,M2	V	251	A	extended strand	58% (partially accessible)	NO_HBONDS	extended strand	73.9% (accessible)	NO_HBONDS	-1.74	This mutation is predicted to be destabilizing and non-disease-associated.
G3,I3,M3	V	252	A	extended strand	21.3% (partially accessible)	NO_HBONDS	extended strand	20.7% (partially accessible)	NO_HBONDS	-1.99	This mutation is predicted to be destabilizing and non-disease-associated.
G4,I4,L4	L	253	A	loop or irregular	46.2% (partially accessible)	NO_HBONDS	loop or irregular	49% (partially accessible)	NO_HBONDS	-1.49	This mutation is predicted to be destabilizing and non-disease-associated.
G5,L5	G	254	A	loop or irregular	95.5% (accessible)	NO_HBONDS	loop or irregular	89.1% (accessible)	NO_HBONDS	-2.21	This mutation is predicted to be highly destabilizing and cause protein malfunction and disease.
G6,I6,M6	S	255	A	loop or irregular	39.4% (partially accessible)	NO_HBONDS	loop or irregular	41.7% (partially accessible)	NO_HBONDS	1.18	This mutation is predicted to be neutral and non-disease-associated.
A7,G7,H7,L7	Q	256	A	loop or irregular	28.1% (partially accessible)	SATURATED	loop or irregular	21.6% (partially accessible)	NO_HBONDS	-0.42	This mutation is predicted to be neutral and non-disease-associated.
A8,B8,G8,H8,I8	E	257	A	alpha helix	33% (partially accessible)	UNSATURATED	alpha helix	27.9% (partially accessible)	NO_HBONDS	0.96	This mutation is predicted to be slightly stabilizing and non-disease-associated.

A9,G9,I9	G	258	A	alpha helix	105.1% (accessible)	NO_HBONDS	alpha helix	99.6% (accessible)	NO_HBONDS	3.88	This mutation is predicted to be highly stabilizing and cause protein malfunction and disease.
G10,M10	A	259	A	-	-	-	-	-	-	-	Alanine in wild-type peptide.
G11,H11,M11	M	260	A	alpha helix	6.3% (buried)	NO_HBONDS	alpha helix	19.6% (partially accessible)	NO_HBONDS	-2.26	This mutation is predicted to be highly destabilizing and cause protein malfunction and disease.
A12,D12,G12,H12,M12	H	261	A	alpha helix	31.8% (partially accessible)	NO_HBONDS	alpha helix	57.2% (partially accessible)	NO_HBONDS	0.77	This mutation is predicted to be slightly stabilizing and non-disease-associated.
A13,G13,H13,M13	T	262	A	alpha helix	90.8% (accessible)	SATURATED	alpha helix	83.7% (accessible)	NO_HBONDS	1.96	This mutation is predicted to be stabilizing and non-disease-associated.
G14,L14	A	263	A	-	-	-	-	-	-	-	Alanine in wild-type peptide
G15,I15,L15	L	264	A	loop or irregular	1% (buried)	NO_HBONDS	loop or irregular	3.7% (buried)	NO_HBONDS	-2.77	This mutation is predicted to be highly destabilizing and cause protein malfunction and disease.
A16,D16,G16,I16,M16	T	265	A	h-bonded turn	92.6% (accessible)	SATURATED	h-bonded turn	87.2% (accessible)	NO_HBONDS	-0.20	This mutation is predicted to be neutral and non-disease-associated.
G17,L17	G	266	A	h-bonded turn	69.9% (accessible)	NO_HBONDS	h-bonded turn	75.5% (accessible)	NO_HBONDS	-2.35	This mutation is predicted to be highly destabilizing and cause protein malfunction and disease.
G18,I18,M18	A	267	A	-	-	-	-	-	-	-	Alanine in wild-type peptide.
G19,I19,M19	T	268	A	bend	42% (partially accessible)	NO_HBONDS	bend	46.3% (partially accessible)	NO_HBONDS	2.18	This mutation is predicted to be highly stabilizing and cause protein malfunction and disease.
A20,B20,D20,G20,I20,M20	E	269	A	residue in isolated beta-bridge	42% (partially accessible)	UNSATURATED	residue in isolated beta-bridge	38.3% (partially accessible)	NO_HBONDS	1.03	This mutation is predicted to be stabilizing and non-disease-associated.

G21,I21,M21	I	270	A	loop or irregular	3.4% (buried)	NO_HBONDS	loop or irregular	7.1% (buried)	NO_HBONDS	-2.48	This mutation is predicted to be highly destabilizing and cause protein malfunction and disease.
C8	E	257	K	alpha helix	33% (partially accessible)	UNSATURATED	alpha helix	45.9% (partially accessible)	NO_HBONDS	-0.60	This mutation is predicted to be slightly destabilizing and non-disease-associated.
C20	E	269	K	residue in isolated beta-beta bridge	42% (partially accessible)	UNSATURATED	residue in isolated beta-beta bridge	70.5% (accessible)	NO_HBONDS	-1.59	This mutation is predicted to be destabilizing and non-disease-associated.
E2	V	251	T	extended strand	58% (partially accessible)	NO_HBONDS	extended strand	67.1% (accessible)	NO_HBONDS	-1.06	This mutation is predicted to be destabilizing and non-disease-associated.
E7	Q	256	E	loop or irregular	28.1% (partially accessible)	SATURATED	loop or irregular	27.4% (partially accessible)	UNSATURATED	-0.46	This mutation is predicted to be neutral and non-disease-associated.
E12	H	261	K	alpha helix	31.8% (partially accessible)	NO_HBONDS	alpha helix	71.6% (accessible)	UNSATURATED	-1.21	This mutation is predicted to be destabilizing and non-disease-associated.
F2	V	251	K	extended strand	58% (partially accessible)	NO_HBONDS	extended strand	80.1% (accessible)	SATURATED	-2.26	This mutation is predicted to be highly destabilizing and cause protein malfunction and disease.
F13	T	262	K	alpha helix	90.8% (accessible)	SATURATED	alpha helix	92.7% (accessible)	SATURATED	0.98	This mutation is predicted to be slightly stabilizing and non-disease-associated.
F16	T	265	K	h-bonded turn	92.6% (accessible)	SATURATED	h-bonded turn	96.4% (accessible)	SATURATED	-1.59	This mutation is predicted to be destabilizing and non-disease-associated.
N2	V	251	M	extended strand	58% (partially accessible)	NO_HBONDS	extended strand	57.5% (partially accessible)	NO_HBONDS	-0.38	This mutation is predicted to be neutral and non-disease-associated.

N3	V	252	A	extended strand	21.3% (partially accessible)	NO_HBONDS	extended strand	20.7% (partially accessible)	NO_HBONDS	-1.99	This mutation is predicted to be destabilizing and non-disease-associated. The same of G3
N11	M	260	L	alpha helix	6.3% (buried)	NO_HBONDS	alpha helix	6.7% (buried)	NO_HBONDS	-0.01	This mutation is predicted to be neutral and non-disease-associated
N13	T	262	Q	alpha helix	90.8% (accessible)	SATURATED	alpha helix	88.3% (accessible)	UNSATURATED	0.71	This mutation is predicted to be slightly stabilizing and non-disease-associated
N16	T	265	A	h-bonded turn	92.6% (accessible)	SATURATED	h-bonded turn	87.2% (accessible)	NO_HBONDS	-0.20	This mutation is predicted to be neutral and non-disease-associated. The same of A16
N19	T	268	I	bend	42% (partially accessible)	NO_HBONDS	bend	35.7% (partially accessible)	NO_HBONDS	2.35	This mutation is predicted to be highly stabilizing and cause protein malfunction and disease.
N20	E	269	P	residue in isolated beta-beta bridge	42% (partially accessible)	UNSATURATED	residue in isolated beta-beta bridge	48.3% (partially accessible)	NO_HBONDS	0.34	This mutation is predicted to be neutral and non-disease-associated
N21	I	270	V	loop or irregular	3.4% (buried)	NO_HBONDS	loop or irregular	8.4% (buried)	NO_HBONDS	-1.48	This mutation is predicted to be destabilizing and non-disease-associated
O2	V	251	Y	extended strand	58% (partially accessible)	NO_HBONDS	extended strand	79.8% (accessible)	NO_HBONDS	-0.33	This mutation is predicted to be neutral and non-disease-associated
O3	V	252	N	extended strand	21.3% (partially accessible)	NO_HBONDS	extended strand	33.9% (partially accessible)	UNSATURATED	-3.49	This mutation is predicted to be highly destabilizing and cause protein malfunction and disease.
O6	S	255	D	loop or irregular	39.4% (partially accessible)	NO_HBONDS	loop or irregular	37.1% (partially accessible)	UNSATURATED	-0.10	This mutation is predicted to be neutral and non-disease-associated
O8	E	257	T	alpha helix	33% (partially accessible)	UNSATURATED	alpha helix	46% (partially accessible)	NO_HBONDS	-1.29	This mutation is predicted to be destabilizing and non-disease-associated



O10	A	259	V	alpha helix	58.2% (partially accessible)	NO_HBONDS	alpha helix	73.5% (accessible)	NO_HBONDS	-0.38	This mutation is predicted to be neutral and non-disease-associated
O11	M	260	L	alpha helix	6.3% (buried)	NO_HBONDS	alpha helix	6.7% (buried)	NO_HBONDS	-0.01	This mutation is predicted to be neutral and non-disease-associated
O12	H	261	L	alpha helix	31.8% (partially accessible)	NO_HBONDS	alpha helix	57% (partially accessible)	NO_HBONDS	2.24	This mutation is predicted to be highly stabilizing and cause protein malfunction and disease.
O13	T	262	K	alpha helix	90.8% (accessible)	SATURATED	alpha helix	92.7% (accessible)	SATURATED	0.98	This mutation is predicted to be slightly stabilizing and non-disease-associated
O16	T	265	A	h-bonded turn	92.6% (accessible)	SATURATED	h-bonded turn	87.2% (accessible)	NO_HBONDS	-0.20	This mutation is predicted to be neutral and non-disease-associated. The same of A16
O18	A	267	V	loop or irregular	52% (partially accessible)	NO_HBONDS	loop or irregular	41% (partially accessible)	NO_HBONDS	-0.07	This mutation is predicted to be neutral and non-disease-associated
O19	T	268	P	bend	42% (partially accessible)	NO_HBONDS	bend	43.4% (partially accessible)	NO_HBONDS	0.17	This mutation is predicted to be neutral and non-disease-associated
O20	E	269	V	residue in isolated beta-bridge	42% (partially accessible)	UNSATURATED	residue in isolated beta-bridge	48.2% (partially accessible)	NO_HBONDS	0.76	This mutation is predicted to be slightly stabilizing and non-disease-associated
O21	I	270	A	loop or irregular	3.4% (buried)	NO_HBONDS	loop or irregular	7.1% (buried)	NO_HBONDS	-2.48	This mutation is predicted to be highly destabilizing and cause protein malfunction and disease.

\*The stability score (PSEUDO Delta Delta G) indicate the predicted effect of the mutation on protein stability. A negative score indicates that the mutation is destabilizing whereas a positive score indicates that the mutation is stabilizing.