

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

LAÍS RODRIGUES MOURA

**DENGUE: DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS MOLECULARES E CARACTERIZAÇÃO DE
CEPAS VIRAIS QUANTO A INIBIÇÃO DA SINALIZAÇÃO DO INTERFERON DO TIPO-I (IFN-I)**

RECIFE
2014

LAÍS RODRIGUES MOURA

**DENGUE: DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS MOLECULARES E CARACTERIZAÇÃO DE
CEPAS VIRAIS QUANTO A INIBIÇÃO DA SINALIZAÇÃO DO INTERFERON DO TIPO I (IFN-I)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de
Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz,
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dr^a Laura Helena Vega Gonzales Gil

RECIFE
2014

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

M929d Moura, Laís Rodrigues.
Dengue: desenvolvimento de ferramentas moleculares e caracterização de cepas virais quanto a inibição da sinalização do Interferon do tipo I (IFN-I) / Laís Rodrigues Moura. - Recife: s.n, 2014.
63 p. : ilus., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2014.
Orientadora: Laura Helena Vega Gonzales Gil.

1. Interferon do tipo I - imunologia. 2. Gene repórter - genética. 3. Vírus da dengue – imunologia. 4. Vírus da dengue – genética. 1. Gil, Laura Helena Vega Gonzales. II. Título.

CDU 578.833.2

LAÍS RODRIGUES MOURA

**DENGUE: DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS MOLECULARES E CARACTERIZAÇÃO DE
CEPAS VIRAIS QUANTO A INIBIÇÃO DA SINALIZAÇÃO DO INTERFERON DO TIPO I (IFN-I)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 31 / 07 / 2014

BANCA EXAMINADORA

Dra. Valéria Pereira
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM
Departamento de Imunologia

Dr. Tereza Magalhães
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM
Departamento de Virologia
Laboratório de Virologia e Terapia Experimental - LaViTE

Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM
Departamento de Virologia
Laboratório de Virologia e Terapia Experimental - LaViTE
(Orientadora)

A meus pais, minha irmã e meu sobrinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço antes de tudo a Deus por ter me dado forças e iluminando meu caminho para que pudesse concluir mais uma etapa da minha vida;

A meus pais por todo amor e dedicação, por todos os momentos em que estiveram ao meu lado, me apoiando e me fazendo acreditar que nada é impossível. São, sem dúvida, meu exemplo; a minha irmã, que apesar dos momentos difíceis vividos, sei que posso contar em todos os momentos e ainda nos presenteou com o amor mais puro que pode existir nos dando nosso príncipe, meu gordinho, Gabriel;

Aos meus amigos de perto e aqueles que não estão tão perto assim, mas que estão sempre presentes de alguma forma, meu muito obrigada pelo carinho, companheirismo, por estarem sempre comigo me ouvindo muitas vezes reclamar, mas que nunca deixaram de me apoiar;

A minha orientadora, Laura Gil, por todo ensino e dedicação, por ter me ajudado muito nesses dois anos de muito trabalho, sou muito grata por ter confiado em mim;

A todos que fazem parte do LaViTE pela amizade, conversas e dicas. Aos meus 'co-coris' Valter e Amanda, por terem passado tanto tempo me ajudando e pensando junto comigo em tantos momentos durante meu trabalho; a Deo, que desde a iniciação científica está sempre disposto a ajudar; a Maya, companheira de bancada, depois 'minha técnica', mas acima de tudo minha amiga, dentro e fora do laboratório, uma amiga que eu fiz na profissão, mas que levo pra vida; a Ju, sempre comigo, a vida tenta separar a gente, mas sempre damos um jeito de nos encontrar de novo; a todos presentes no LV, Verônica, Diégina, Kennya, Jana, Bruna, Débora, Brena, Renato, Cheysa, Clintiano e aos que já passaram, mas que eu tive o prazer em conhecer;

Aos meus amigos Elisa, Lígia e Sávio, sem vocês comigo essa trajetória seria mais difícil, meu muito obrigada por estarem sempre comigo nos momentos difíceis e pelas risadas juntos. Aprendi muito, com cada um e sei que fiz amigos pra vida inteira. É sempre melhor 'together';

Por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse realizado.

MOURA, Laís Rodrigues. **Dengue**: Desenvolvimento de ferramentas moleculares e caracterização de cepas virais quanto a inibição da sinalização do Interferon do tipo I (IFN-I). 2014. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

RESUMO

A infecção pelo vírus da dengue é um problema de saúde pública global que põe em risco cerca de 2,5 bilhões de pessoas no mundo, com uma incidência de 50-100 milhões de casos resultando em cerca de 24.000 mortes por ano. Os mecanismos envolvidos na resposta imune inata atuam imediatamente após o contato do hospedeiro com os antígenos virais, levando à secreção de interferon do tipo I (IFN-I), a principal citocina envolvida na resposta antiviral. Entender como o sistema IFN-I é inibido em células infectadas pelo vírus dengue pode fornecer valiosas informações sobre a patogênese da doença. Propomos neste estudo analisar a inibição da via de sinalização do IFN-I por diferentes cepas isoladas no estado de Pernambuco, assim como o desenvolvimento de um vírus recombinante da dengue expressando a proteína *Gaussia* luciferase, para estudos futuros de replicação e imunopatogênese. A fim de estudar a via de sinalização do IFN-I, foram selecionadas cepas dos quatro sorotipos de dengue para crescimento, concentração e titulação viral. Foi utilizada a linhagem celular BHK-21-ISRE-Luc-Hygro que expressa o gene *firefly* luciferase fusionado a um promotor induzido pelo IFN-I (ISRE – *Interferon Stimulated Response Element*). Observamos que todos os sorotipos em estudo foram capazes de inibir, em diferentes proporções, a resposta ou sinalização do IFN-I. Com o intuito de auxiliar as pesquisas em dengue, desenvolvemos um vírus repórter de dengue expressando o gene repórter da *Gaussia* luciferase. Células transfectadas com o transcrito *in vitro* de um dos clones resultou em imunofluorescência positiva, porém não houve recuperação de partículas infectivas. Outros clones deverão ser testados para recuperação de vírus recombinante repórter. Juntos, os dados da caracterização das cepas em estudo e a recuperação de partículas infectivas da construção realizada neste trabalho deverão contribuir para as pesquisas em imunopatogênese, replicação viral e desenvolvimento de antivirais contra o dengue.

Palavras-chave: dengue, sinalização do IFN-I, vírus repórter.

MOURA, Laís Rodrigues. **Dengue**: development of molecular tools and characterization of viral strains inhibition of signaling as the type I interferon (IFN-I). 2014. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

ABSTRACT

Dengue virus infection is a global public health problem that threatens about 2.5 billion people worldwide with an incidence of 50-100 million cases, resulting in about 24,000 deaths per year. The mechanisms involved in the innate immune response act immediately upon host contact with viral antigens leading to the secretion of type I interferon (IFN-I), the main cytokine involved antiviral response. Understanding how the IFN-I system is inhibited in dengue virus-infected cells can provide valuable information about the pathogenesis of the disease. We propose in this study to analyze the inhibition of the IFN-I signaling pathway by different strains isolated in Pernambuco state, as well as the development of a recombinant dengue virus expressing Gaussia luciferase protein for future studies on replication and immunopathogenesis. In order to study the signaling pathway of IFN-I, we selected different strains of all four dengue serotypes for growth, concentration and viral titration. For this, the cell line BHK-21-Hygro-ISRE-Luc that expresses firefly luciferase gene fused to a promoter induced by IFN-I (ISRE - Interferon Stimulated Response Element) was used. We observed that all serotypes in the study were able to inhibit, in different levels, the response or IFN-I signaling. In order to assist in dengue research, we developed a reporter dengue virus expressing Gaussia luciferase reporter gene. Cells transfected with *in vitro* transcript from one of the clones resulted in positive immunofluorescence, but not on generation of infective particles. Other clones should be tested for recovery of recombinant reporter virus. Together, the data from the characterization of the strains and recovery of infective particles of the construction performed in this work should contribute to the research on dengue immunopathogenesis, viral replication and development of antivirals against dengue.

Key words: dengue, IFN-I signaling, reporter virus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Países/áreas de risco para transmissão da dengue.	16
Figura 2	Indução e sinalização do INF-I.	21
Figura 3	Inibição da indução do INF-I pelo DENV.	24
Figura 4	Inibição da via de sinalização do IFN-I pelo DENV.	25
Figura 5	Organização genômica dos flavivírus e suas proteínas virais.	26
Figura 6	Ciclo replicativo dos flavivírus.	29
Figura 7	Estratégia de construção do vírus da dengue recombinante pSVJS01-IC-DENV2GLuc.	38
Figura 8	Representação esquemática da localização dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos recombinantes.	39
Figura 9	Confirmação da construção vírus recombinante pSVJS01-IC-DENV2GLuc por recombinação homóloga em levedura.	47
Figura 10	Representação esquemática da organização genômica do vírus pSVJS01-IC-DENV2GLuc e localização dos oligonucleotídeos utilizados para a confirmação da construção.	47
Figura 11	Amplificação completa do genoma dos clones confirmados.	48
Figura 12	Imunofluorescência indireta (IFI) em células BHK21 infectadas pelo clone 5, na primeira passagem.	49

LISTA DE QUADROS

Tabela 1	Amostras de DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4 isoladas em Pernambuco	35
Tabela 2	Oligonucleotídeos utilizados na construção pSVJS01-IC-DENV2GLuc	40

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** Atividade da luciferase em células da linhagem BHK-21-ISRE-Luc-Hygro infectadas com diferentes cepas do DENV1 e tratadas durante 8 horas com 2000UI/MI de IFN α . 45
- Gráfico 2** Atividade da luciferase em células da linhagem BHK-21-ISRE-Luc-Hygro infectadas com diferentes cepas do DENV2 e tratadas durante 8 horas com 2000UI/MI de IFN α . 45
- Gráfico 3** Atividade da luciferase em células da linhagem BHK-21-ISRE-Luc-Hygro infectadas com diferentes cepas do DENV3 e tratadas durante 8 horas com 2000UI/MI de IFN α . 46
- Gráfico 4** Atividade da luciferase em células da linhagem BHK-21-ISRE-Luc-Hygro infectadas com diferentes cepas do DENV4 e tratadas durante 8 horas com 2000UI/MI de IFN α . 46

LISTA DE ABREVIATURAS

ADE	<i>Antibody-Dependent Enhancement</i>
BHK-21	<i>Baby Hamster Kidney Cells</i>
C	Capsídeo
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DC	Dengue clássica
DCC	Dengue Clássica Complicada
DENV	Vírus dengue
DENV1	Sorotipo 1 do vírus dengue
DENV2	Sorotipo 2 do vírus dengue
DENV3	Sorotipo 3 do vírus dengue
DENV4	Sorotipo 4 do vírus dengue
DENV5	Sorotipo 5 do vírus dengue
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dsRNA	<i>Double-stranded RNA</i>
E	Envelope
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FHD	Febre Hemorrágica da Dengue
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IFNAR	<i>Type I IFN receptor</i>
IFN- α	Interferon alfa
IFN- β	Interferon beta
IFN-I	Interferon tipo I
IL-10	Interleucina 10
ISRE	<i>Interferon Stimulated Response Element</i>
JEV	<i>Japanese Encephalitis Virus</i>
Kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
LaViTE	Laboratório de Virologia e Terapia Experimental
M	Membrana
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>

MHC-I	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
mRNA	RNA mensageiro
NK	<i>Natural Killer</i>
NS	<i>Nonstructural Protein</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PKR	<i>Protein kinase R</i>
prM	Pré-membrana
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
SCD	Síndrome de Choque da Dengue
SE	Semana Epidemiológica
SFB	Soro Fetal Bovino
STING	<i>Stimulator of the interferon gene</i>
TLR	<i>Toll Like Receptors</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
WNV	<i>West Nile Virus</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL	16
2.1 Aspectos epidemiológicos e histórico da dengue	16
2.2 Formas clínicas	19
2.3 Imunopatologia da dengue hemorrágica	20
2.4 Resposta imune inata na infecção pelo DENV	20
2.4.1 <i>Evasão viral</i>	22
2.5 Vírus Dengue	25
2.5.1 <i>Replicação viral</i>	28
2.6 Sistemas de genética reversa em flavivírus	29
2.6.1 <i>Vírus repórteres</i>	30
3 JUSTIFICATIVA	32
4 OBJETIVOS	33
4.1 Geral	33
4.2 Específicos	33
5 MATERIAIS E MÉTODOS	34
5.1 Cultivo de células	34
5.2 Cultivo de vírus	34
5.3 Concentração viral	36
5.4 Titulação viral	36
5.5 Estudo da via de sinalização do IFN-I em células infectadas com diferentes cepas isoladas do DENV	37
5.6 Construção do vírus recombinante pSVJS01-IC-DENV2GLuc	38
5.6.1 <i>Preparação do vetor</i>	38
5.6.2 <i>Reação de PCR para recombinação</i>	39
5.6.3 <i>Transformação em levedura</i>	40
5.6.4 <i>Extração de DNA plasmidial de levedura e confirmação dos clones</i>	41
5.7 Recuperação do vírus recombinante pSVJS01-IC-DENV2GLuc	41
5.7.1 <i>Amplificação do genoma completo do vírus recombinante por PCR e transcrição in vitro</i>	41
5.7.2 <i>Transfecção do RNA viral em células BHK21 por eletroporação</i>	42
5.7.3 <i>Imunofluorescência indireta</i>	42

5.7.4 <i>Mensuração da atividade da Gaussia luciferase</i>	42
6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	43
7 RESULTADOS	44
7.1 Estudo da via de sinalização do IFN-I em células infectadas com diferentes cepas isoladas do DENV	44
7.2 Construção e confirmação do vírus recombinante pSVJS01-IC-DENV2GLuc	47
7.3 Recuperação da partícula viral e caracterização fenotípica <i>in vitro</i> do vírus Recombinante	48
7.3.1 <i>Recuperação da partícula viral</i>	48
7.3.2 <i>Replicação viral</i>	48
7.3.3 <i>Mensuração da atividade de Gaussia Luciferase</i>	49
8 DISCUSSÃO	50
9 CONCLUSÕES	53
10 PERSPECTIVAS	54
REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

A dengue é considerada um problema de saúde pública de proporções globais. De acordo com a OMS, durante os últimos 50 anos, a incidência da dengue aumentou 30 vezes e estima-se que 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas endêmicas espalhadas por mais de 100 países (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012). Apesar dos avanços, não há vacina ou terapia antiviral disponível contra o vírus dengue (DENV). Somado a isso, muitos aspectos da biologia viral ainda não são bem compreendidos (RUGGLI; RICE, 1999).

Na infecção pelo vírus DENV a grande maioria dos casos clínicos apresentam um quadro clínico autolimitado benigno conhecido como dengue clássica (DC). Em uma menor proporção a doença evolui para uma forma mais grave denominada de febre hemorrágica da dengue (FHD), caracterizada pelo aumento da permeabilidade capilar, extravasamento de plasma e anormalidades homeostáticas que podem progredir para insuficiência circulatória e choque (GLUBLER, 1998).

Para infectar o hospedeiro de forma eficiente, o DENV deve primeiramente evadir da resposta imunológica inata, a qual é iniciada pela resposta do IFN-I (AGUIRRE *et al.*, 2012). Utilizando diferentes estratégias, o vírus DENV consegue inibir a resposta imune inata do hospedeiro: a primeira é a evasão da interação dos PAMPs (Padrões moleculares associados a patógenos) com o PRRs (Receptores de reconhecimento padrão) celulares e a segunda é através da inibição das diferentes etapas da resposta imune inata por meio da expressão de moléculas antagonistas que bloqueiam diretamente as vias intracelulares que conduzem à produção e sinalização de IFN-I (MORRISON; AGUIRRE; FERNANDEZ-SESMA, 2012).

Nos últimos anos, o aperfeiçoamento de técnicas de biologia molecular tem permitido o desenvolvimento de vírus repórteres para DENV (SCHOGGINS *et al.*, 2012; ZOU *et al.*, 2011). Estes repórteres, feitos através da clonagem de genes repórteres nos clones infecciosos, vêm ajudando a elucidar importantes aspectos da patogenia, ciclo viral, (LEUNG *et al.*, 2008; LINDENBACH; RICE, 1999; MATUSAN *et al.*, 2001; PATKAR; KUHN, 2008), no esclarecimento de mecanismos de evasão da resposta imunológica (RUGGLI; RICE, 1999), bem como o desenvolvimento de vacinas e a triagem de drogas antivirais (ROSSI *et al.*, 2005; NG *et al.*, 2007).

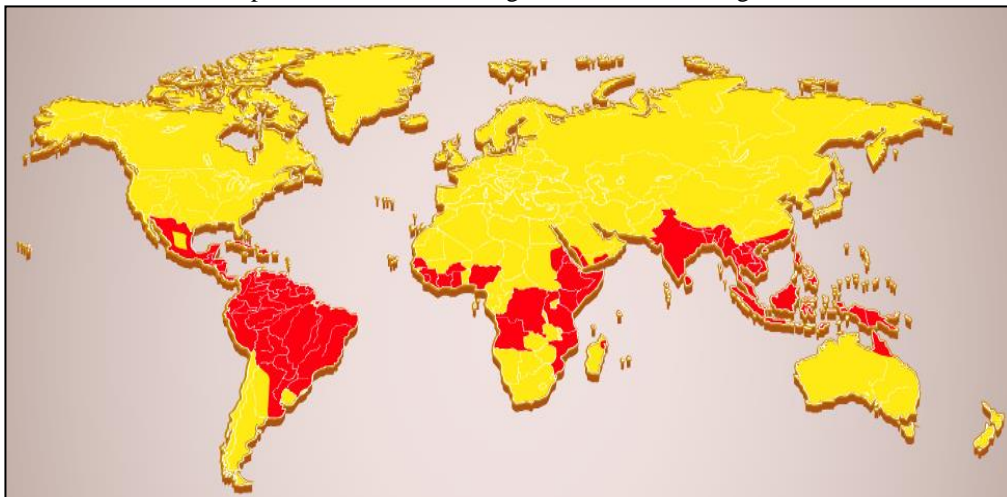
Com o intuito de auxiliar as pesquisas do dengue, neste trabalho realizamos a construção de um vírus repórter de dengue e caracterizamos diferentes cepas isoladas no estado de Pernambuco quanto à sua capacidade em inibir a sinalização do IFN-I.

2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

2.1 Aspectos epidemiológicos e histórico da dengue

A dengue é uma doença infecciosa de rápida propagação causada pelo vírus dengue (DENV), um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, que apresenta quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV1 a 4) (CLYDE *et al.*, 2006). De acordo com a OMS, durante os últimos 50 anos, a incidência da dengue aumentou 30 vezes e estima-se que 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas endêmicas espalhadas por mais de 100 países, constituindo-se um grave problema de saúde pública (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012) (Figura 1).

Figura 1 - Países/áreas de risco para transmissão da dengue. Em vermelho, regiões endêmicas.



Fonte: Ministério da Saúde (BRASIL, 2010).

A transmissão do vírus é feita por mosquitos do gênero *Aedes*, sendo a espécie *Aedes aegypti* a mais importante na transmissão da doença, por isso o controle de sua reprodução é considerado assunto de saúde pública. *Aedes albopictus* é o vetor de manutenção da dengue na Ásia, mas, até o momento não foi associado à transmissão da dengue nas Américas. Fatores como a urbanização acelerada, facilidades de transporte entre regiões e falência dos programas de controle do *A. aegypti* favorecem o aumento da transmissão da dengue (SCHATZMAYR, 2000; TAUIL, 2001, 2002).

O relato mais antigo sugerindo a ocorrência da dengue foi documentado na enciclopédia chinesa publicada durante a dinastia Chin (265 a 420 d.C.) (TEIXEIRA; BARRETO; GUERRA, 1999).

MOURA, L. R.

Nas Américas, a primeira referência segura sobre a dengue foi feita por Benjamin Rush sobre uma epidemia na Filadélfia em 1780. No final do século XIX, a dengue já era reconhecida como uma doença de costas, portos e cidades. Embora manifestações hemorrágicas já tivessem sido registradas em surtos em áreas não endêmicas na década de 20, foi somente nos anos 50 que a febre hemorrágica da dengue foi reconhecida como uma forma nova e mais grave da doença (TEIXEIRA; BARRETO; GUERRA, 1999).

Albert Sabin isolou pela primeira vez o vírus da dengue sorotipo 1 na área do mediterrâneo, durante a II Guerra Mundial, de soldados americanos provenientes do Havaí, e o sorotipo 2 na região do Pacífico (SABIN, 1952). Posteriormente, foram isolados os sorotipos 3 e 4 em 1956, nas Filipinas (HAMMON *et al.*, 1973).

Na década de 50 a febre hemorrágica da dengue (FHD) foi descrita pela primeira vez nas Filipinas e Tailândia (FERSH, 1969). Após a década de 60, a circulação do vírus da dengue intensificou-se nas Américas. A partir de 1963, houve circulação comprovada dos sorotipos DENV2 e DENV3 em vários países. Em 1977 o sorotipo DENV1 foi introduzido nas Américas, inicialmente pela Jamaica. A partir de 1980, foram notificadas epidemias em vários países aumentando consideravelmente a magnitude do problema. A FHD que afetou Cuba, em 1981, é considerada como evento de extrema importância na história da dengue nas Américas. Essa epidemia foi causada pelo sorotipo DENV2, tendo sido o primeiro relato de febre hemorrágica da dengue ocorrido fora do Sudeste Asiático e do Pacífico Ocidental. O segundo surto ocorreu na Venezuela, em 1989 (BRASIL, 2009).

No Brasil, a introdução sequencial de diferentes sorotipos do vírus da dengue contribuiu para a incidência desta doença. Em 1981, os sorotipos DENV1 e DENV4 foram os primeiros a serem isolados em uma epidemia de dengue ocorrida em Boa Vista, Estado de Roraima (OSANAI, 1984). Após um silêncio epidemiológico, o sorotipo DENV1 invadiu o Sudeste (Rio de Janeiro e Minas Gerais) e algumas áreas urbanas no Nordeste (Alagoas, Ceará, Pernambuco, Bahia) também foram afetadas em 1986-1987 (DONALÍSIO, 1999; SCHATZMAYR *et al.*, 1986), espalhando-se pelo país. Desde então, ocorreram entradas dos sorotipos DENV2 em 1990-1991 (NOGUEIRA *et al.*, 1991) e o DENV3, no estado do Rio de Janeiro (2000) (NOGUEIRA *et al.*, 2001).

Em 2002, foi observada a maior incidência da doença até então, quando foram confirmados cerca de 697.000 casos, refletindo a introdução do sorotipo 3. Essa epidemia levou a uma rápida dispersão do DENV3 para outros estados, sendo que, em 2004, 23 dos 27 estados do país já apresentavam a circulação simultânea dos sorotipos 1, 2 e 3 do vírus da dengue. Os adultos jovens foram os mais atingidos pela doença desde a introdução do vírus

MOURA, L. R.

no país. No entanto, a partir de 2006, alguns estados apresentaram a recirculação do sorotipo 2, após alguns anos de predomínio do DENV3. Esse cenário levou a um aumento no número de casos, de formas graves e de hospitalizações em crianças, principalmente no Nordeste do país. Em 2008, novas epidemias causadas pelo DENV2 ocorreram em diversos estados do país. Essas epidemias foram caracterizadas por um padrão de gravidade em crianças, que representaram mais de 50% dos casos internados nos municípios de maior contingente populacional (BRASIL, 2009).

O vírus dengue tipo 4 foi reintroduzido no Brasil em 2010, quando surgiram os primeiros casos na região Norte do país, nos estados de Roraima, Pará e Amazonas. Antes disso, há 28 anos não se detectava esse sorotipo no território brasileiro (SOUZA *et al.*, 2011). Cerca de 60% dos casos de dengue no ano de 2013, no Brasil, foi em decorrência de uma maior circulação do sorotipo 4 (BRASIL, 2013b).

Em 2014 foram registrados 394.614 casos de dengue no país até a 18ª semana epidemiológica (SE) (27/04 a 03/05). A região Sudeste teve o maior número de casos (225.401 casos; 57,1%), seguida das regiões Centro-Oeste (79.998 casos; 20,3%), Nordeste (35.625 casos; 9,0%), Sul (31.291 casos; 7,9%) e Norte (22.299 casos; 5,7%). Na análise comparativa em relação ao ano de 2013, observa-se redução de 67,6% dos casos no país. As proporções dos sorotipos virais identificados neste ano foram: DENV1 (85,5%), seguido do DENV4 (11,7%), DENV2 (2,4%) e DENV3 (0,4%) (BRASIL, 2014).

No estado de Pernambuco, após a primeira epidemia descrita em 1987 pelo sorotipo DENV1, com 2.118 casos reportados, ocorreu em 1995, uma nova epidemia com a introdução do sorotipo 2 depois de sete anos sem registros de casos autóctones (CORDEIRO *et al.*, 2007a). Em 2002 houve o registro de outra epidemia devido à entrada do sorotipo DENV3, na qual a Região Nordeste apresentou a maior taxa de incidência regional do Brasil, tendo o estado de Pernambuco o maior índice (SOUZA, 2007). Nos anos de 2007 e 2008 foram detectados alternância entre os sorotipos DENV1, DENV2 e DENV3, já no ano de 2009 os sorotipos 2 e 3 foram isolados em proporções semelhantes, sem predomínio de um sorotipo (BRASIL, 2009). Em 2010, foram notificados 34.590 casos de gente com predomínio na circulação do DENV1 sendo indicado como um dos fatores envolvidos no aumento de casos observados nesse mesmo ano (BRASIL, 2010b). No ano de 2011 foi reportado dois casos da reintrodução do DENV4 no interior do Estado porém houve a prevalência do DENV1 (CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA DE PERNAMBUCO, 2011). Os casos graves confirmados de dengue entre os anos de 2011 e 2012 diminuíram de 597 para 186, porém com o número de óbitos estável (BRASIL, 2013a). Até a 18ª SE de 2014 foram registrados 3.018

MOURA, L. R.

casos da doença no Estado com circulação dos sorotipos DENV1, DENV3 e DENV4, respectivamente em 20%, 60% e 20% das amostras com isolamento viral (BRASIL, 2014).

Recentemente, durante a triagem de amostras coletadas em um surto no estado de Sarawak na Malásia, em 2007, pesquisadores americanos suspeitaram que um vírus diferente dos quatro sorotipos já conhecidos. Após análise do sequenciamento viral foi confirmado que este era filogeneticamente distinto dos outros quatro tipos, sugerindo o aparecimento de um novo sorotipo: DENV5 (NORMILE, 2013).

2.2 Formas clínicas

A dengue é uma doença febril aguda, com duração de cinco a sete dias. A infecção possui um espectro que varia desde a forma assintomática até quadros de hemorragia e choque, podendo evoluir, inclusive para o óbito. A dengue clássica (DC) apresenta quadro clínico muito variável, geralmente com febre alta (39°C a 40°), seguida de cefaléia, mialgia, prostração, artralgia, anorexia, dor retroorbitária, náuseas, vômitos e exantema. Associada à síndrome febril, em alguns casos pode ocorrer hepatomegalia dolorosa e, principalmente, nas crianças, dor abdominal generalizada. Com o desaparecimento da febre, há regressão dos sinais e sintomas, podendo ainda persistir a fadiga (FIGUEIREDO, 2002; GUZMÁN, 2002; HARRIS *et al.*, 2000).

Por outro lado, os sintomas da febre hemorrágica da dengue (FHD), apesar de semelhantes aos da dengue clássica ainda apresenta plaquetopenia (plaquetas $<100.000/\text{mm}^3$), aumento da permeabilidade capilar, extravasamento de plasma e anormalidades homeostáticas, sobretudo hemoconcentração. Este quadro pode ainda evoluir rapidamente para insuficiência circulatória e síndrome do choque por dengue (SCD) podendo levar a óbito em 12 a 24 horas ou à recuperação rápida após terapia antichoque apropriada. A SCD é a forma mais comum de morte causada por essa patologia (BRASIL, 2009; GUBLER, 1998).

Casos complicados cujos critérios não completam suficientemente as exigências (OMS) para FHD, especialmente a hemoconcentração, são classificados como dengue clássica complicada (DCC) (CORDEIRO *et al.*, 2007b). Nessa situação, a presença de um dos itens a seguir caracteriza o quadro: alterações neurológicas; disfunção cardiorrespiratória; insuficiência hepática; plaquetopenia igual ou inferior a $50.000/\text{mm}^3$; hemorragia digestiva; derrames cavitários ou leucometria global igual ou inferior a $1.000/\text{mm}^3$ (BRASIL, 2007).

2.3 Imunopatologia da dengue hemorrágica

MOURA, L. R.

A resposta imunológica à infecção aguda por dengue pode ser primária ou secundária. A resposta primária ocorre em pessoas não expostas anteriormente ao DENV, no qual o título dos anticorpos se eleva lentamente. Já a resposta secundária ocorre em indivíduos com infecção aguda por dengue, mas que tiveram infecção prévia pelo vírus, no qual o título de anticorpos se eleva rapidamente, atingindo níveis altos (BRASIL, 2009).

A patogênese da FHD não está determinada nem se conhece quais condições do hospedeiro favorecem a gravidade da doença. Alguns pesquisadores argumentam que a infecção secundária tem maior fator de importância na severidade da doença enquanto outros apontam para a virulência viral (HAMMON, 1973). Neste caso, a gravidade da doença se associa com a maior virulência de determinadas cepas, ocasionada pelas sucessivas passagens tanto no hospedeiro humano quanto no vetor, o que leva a mutações adaptativas no código genético do DENV (ROSEN, 1977). Porém, fatores de risco do hospedeiro como idade, estado nutricional, sexo, doenças crônicas ou fatores genéticos poderiam interagir dando origem à resposta contra a infecção, sendo esta benéfica ou prejudicial (LEI *et al.*, 2001; SIERRA; KOURI; GUZMÁN, 2007).

A teoria da amplificação dependente de anticorpos (*Antibody-dependent Enhancement* - ADE) explica porque indivíduos que tiveram infecção prévia com um sorotipo do DENV, se infectados por um sorotipo diferente, teriam maior incidência de FHD em relação aos de infecção primária. Os anticorpos heterólogos produzidos na infecção com o primeiro sorotipo estariam em níveis sub-neutralizantes durante a infecção pelo segundo sorotipo. Linhagens monocíticas foram descritas como principal alvo de infecção dos DENV e dispõem de alta expressão de receptores FcR γ . Sendo assim, os anticorpos heterólogos não neutralizantes ligados aos vírus, seriam atraídos para a superfície celular através da ligação da porção Fc da imunoglobulina com o FcR γ , aproximando o vírus do seu receptor e resultando no aumento de infecção das células (HALSTEAD, 2003; NIELSEN, 2009).

2.4 Resposta imune inata na infecção pelo DENV

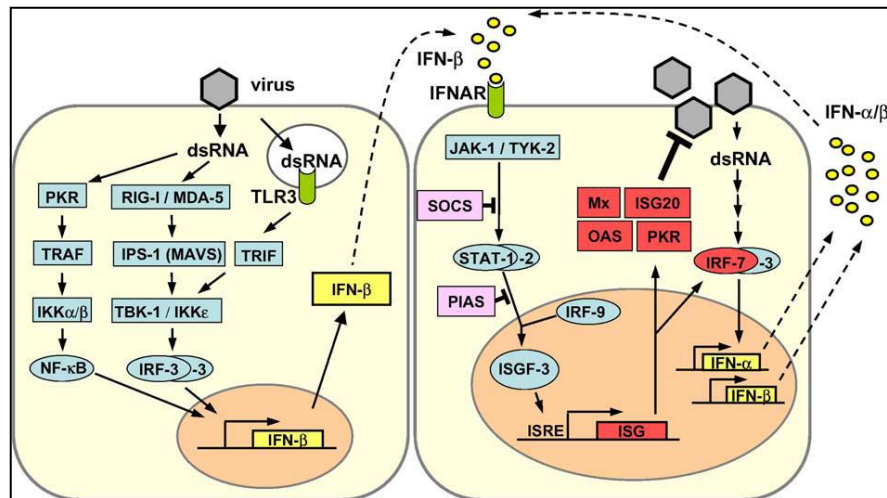
A imunidade inata e a resposta do IFN-I funcionam como a primeira linha de defesa contra infecções virais. O DENV replica em uma variedade de tipos celulares incluindo células endoteliais, fibroblastos, células dendríticas (DCs), macrófagos e linfócitos (NAVARRO-SÁNCHEZ; DESPRÉS; CEDILLO-BARRÓN, 2005).

Ao entrar na corrente sanguínea do homem através da picada do *A. aegypti* o DENV é primeiramente reconhecido pelas DCs intersticiais através da ligação da proteína do envelope

MOURA, L. R.

viral (E) ao receptor DC-sign dessas células (NAVARRO-SÁNCHEZ; DESPRÉS; CEDILLO-BARRÓN, 2005). Essa ligação resulta na entrada do vírus, que irá replicar-se no citoplasma da célula hospedeira. O acúmulo de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como o RNA de cadeia dupla intermediária viral (dsRNA), facilitam a detecção do vírus por uma série de receptores de reconhecimento do patógeno hospedeiro (PRRs), levando à ativação de APCs profissionais. Os PRRs mais relevantes para a detecção de produtos DENV descritos até agora são os receptores *toll-like* ligados à membrana (TLR3/TLR7/TLR8) (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; TSAI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2006). O reconhecimento pelos PRRs leva à ativação da cascata de fosforilação de proteínas, culminando no acionamento do fator de transcrição nuclear NFκ-B (fator nuclear kappa B) e IRF (*Interferon regulatory factor*) 3 e 7 a coordenar programas anti-virais via indução do IFN-I (IFNs α e β) e outras citocinas inflamatórias (Figura 2) (NAVARRO-SÁNCHEZ; DESPRÉS; CEDILLO- BARRÓN, 2005).

Figura 2 - Indução e sinalização do INF-I.



Fonte: Jones *et al.* (2005).

Os IFNs α e β são reconhecidos através do receptor de IFN tipo 1 (IFNAR1/2) na superfície celular e ativam a cascata das proteínas JAK/STAT. Uma vez sintetizado, o IFN-I provoca seus efeitos antivirais ligando-se de forma autócrina e parácrina ao seu receptor (LÓPEZ *et al.*, 2003). Este evento leva à ativação da via de sinalização JAK/STAT, que termina na associação das proteínas STAT1 e STAT2 ao IRF9 para formar o complexo do gene do fator 3 estimulado por IFN (*IFN-stimulated gene factor 3*- ISGF3) (SETH; SUN; CHEN, 2006). O complexo ISGF3 transloca-se para o núcleo e inicia a transcrição dos genes

MOURA, L. R.

estimulados por interferon (ISGs), levando à estimulação de mais de 100 genes com atividade antiviral. Tal efeito antiviral é caracterizado por degradação de RNAs mensageiros (mRNA) e inibição da tradução (Figura 2) (NAVARRO-SÁNCHEZ; DESPRÉS; CEDILLO-BARRÓN, 2005).

2.4.1 *Evasão viral*

A ativação da imunidade inata devido à detecção de produtos de replicação viral na célula leva à expressão de centenas de genes antivirais que controlam a propagação da infecção (BAUM; GARCIA-SASTRE, 2011). A inibição dos diferentes passos envolvidos nestas vias moleculares por vírus tem sido um assunto de estudo extensivo por vários anos (AGUIRRE *et al.*, 2012). A habilidade de conter a resposta do IFN é provavelmente crucial para o vírus estabelecer uma infecção de forma eficiente (FLORES, 2007). Frequentemente, os vírus são capazes de expressar proteínas que interferem na via de indução do IFN-I, sendo as mais estudadas a proteína NS1 do vírus da influenza e a proteína VP35 do vírus Ebola (MORRISON; AGUIRRE; FERNANDEZ-SESMA, 2012). Além disso, a via de sinalização do IFN-I também pode ser alvo através da expressão de proteínas antagonistas ao IFN que atuam ao nível das proteínas STAT, induzindo sua degradação (DIAMOND, 2009).

O DENV evoluiu com sucesso para superar a imunidade inata e infectar o hospedeiro usando uma combinação equilibrada de duas estratégias fundamentais, de forma passiva, por impedir a interação de PAMPs com PRRs celulares, e a outra é ativa, através da inibição tanto da produção como da sinalização de IFN-I com a expressão de proteínas virais antagonistas a essas vias. Desta forma, DENV reduz a expressão de centenas de genes induzidos pelo IFN que poderiam estabelecer um estado antiviral e controlar a propagação da infecção no hospedeiro (MORRISON; AGUIRRE; FERNANDEZ-SESMA, 2012; AGUIRRE *et al.*, 2012).

De forma passiva, a infecção DENV provoca a formação de estruturas de membrana intracelular. Este arranjo fornece uma estrutura física onde se concentram os componentes virais necessárias para replicação do vírus de forma parcialmente isolada. Esta característica, comum a outros vírus de RNA de sentido positivo, não só promove a concentração de produtos virais necessários para replicação, mas também impede a interação física dos PAMPs com os PRRs, atrasando então a ativação da resposta celular pelos PRRs (MORRISON; AGUIRRE; FERNANDEZ-SESMA, 2012).

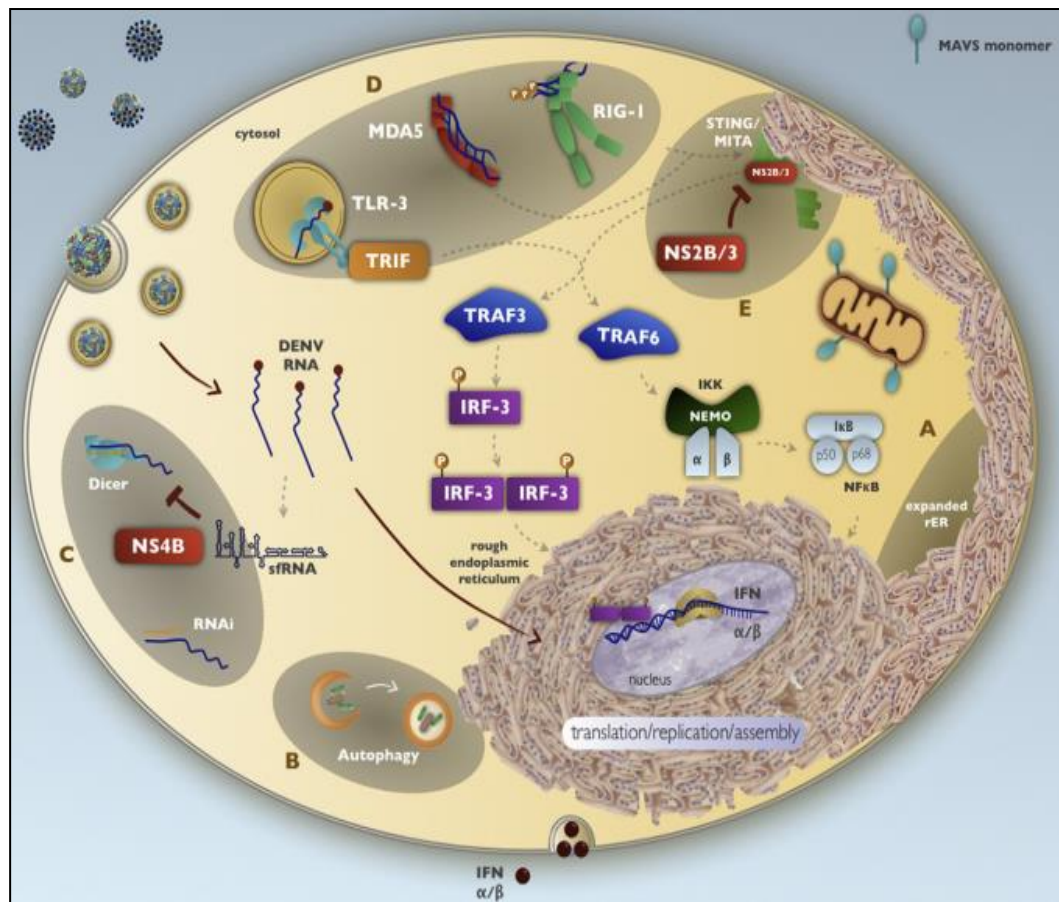
MOURA, L. R.

IFN-I desempenha um papel importante na infecção por DENV. Tem sido observado baixos níveis de IFN-I produzido por células dendríticas em pacientes de FHD (PICHYANGKU *et al.*, 2003), demonstrando que a ação viral sobre a produção e ação do IFN está intimamente ligado com a virulência (GALE; SEN, 2009).

Sobre a inibição de forma ativa, os vírus codificam antagonistas dos receptores de reconhecimento do patógeno e/ou antagonistas do IFN no seu genoma. Tais fatores podem direcionar bloqueios de sinalização intracelular que iriam desencadear a produção de IFN ou alterar diretamente a função dos produtos dos genes estimulados por IFN (ISGs) (GALE; SEN, 2009).

Em relação ao bloqueio da indução do IFN-I, estudos sugerem que a infecção por DENV interfere com a via de produção o IFN-I antes da indução da expressão do gene, o que resulta em uma redução de sua expressão mediada pelo complexo NS2B3 cataliticamente ativo (AGUIRRE *et al.*, 2012; RODRIGUEZ-MADOZ *et al.*, 2010a). A protease viral interage com pelo menos duas proteínas diferentes da via de indução do INF. A primeira proteína é conhecida como estimulador do gene do interferon (STING). Esta é uma proteína transmembrana do retículo endoplasmático e estudos têm mostrado sua ativação por RNA viral (WENXIANG *et al.*, 2009). A ativação desta via induz a dimerização de STING, que é então fosforilado e ubiquitinado para ativar IRF3 (LI *et al.*, 2012). A protease viral NS2B3 interage fisicamente com STING e induz sua clivagem alterando a montagem dos complexos necessários para a ativação IRF3 (Figura 3) (AGUIRRE *et al.*, 2012).

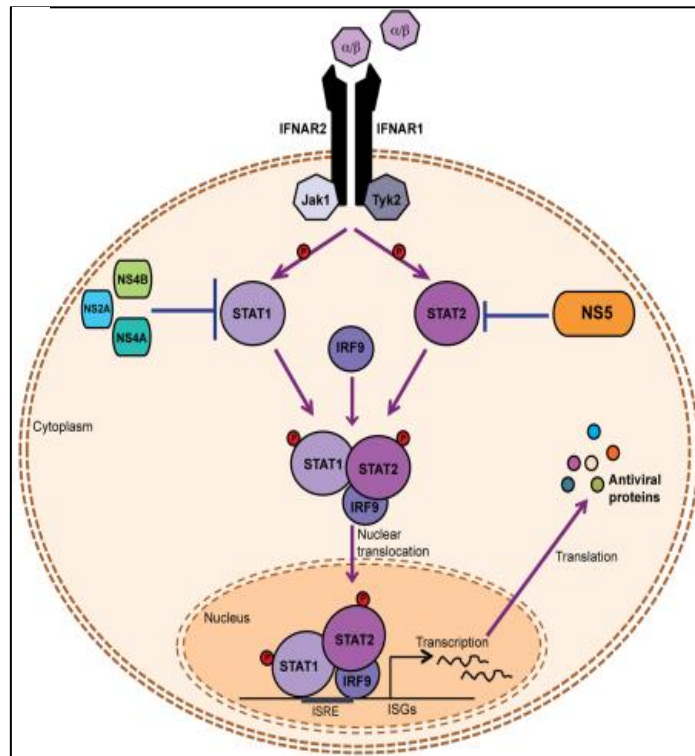
Em outro estudo, a protease NS2B3 neutraliza a via de indução de IFN através da interação direta com a proteína quinase IKK ϵ , bloqueando a fosforilação de IRF3 (YESSEINIA *et al.*, 2014). A redução de fosforilação de IRF-3 descrito por Rodriguez-Madoz e colaboradores em células humanas primárias também resultou em uma inibição da produção de IFN-I. Com isso, estes resultados indicam claramente que DENV bloqueia ou não induz a via de IFN em células infectadas (RODRIGUEZ-MADOZ *et al.*, 2010b). A inibição da produção de IFN-I resulta na geração de resposta imune adaptativa ineficiente para este vírus e facilita subsequentes infecções por outros vírus que podem ser sensíveis aos efeitos antivirais do IFN-I (RODRIGUEZ-MADOZ *et al.*, 2010a).

Figura 3 - Inibição da indução do INF-I pelo DENV.

Fonte: Green *et al.* (2013).

Nota: **E.** Protease viral NS2B3 cliva STING humano interferindo na via que leva a indução de IFN-I.

Proteínas virais, tais como NS2A, NS4A, NS4B e NS5, foram identificadas como inibidores de diferentes componentes da via de sinalização de IFN-I (MUÑOZ-JORDAN *et al.*, 2003) (Figura 4). Muñoz-Jordan e colaboradores observaram reduzida fosforilação de STAT1 em resposta à sinalização de IFN-I em células expressando proteínas não estruturais de DENV NS4B, NS4A e/ou NS2A (MUÑOZ-JORDAN *et al.*, 2003). Outros estudos mostraram que a proteína não estrutural NS5 inibe a fosforilação do STAT2 o que implica que a NS5 do DENV pode bloquear a interação entre a fosfatase Tyk2 e seu substrato STAT2 (ASHOUR *et al.*, 2009; MAZZON *et al.*, 2009). Recentemente, foi relatada a descoberta de um fator de acolhimento, UBR4, que interage com NS5 e promove a degradação de STAT2, além de se mostrar necessário para a replicação viral (MORRISON *et al.*, 2013). Ao inibir esta importante via de sinalização, o vírus é capaz de parar a indução de centenas de genes com funções antivirais que podem afetar várias etapas do seu ciclo (MORRISON; AGUIRRE; FERNANDEZ-SESMA, 2012).

Figura 4 - Inibição da via de sinalização do IFN-I pelo DENV.

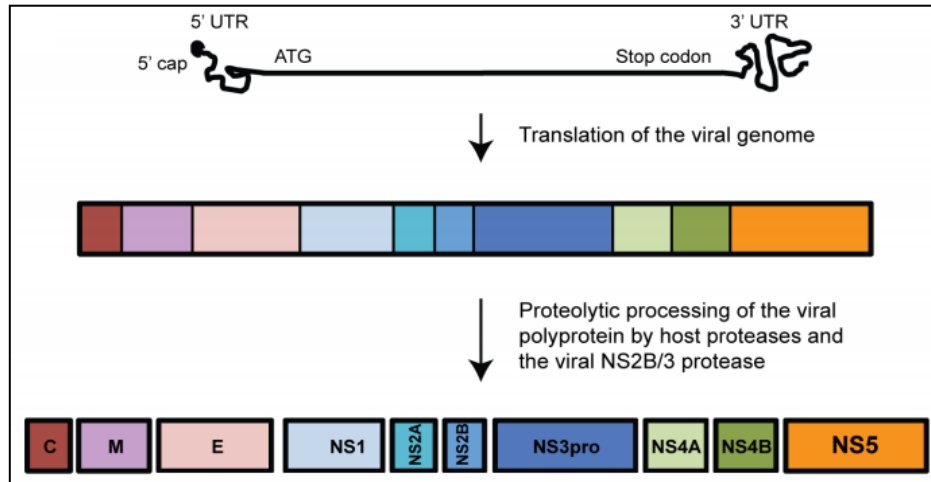
Fonte: Morrison; García-Sastre (2014).

Nota: O esquema representando a via de sinalização do IFN-I mostrando onde as proteínas do vírus atuam para inibir essa via. O DENV antagoniza esta via de sinalização utilizando a proteína NS5 para degradar STAT2 e as proteínas NS2A, NS4A e NS4B para inibir etapas da ativação da proteína STAT1.

2.5 Vírus Dengue

O DENV contém um capsídeo icosaédrico revestido externamente por um envelope derivado das membranas da célula hospedeira (CLYDE *et al.*, 2006). Seu genoma é composto por uma molécula de RNA linear de polaridade de aproximadamente 11 kilobases (kb). Essa molécula simples de RNA apresenta duas regiões não-traduzidas: 5'UTR, com uma estrutura Cap tipo I (7-metil-guanosina) e 3'UTR, desprovida de cauda poli-adenilada. Possui uma única fase aberta de leitura (ORF - *open reading frame*) codificando uma poliproteína (aproximadamente 3.400 aminoácidos), que origina dez produtos gênicos, sendo três proteínas estruturais (envelope - E, capsídeo - C e membrana - M) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Figura 5) (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

As proteínas estruturais formam a partícula viral icosaédrica, coberta por um envelope lipídico contendo proteínas do E e da prM/M. As proteínas não-estruturais participam da replicação do RNA genômico, da montagem do vírion e da evasão da resposta imune inata do hospedeiro (NOBLE *et al.*, 2010).

Figura 5 - Organização genômica dos flavivírus e suas proteínas virais.

Fonte: Adaptado de Morrison; García-Sastre (2014).

A proteína do capsídeo (C) tem peso molecular em torno de 12 kDa, interage com o RNA viral participando da montagem de partículas com mRNA recém-sintetizado dando origem à estrutura do nucleocapsídeo e também com a proteína estrutural do envelope. Essa proteína possui um domínio hidrofóbico que funciona como sequência sinal para a translocação da proteína prM/M no retículo endoplasmático (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007; SCHRAUF *et al.*, 2009).

A proteína prM (22 kDa) codifica o precursor da proteína da membrana (M), tem como principal função prevenir a fusão de partículas virais imaturas com as membranas celulares durante a via de secreção, além de garantir o dobramento correto da proteína E (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

A proteína do envelope (E) (uma glicoproteína de 55 a 60 kDa), é a principal proteína estrutural do virion, ela desempenha papel em uma série de atividades biológicas, incluindo a montagem dos vírus, a ligação ao receptor, a fusão das membranas, além de apresentar atividade hemaglutinante e ser o principal alvo para anticorpos neutralizantes, sendo o maior determinante antigênico da partícula viral (CHAMBERS *et al.*, 1990; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007)

NS1 tem peso molecular de 46-55 kDa dependendo do seu estado de glicosilação. Existe em várias formas oligoméricas e encontra-se em diferentes localizações celulares: ou associada a compartimentos vesiculares dentro da célula ou na superfície celular (CHAMBERS *et al.*, 1990). NS1 intracelular desempenha papel de cofator na replicação do vírus, no entanto, a função exata desta proteína na replicação ainda não é totalmente

MOURA, L. R.

elucidada. NS1 presentes na superfície da celular são altamente imunogênicas sendo implicadas na patogênese da doença (CHUNG *et al.*, 2006).

NS2A é uma proteína relativamente pequena com aproximadamente 22 kDa e está associada à membrana. Aparentemente apresenta um papel no correto processamento proteolítico de NS1 (CHANG, 1997), replicação do RNA e a montagem de vírus (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). Assim como a NS2A, a NS2B (14kDa) é uma pequena proteína hidrofóbica associada à membrana. NS2B forma um complexo estável com a NS3 e atua como um cofator para a serina protease NS2B3 (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

A segunda maior proteína viral, NS3 (68-70 kDa), é altamente conservada entre flavivírus e não contém longos trechos hidrofóbicos (CHAMBERS *et al.*, 1990). Possui atividades enzimáticas multifuncionais, tais como protease, que junto com a NS2B está envolvida no processamento da poliproteína viral, atividade NTPase e RNA helicase trifosfatase que se localizam na região C- terminal da proteína, sendo essenciais na replicação do RNA viral. (ROEHIG, 1997; TEO; WRIGHT, 1997). A atividade de protease NS2B3 inibe a fosforilação de IRF-3, um regulador transcricional chave da resposta IFN-I (BREIMAN *et al.*, 2005), além de interagir com STING, induzindo sua clivagem e alterando passos posteriores para montagem dos complexos necessários para a ativação de IRF3 (AGUIRRE, S. *et al.*, 2012).

A NS4A e NS4B são pequenas proteínas hidrofóbicas (16kDa e 27kDa, respectivamente) associadas à membrana. Ambas as proteínas estão envolvidas, juntamente com a proteína NS2A, na inibição da via de sinalização do IFN tipo I (MUNOZ-JORDAN *et al.*, 2003, 2005). NS4A apresenta papel na replicação do RNA interagindo com NS1 (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

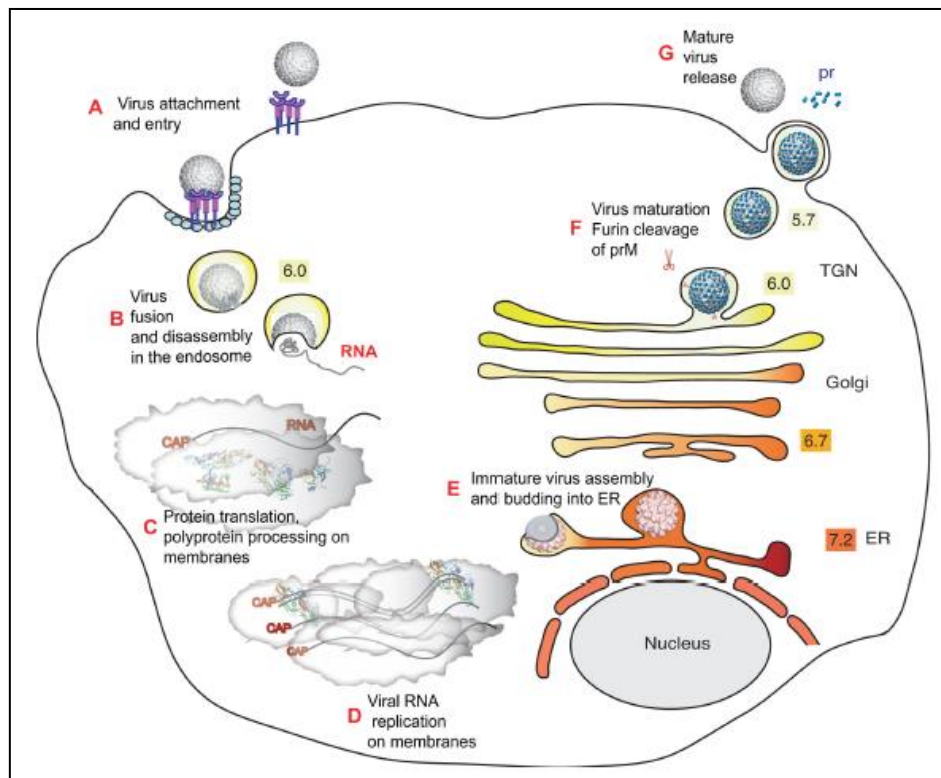
Amplamente conservada, a proteína NS5 (105 kDa) é a maior e mais conservada proteína dos flavivírus, com atividades metiltransferase e RNA polimerase viral RNA-dependente (RdRp). Essa proteína também pode induzir a transcrição e tradução de interleucina-8 (IL-8) (CHANG, 1997) e atua como antagonista da via de sinalização do IFN tipo I em diversos flavivírus (ASHOUR *et al.*, 2009; LAURENT-ROLLE *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2006). A ribavirina inibe a atividade de metiltransferase da NS5 fornecendo pelo menos um mecanismo de ação ant Flaviviral (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

2.5.1 *Replicação viral*

Assim como outros vírus de RNA de cadeia positiva, os flavivírus replicam no citoplasma de células susceptíveis (Figura 6). Após adsorção do virion a receptores de superfície, sua entrada na célula ocorre por endocitose mediada por clatrina (Figura 6A) (PERERA; KUHN, 2008). Apesar de existir várias moléculas celulares capazes de mediar a ligação do vírus, nenhuma foi demonstrada funcionar como receptores dos mesmos (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

Seguindo a internalização, o baixo pH do endossoma desencadeia rearranjos estruturais nas glicoproteínas virais para que ocorra a fusão das membranas viral e endocítica liberando o RNA viral para o citoplasma (Figura 6B) (MODIS *et al.*, 2004). Este RNA é diretamente traduzido como uma única poliproteína que é processada pelas proteases virais e celulares nas três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B e NS5) (Figura 6C) (PERERA; KUHN, 2008). Como os flavivírus utilizam o mesmo RNA (polaridade positiva – RNA+) para a tradução e replicação do genoma, os dois processos não podem ocorrer simultaneamente. Assim, após a tradução das proteínas virais inicia-se a replicação do genoma (CLYDE *et al.*, 2006).

A replicação é iniciada com a síntese do RNA com polaridade negativa (RNA-), o qual servirá como molde para a síntese de novas moléculas de RNA+ (Figura 6D) (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). Os recém RNAs de cadeia positiva podem então iniciar um novo ciclo de tradução ou ser empacotados formando novas partículas virais. A interação da proteína C com o RNA viral genômico leva a formação do capsídeo, o qual adquire o envelope viral a partir do brotamento no lúmen do retículo endoplasmático (Figura 6E) (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). Estas partículas imaturas são transportadas através da via secretora do aparelho de Golgi. No ambiente de baixo pH do trans-Golgi, a proteína prM sofre clivagem pela furina gerando unidades maduras do vírus (Figura 6F). A maturação é também acompanhada por importantes rearranjos estruturais da proteína E. A partícula viral madura é, então, liberada por exocitose (Figura 6G) (PERERA; KUHN, 2008).

Figura 6 - Ciclo replicativo dos flavivírus.

Fonte: Perera; Kuhn (2008).

A. Vírus se ligam a receptores e são internalizados por endocitose. **B.** No baixo pH do endossoma, as glicoproteínas virais mediam a fusão das membranas viral e celulares, permitindo a desmontagem do virion e liberação do RNA no citoplasma. **C.** RNA viral é traduzido em uma poliproteína que é processada por proteases virais e celulares. **D.** Proteínas não-estruturais replicam o RNA genômico. **E.** A montagem do vírus ocorre na membrana do RE, onde a proteína do capsídeo e o RNA viral são envelopados em partículas virais imaturas. **F.** Partículas virais imaturas são transportadas pela via secretória. No baixo pH do trans-Golgi há a clivagem de prM mediada por furina, levando à maturação do vírus. **G.** Vírus maduro é liberado no citoplasma. Os números mostrados em quadros coloridos se referem ao pH dos respectivos compartimentos.

2.6 Sistemas de genética reversa em flavivírus

A análise genética de vírus RNA de cadeia positiva tem sido muito facilitada pela utilização de tecnologia de DNA recombinante. Esta torna possível analisar e modificar genomas ao nível molecular gerando uma maior compreensão da organização e da expressão desses vírus. Devido ao pequeno tamanho do seu genoma, os vírus RNA são particularmente propícios para essas investigações. Apesar disso, o estudo da biologia molecular dos vírus de RNA não-retrovírus é dificultada pelo fato de que estes não apresentam uma etapa intermediária de DNA no seu ciclo de replicação (BOYER, 1993).

A possibilidade de obtenção de clones infecciosos (como cDNAs ou como cópias de RNA transcrito *in vitro*) correspondentes aos genomas dos vírus RNA permite investigações sobre o ciclo viral, papel das proteínas virais na patogenicidade, desenvolvimento de vacinas, empacotamento do vírus e liberação da partícula viral (ZABEREZHNYI, 2004). Nos últimos

MOURA, L. R.

anos, tem sido descrita a construção bem sucedida de clones *full-length* de cDNA para vários membros do gênero flavivírus incluindo YFV (BREDENBEEK *et al.*, 2003), DENV (IMOTO; KONISHI, 2007; POLO *et al.* 1997) e WNV (YAMSHCHIKOV *et al.*, 2005).

Além dos clones infecciosos vêm sendo desenvolvidos sistemas de genética reversa denominados replicons. Replicons são moléculas de RNA subgenômicas auto-replicativas, que contêm todas as sequências de nucleotídeos, incluindo os elementos *cis* nos terminais 5' e 3' e as proteínas não estruturais que são requeridas para a replicação e tradução viral (YANG *et al.*, 2012). Como não há formação de partícula viral o replicon é incapaz de se disseminar para outras células (KHROMYKH, 2000). Quando expressam proteínas repórteres, são consideradas ferramentas poderosas para estudo da replicação do vírus e na descoberta de compostos antivirais (LEARDKAMOLKARN *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2012).

Através do uso de clones infecciosos foram posteriormente desenvolvidos alguns vírus com genes repórteres. São descritos flavivírus repórteres para JEV (*Japanese encephalitis virus*) (YUN *et al.*, 2003), WNV (DEAS *et al.*, 2005) e DENV (ZOU *et al.*, 2011, SCHOGGINS *et al.*, 2012). As vantagens de usar estes vírus recombinantes são que: são mais seguros, uma vez que estes mostram patogenicidade leve em comparação aos respectivos vírus originais, além de serem fenotipicamente semelhantes aos vírus parentais (MAEDA; MAEDA, 2013). Estes vírus fornecem uma plataforma para identificar moléculas antivirais e para monitorar a infectividade por DENV tanto em cultura de células quanto em camundongos (SCHOGGINS *et al.*, 2012).

2.6.1 Vírus repórteres

Genes repórteres têm sido usados no acompanhamento de diferentes processos biológicos dos flavivírus, o que atrai o interesse de muitos pesquisadores (LEARDKAMOLKARN *et al.*, 2012). Estes podem ser definidos como genes com fenótipos facilmente mensuráveis e geralmente são selecionados com base na sensibilidade, na dinâmica e confiança do ensaio (ALAM; COOK, 1990; NAYLOR, 1999). A sensibilidade dos ensaios utilizando genes repórteres reduz o tempo dos mesmos, além de serem mais simples quando comparados aos testes de ELISA ou PCR em tempo real (HOSSAIN *et al.*, 2010).

O gene repórter *Gaussia* luciferase (Gluc) vem sendo utilizado em estudos de caracterização de vírus como influenza (ZHU *et al.*, 2011) e poliovírus (SONG; PAUL; WIMMER, 2011). Este cataliza a oxidação de pequenas moléculas de coelenterazine para

MOURA, L. R.

produzir luz e não necessita de ATP para sua atividade. Além disso, a enzima tem tolerância térmica podendo apresentar atividade até 60°C e apresenta rendimentos mais elevados que *Renilla* e *Firefly* luciferases (BADR; TANNOUS, 2011).

Uma vez que Gluc é naturalmente secretada, seu nível no sangue ou na urina pode ser usado como um marcador para monitorar diferentes eventos biológicos *in vivo*, tais como o crescimento e resposta de tumores a terapia, infecção e replicação viral, bem como a viabilidade de células circulantes (WURDINGER *et al.*, 2009). Em cultura, repórteres secretados podem ser quantificados sem a necessidade de lise celular deixando as células intactas e disponíveis para outras análises (TANNOUS, 2009).

Clonagem de genes repórteres tem sido amplamente usada na manipulação de genomas virais (NG *et al.*, 2007). Estes vírus repórteres, que são feitos através da clonagem de genes repórteres nos clones infecciosos, vem ajudando a elucidar importantes aspectos da patogenia, ciclo viral (LEUNG *et al.*, 2008; LINDENBACH; RICE, 1999; MATUSAN *et al.*, 2001; PATKAR; KUHN, 2008), bem como o desenvolvimento de vacinas e a triagem de drogas antivirais (NG *et al.*, 2007; ROSSI *et al.*, 2005).

A utilização de genes repórteres aumentou significativamente na década passada e tem contribuído para os avanços em pesquisas. Essa tecnologia fornece meios valiosos para o acompanhamento de diferentes processos biológicos em imunologia, oncologia, virologia e neurociência (BADR; TANNOUS, 2011).

3 JUSTIFICATIVA

O aumento de ocorrência da dengue tem se constituído um crescente objeto de preocupação para a sociedade e, em especial, para as autoridades de saúde, em razão das dificuldades enfrentadas para o controle das epidemias produzidas por esse vírus e pela necessidade de ampliação da capacidade instalada dos serviços de saúde para atendimento aos indivíduos acometidos com formas graves, em especial a FHD (BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

Apesar dos avanços, os eventos moleculares e muitos aspectos da biologia viral ainda não são bem compreendidas, o que inviabiliza o desenvolvimento de tratamentos e vacinas eficazes contra o DENV (RUGGLI; RICE, 1999).

O primeiro obstáculo à infecção viral é representado pelos IFN-I que são responsáveis pela indução da transcrição de um grupo de genes que desempenham um papel na resistência do hospedeiro a infecções virais, esta porém ainda não é bem compreendida. A eficiência com que o DENV escapa a resposta do IFN em humanos é provavelmente um fator importante na replicação viral e, conseqüentemente, na patogênese da doença.

Acreditamos que este trabalho é de grande importância para a pesquisa do DENV, uma vez que, realizar ensaio de infecção com vírus repórter contribuirá para o aprimoramento da virologia molecular dos flavivírus e compreender a respeito da resposta imune inata frente à infecção pelo DENV possibilitaria o esclarecimento de mecanismos imunopatológicos causados por este vírus permitindo então o desenvolvimento de novas estratégias de controle e tratamento do vírus DENV no país.

MOURA, L. R.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Desenvolver um vírus recombinante da dengue expressando a proteína *Gaussia* luciferase e caracterizar de cepas virais quanto a inibição da sinalização do interferon do tipo I (IFN-I).

4.2 Específicos

- a) Analisar a inibição da via de sinalização do IFN-I por diferentes isolados de DENV dos quatro sorotipos;
- b) Clonar o gene da proteína repórter da *Gaussia* luciferase no clone infeccioso de DENV2,
- c) Recuperar partículas virais recombinantes expressando a proteína *Gaussia* luciferase.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Cultivo de células

Células de *A. albopictus* linhagem C6/36 foram mantidas em meio de cultura L-15 suplementado com 5% soro fetal bovino (SFB) a 28°C. Células da linhagem BHK-21-pISRE-Luc-Hygro (clone 1), recentemente desenvolvida no Departamento de Virologia do CPqAM, foram mantidas em meio MEM (*Minimum Essential Medium*) suplementado com 10% SFB, 1% de antibióticos (Penicilina e Estreptomicina), 300µg/mL de Higromicina, em estufa 37°C com 5% de CO₂. Células BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*) foram mantidas em meio MEM, suplementado com 10% SFB e antibióticos (penicilina e estreptomicina), à 37°C (atmosfera de 5% de CO₂). As células BHK-21 infectadas pelo vírus repórter pSVJS01-IC-DENV2GLuc foram mantidas nas mesmas condições que as não infectadas. Todo o estoque de células foi mantido a -80°C.

5.2 Cultivo de vírus

Foram utilizadas 14 cepas DENV1, 11 cepas DENV2, 17 cepas DENV3 e 7 cepas DENV4 isolados de pacientes infectados em Pernambuco, Brasil (Quadro 1). Os vírus são provenientes das coleções de vírus do Departamento de Virologia do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães. Os isolados virais DENV1, DENV2 e DENV3 tiveram, recentemente, seus genomas completamente amplificados e sequenciados, representando amostras de 1995 a 2010 (SILVA, 2013). Além desses, dois protótipos DENV2 (Tailândia #16681 e New Guínea), previamente descritos como inibidores do IFN-I, foram incluídos como controle do ensaio. Os estoques virais foram crescidos em células de *A. albopictus* linhagem C6/36 e após a observação do efeito citopático induzido pelos vírus, os sobrenadantes foram coletados, suplementados com 20% de soro bovino fetal e armazenados em alíquotas de 1 mL a -80°C.

Quadro 1 - Amostras de DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4 isoladas em Pernambuco.

(continua)

Nome da amostra	Sorotipo	Ano de Isolamento	Localização Município	No. de acesso GenBank
40604/BR-PE/97	DENV1	1997	Maraial	JX669468
41111/BR-PE/97	DENV1	1997	Recife	JX669469
52082/BR-PE/98	DENV1	1998	Lagoa do Carro	JX669470
59049/BR-PE/99	DENV1	1999	Serra Talhada	JX669471
70523/BR-PE/00	DENV1	2000	Caetés	JX669472
74488/BR-PE/01	DENV1	2001	Cedro	JX669473
75861/BR-PE/01	DENV1	2001	Salgueiro	JX669474
88463/BR-PE/02	DENV1	2002	Garanhuns	JX669475
9808/BR-PE/10	DENV1	2010	Santa Cruz	JX669461
12898/BR-PE/10	DENV1	2010	Maraial	JX669462
13501/BR-PE/10	DENV1	2010	São Caetano	JX669463
13671/BR-PE/10	DENV1	2010	Exú	JX669464
13861/BR-PE/10	DENV1	2010	Afogados da Ingazeira	JX669465
14985/BR-PE/10	DENV1	2010	Jatobá	JX669466
3278/BR-PE/95	DENV2	1995	Recife	JX669480
3337/BR-PE/95	DENV2	1995	Recife	JX669482
37473/BR-PE/97	DENV2	1997	Recife	JX669483
47913/BR-PE/98	DENV2	1997	Riacho das Almas	JX669484
51347/BR-PE/98	DENV2	1998	Recife	JX669485
57135/BR-PE/99	DENV2	1999	Araripina	JX669486
72144/BR-PE/00	DENV2	2000	Petrolina	JX669487
87086/BR-PE/02	DENV2	2002	Floresta	JX669488
9479/BR-PE/10	DENV2	2010	Serra Talhada	JX669479
13858/BR-PE/10	DENV2	2010	Afogados da Ingazeira	JX669476
14905/BR-PE/10	DENV2	2010	Olinda	JX669477
85469/BR-PE/02	DENV3	2002	Recife	JX669490
81257/BR-PE/02	DENV3	2002	Recife	JX669491
101905/BR-PE/03	DENV3	2003	Verdejante	JX669489
145/BR-PE/04	DENV3	2004	Recife	JX669495
129/BR-PE/04	DENV3	2004	Olinda	JX669498
206/BR-PE/05	DENV3	2005	Recife	JX669492
339/BR-PE/05	DENV3	2005	Recife	JX669493
277/BR-PE/05	DENV3	2005	Recife	JX669494
255/BR-PE/05	DENV3	2005	Recife	JX669497
249/BR-PE/05	DENV3	2005	Paulista	JX669500
263/BR-PE/05	DENV3	2005	Recife	JX669501
283/BR-PE/05	DENV3	2005	Recife	JX669502
314/BR-PE/05	DENV3	2005	Recife	JX669503
411/BR-PE/06	DENV3	2006	Recife	JX669504
418/BR-PE/06	DENV3	2006	Recife	JX669505
420/BR-PE/06	DENV3	2006	Recife	JX669506

Quadro 1 - Amostras de DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4 isoladas em Pernambuco.

				(conclusão)
Nome da amostra	Sorotipo	Ano de Isolamento	Localização Município	No. de acesso GenBank
424/BR-PE/06	DENV3	2006	Recife	JX669508
121003000078	DENV4	2012	Carnaíba	-
121003000253	DENV4	2012	Carnaíba	-
121003000232	DENV4	2012	Carnaíba	-
120604000196	DENV4	2012	Ibimirim	-
120901000336	DENV4	2012	Ibimirim	-
120608000081	DENV4	2012	Pedra	-
120134000041	DENV4	2012	Pombos	-

Fonte: A autora.

5.3 Concentração viral

Os isolados virais foram crescidos em três garrafas T75 com 5×10^6 células da linhagem C6/36 e após a observação do efeito citopático induzido pelos vírus (aproximadamente 7 dias), cerca de 60 mL do sobrenadante, de cada isolado, foi coletado e centrifugado a 4500 rpm por 30 minutos para a retirada das células. A suspensão contendo os vírus foi então colocado em tubos do tipo falcon e adicionado PEG 6000 (81260-Poly(ethyleneglycol) – Sigma Aldrich) numa proporção de 4 ml do sobrenadante para 1 ml de PEG. Após obtenção de uma mistura homogênea a mesma foi deixada *over night* (ON) a 4°C. No dia seguinte, as amostras foram submetidas a uma nova centrifugação de 4500 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi então descartado, o *pellet* viral foi ressuspensionado em 600 µL de meio DMEM puro com 25mM de HEPES e armazenados em alíquotas de 100 µL a -80°C.

5.4 Titulação viral

A titulação dos vírus foi feita por ensaio de placa em células C6/36. Uma concentração de $3,0 \times 10^5$ células/poço foi semeada em placas de 24 poços e incubadas a 28°C. Vinte e quatro horas após a preparação das placas, as monocamadas de células (cerca de 80% de confluência) foram inoculadas com 8 diluições em série de vírus em um volume final de 200µL (as infecções foram realizadas em duplicatas). Após incubação de 1 hora, que corresponde ao tempo de adsorção do vírus, foi adicionado 1mL de meio semi-sólido em cada poço e as placas foram incubadas por 7 dias a 28°C. Após os sete dias de incubação, o meio semi-sólido foi retirado e as células foram fixadas com acetona 30% em PBS 1x durante 13

MOURA, L. R.

minutos a 4°C. Após a fixação das células, estas foram lavadas mais uma vez com PBS 1X e, em seguida, incubadas a 28°C por um período de 24 horas para completa secagem dos poços. Após o período de secagem, 200µL do anticorpo primário policlonal, produzido contra *Flavivirus* do grupo B (cedido gentilmente pelo Dr. Pedro Vasconcelos do Instituto Evandro Chagas, Belém-PA), diluído (1:1) em tampão de ligação (PBS/NaCl/Tween-20 0,01%) foi adicionado a cada poço. Após incubação das placas por 1 hora a 37°C, as células foram lavadas 3 vezes com o tampão de lavagem (PBS/Tween-20 0,05%) e o anticorpo secundário (200µL), *HRP-rec-protein G* (Zymed), diluído (1:500) em tampão de ligação foi adicionado. Após 1 hora incubação, do anticorpo secundário a 37°C, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1x e foram adicionados 500µL do substrato AEC a cada poço. As placas foram, então, incubadas durante 30 minutos a 37° sob a proteção da luz. Após os 30 minutos de incubação, o substrato foi descartado e os poços foram lavados uma vez com PBS 1x para a retirada do excesso de substrato e parar a reação. Após secagem dos poços em estufa foi feita a contagem das placas e feito o cálculo do MOI (*Multiplicity of infection*).

5.5 Estudo da via de sinalização do IFN-I em células infectadas com diferentes cepas isoladas do DENV

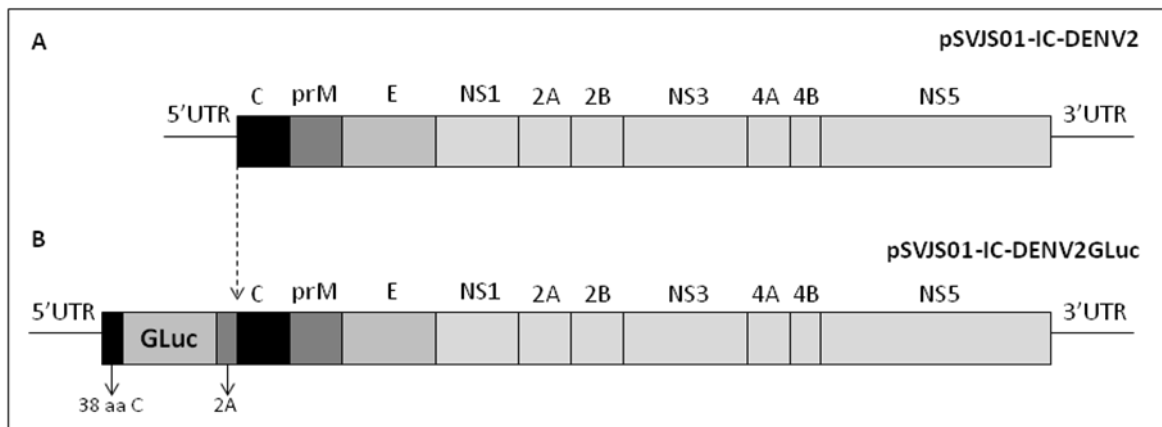
Com a finalidade de estudar a via de sinalização do IFN-I, foi realizado um ensaio em placa de 96 poços utilizando 2×10^4 células/poço da linhagem BHK-21-pISRE-Luc-Hygro clone 1 que expressa o gene firefly luciferase fusionado a um promotor induzido pelo IFN-I (ISRE – *Interferon Stimulated Response Element*). Estas, após 24 horas foram infectadas com as diferentes cepas do DENV, conforme identificadas no item 5.2, a uma MOI 10. Após 12 horas de infecção foram tratadas com 2000UI/mL de IFN α , como indutor da via de sinalização do IFN-I. Após o período de incubação de oito horas a 37°C em atmosfera a 5% de CO $_2$, a expressão do gene repórter luciferase foi avaliada. Para tanto, as células foram lavadas com PBS 1x e lisadas com 20 µL do reagente de lise 1x, *cell culture lysis reagent* (PROMEGA). A cada 20 µL do lisado de células foi adicionado 100µL do substrato luciferina e a leitura da atividade da luciferase foi realizada através do luminômetro (Mithras LB 940, Berthold). Todos os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos. Como controle positivo foram utilizadas células da linhagem não infectadas e tratadas com 2000UI/mL de IFN α e como controle negativo as células da linhagem não foram nem infectadas ou tratadas com IFN α .

5.6 Construção do vírus recombinante pSVJS01-IC-DENV2GLuc

A construção foi realizada através da técnica de recombinação homóloga em levedura. O gene repórter *Gaussia* luciferase foi introduzido *in frame* no genoma viral do clone infeccioso pSVJS01-IC-DENV2 clone 10 previamente construído em nosso laboratório (Figura 7A).

Na estratégia utilizada preservou-se a sequência nucleotídica que codifica os 38 aminoácidos da extremidade N-terminal da proteína do capsídeo visando a manutenção da replicação do RNA viral, seguido do gene repórter *Gaussia* luciferase, do gene da autoprotease 2A (proteína 2A do vírus da febre aftosa, FMDV-*Foot-Mouth Diseases Virus*) e do genoma viral, desde a região que codifica a proteína do capsídeo até o seu final (Figura 7B).

Figura 7 - Estratégia de construção do vírus dengue recombinante pSVJS01-IC-DENV2GLuc.



Fonte: A autora.

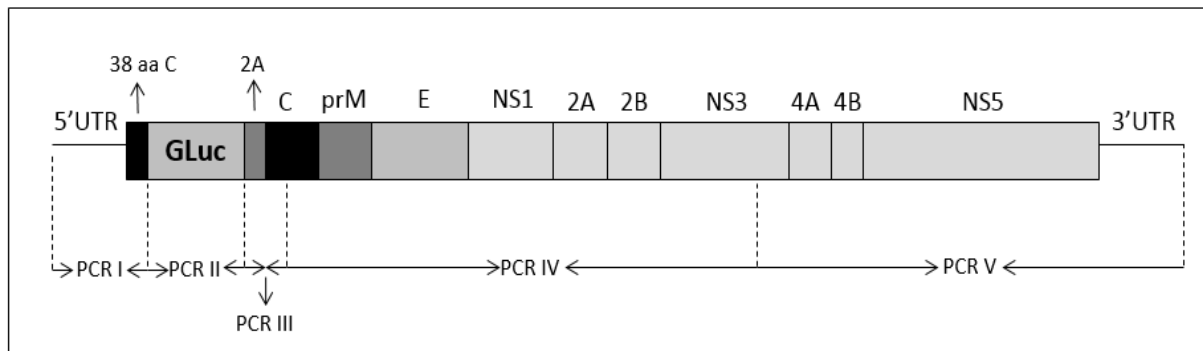
5.6.1 Preparação do vetor

Para a construção do vírus repórter, o vetor utilizado foi digerido com enzima de restrição específica (*Bam*HI - New England BioLabs, Ipswich, Massachussetts) por três horas a 37°C, seguido de desfosforilação com a enzima *Antarctic Phosphatase* (New England BioLabs, Ipswich, Massachussetts) durante 1 hora a 37°C. Posteriormente foi ligado, por recombinação homóloga em levedura, a cinco fragmentos de DNA do vírus DENV2 (260, 580, 238, 5821 e 4821 pb, respectivamente, amplificados por PCR. Cada par de oligonucleotídeos, além de conter as sequências das proteínas do DENV2 a serem amplificadas, possuem sequências das regiões homólogas para a recombinação.

5.6.2 Reação de PCR para recombinação

O primeiro fragmento (260 pb) foi amplificado com os oligonucleotídeos PBSC-RSRII-T7-5'DENV3 e DENV2-190-R e tem seqüências da região 5'UTR e os 38 aminoácidos da extremidade N-terminal da proteína do capsídeo. Na região 5' terminal deste fragmento existe uma porção homóloga ao vetor. O segundo fragmento (580 pb) amplificado com o par de oligonucleotídeos DENV2-C-GLuc-F e Gluc-R, representa o gene do repórter. O terceiro fragmento (238 pb) amplificado com os oligonucleotídeos GLuc-2A-F e DENV2-Cmod-C-R, compreendeu da seqüência 2A a parte do capsídeo. O quarto fragmento (5821 pb) foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos DENV2-C-210-F e DENV2-6061R, contendo a parte restante do capsídeo até NS4. O quinto e último fragmento (4821 pb) utilizando os oligonucleotídeos DENV2-5930F e pSVJS01-3'UTR-DENV3-R apresenta todo o restante do genoma viral (Figura 8). Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR são apresentados no quadro 2.

Figura 8 - Representação esquemática da localização dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos recombinantes.



Fonte: A autora.

Para 20 μ L das reações de PCR (PCR I, II e III) foram utilizados: 2x do tampão de PCR (10xPCR buffer, 5mM de cada dNTP, 25 mM $MgCl_2$), 2,5U de Taq Platinum Invitrogen), 15 pmol de oligonucleotídeos específicos e 50 ng do DNA molde. As condições de ciclagem foram: cinco minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguidos de 35 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 95°C, 30 segundos de anelamento a 56°C, um minuto de extensão para cada 1000 pares de bases a 68°C; e 20 minutos finais de extensão a 68°C.

Para 50 μ L do PCR IV e V, foram utilizados 1x do tampão KlenTaq-LA polimerase (Clontech), 1,3% DMSO, 0,4 M betaína (Sigma), 200 μ M de cada dNTP, 1U KlenTaq-LA polimerase (Clontech), 20 pmol de oligonucleotídeos específicos e 100 ng de DNA molde.

MOURA, L. R.

Para a ciclagem, 5 min à 95°C para desnaturação inicial, seguida de 30 ciclos, cada ciclo composto de 1 min de desnaturação à 93°C, 1 min de pareamento à 56°C, 6 min de extensão a 72°C, e 15 min finais de extensão.

Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose, e as bandas correspondentes aos segmentos foram excisadas do gel e purificadas com o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN), conforme as recomendações do fabricante.

Quadro 2 - Oligonucleotídeos utilizados na construção pSVJS01-IC-DENV2GLuc.

Oligonucleotídeo	Sequência
PBSC-RSRII-T7-5'DENV3	TCTACGTGGACCGAC
DENV2-190-R	CAGCATTCCAAGTGAGAATCT
DENV2-C-GLuc-F	ATGGGAGTCAAAGTTCTGTTTG
Gluc-R	GTCACCACCGGCCCCCT
GLuc-2A-F	AATTTTGACCTTCTTAAGCTTGCG
DENV2-Cmod-C-R	CATAAATAGCTTCAAGGGCCCCCGC
DENV2-C-210-F	GCCCTTGTGGCGTTCCTT
DENV2-6061R	CACGCTCTGGTTCGAA
DENV2-5930F	ACCAGTACATATACATGGGGG
pSVJS01-3'-UTR-DENV3-R	GTTGATTCAACAGCACCATT

Fonte: A autora.

5.6.3 Transformação em levedura

Os fragmentos de PCRs e vetor digerido, com regiões de sequências homólogas, indispensáveis para a recombinação, foram introduzidos em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem YPH 252, através da transformação por eletroporação. Para isso, as leveduras foram crescidas em meio líquido YPD (*Yeast Peptone Dextrose*), a 30°C/130rpm “overnight”. No dia seguinte, um inóculo na concentração de 5×10^6 células/mL foi preparado. Este inóculo foi incubado a 30°C/130rpm até atingir a concentração de 1×10^7 células/mL. Em seguida, as leveduras foram concentradas por centrifugação, lavadas e transformadas por eletroporação. Foram utilizadas cuvetas de 1 mm, com as condições: um pulso com 270V, 11 mili segundos no equipamento BTX EMC 830. Após a transformação, as leveduras foram plaqueadas em placas de YNB (*Yeast Nitrogen Base*) sólido na ausência do aminoácido triptofano (trp) e mantidas a 30°C por 48 horas.

5.6.4 Extração de DNA plasmidial de levedura e confirmação dos clones

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

Posteriormente, as células foram concentradas por centrifugação e a extração plasmidial foi realizada utilizando o kit comercial Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), seguindo recomendações do fabricante. A construção foi confirmada por PCR com oligonucleotídeos específicos para amplificar um produto contendo parte do vetor e dos produtos recombinados. As condições de PCR foram as mesmas descritas no item 5.2.2.

5.7 Recuperação do vírus recombinante pSVJS01-IC-DENV2GLuc

Para a recuperação do vírus construído, RNA sintetizados *in vitro* de cada clone da construção foram introduzidos em células eucarióticas por eletroporação em células BHK-21. A avaliação da replicação viral foi realizada por imunofluorescência indireta e expressão do gene repórter.

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

A amplificação completa do genoma do vírus construído de aproximadamente 11 kb, foi realizada em uma reação de 50 µL como descrito para o PCR IV e V no tópico 5.2.2. O produto de PCR, contendo a sequência completa do vírus recombinante, foi utilizado para transcrição *in vitro*. Para garantir uma ótima qualidade do DNA, foi realizada uma purificação com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol. Os RNAs foram então produzidos com o kit *T7 MEGAscript in vitro transcription* (AMBION), com a adição do análogo ao cap tipo I (7-metil-guanosina), seguindo as recomendações do fabricante.

MOURA, L. R.

5.7.2 *Transfecção do RNA viral em células BHK21 por eletroporação*

Para a eletroporação de células BHK21 foram utilizados 10 µg do RNA transcrito *in vitro* e 2×10^6 células BHK21 em 100 µL de cytomix, 2 µL de ATP 0,1M e 5 µL de glutationa 0,1M. Foram utilizadas cuvetas de 2 mm, com as condições: 600V, 99 mili segundos, cinco pulsos com 1 segundo de intervalo entre os pulsos no equipamento BTX EMC 830. Após a transfecção, as células foram ressuspensas em meio MEM completo e distribuídas em frascos de cultura T25.

5.7.3 *Imunofluorescência indireta*

Utilizando-se o microscópio DMI 4000B (Leica), as células BHK-21 foram acompanhadas através da técnica de imunofluorescência indireta. A partir do décimo dia após a transfecção as células BHK-21 foram fixadas em acetona/PBS (1:1, v/v) a 4°C por 10 min. Para a detecção de antígenos virais, as células foram incubadas a 37°C por 1 h com um anticorpo policlonal específico para flavivírus (HB112), lavadas duas vezes com PBS, seguida pela incubação a 37°C por 1 h com um anticorpo secundário anti-camundongo IgG conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), diluído 1:100 em PBS.

5.7.4 *Mensuração da atividade da *Gaussia Luciferase**

O sobrenadante de células foi coletado e a avaliação da expressão do gene repórter foi mensurada com o kit comercial *BioLux® Gaussia Luciferase Assay Kit* (BioLabs), conforme as recomendações do fabricante e para leitura da luminescência, o luminômetro *Mithras LB 940* (Berthold) foi utilizado.

MOURA, L. R.

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

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

7 RESULTADOS

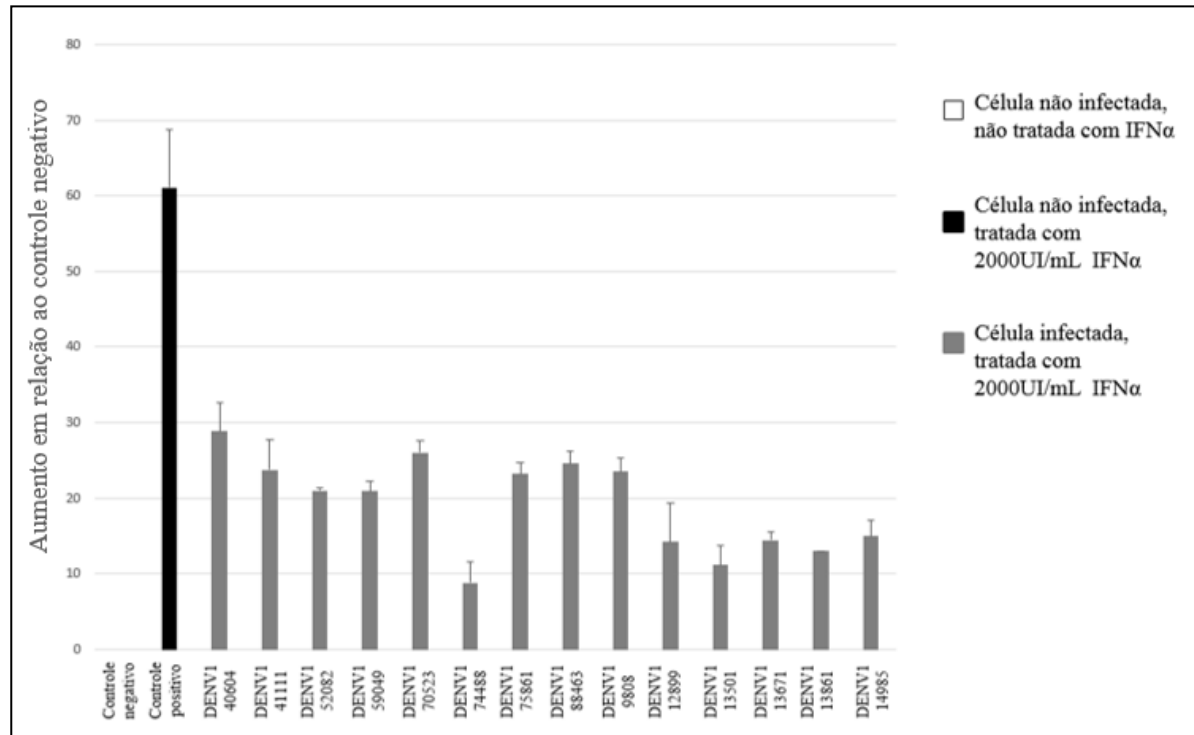
7.1 Estudo da via de sinalização do IFN-I em células infectadas com diferentes cepas isoladas do DENV

Como mostram os Gráficos 1 a 4, as células não infectadas e não tratadas com o IFN α , utilizadas como controle negativo, não mostram níveis significativos de expressão da luciferase. Enquanto que as células do controle positivo, tratadas com IFN α mas sem a infecção, apresentam níveis bastante elevados da expressão de luciferase.

É possível observar que houve a inibição da expressão da luciferase em 67,4%, 70,2%, 63,8% e 34,2% para os sorotipos DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4, respectivamente, refletindo a inibição da indução da sinalização pelo IFN α (Gráficos 1 a 4). O sorotipo DENV2 (Gráfico 2) teve a maior capacidade inibição desta via. Em relação aos protótipos virais de DENV2 utilizadas no estudo (Tailândia 16681 e New Guinea), ambos confirmaram sua capacidade de inibir a via de sinalização do IFN-I.

MOURA, L. R.

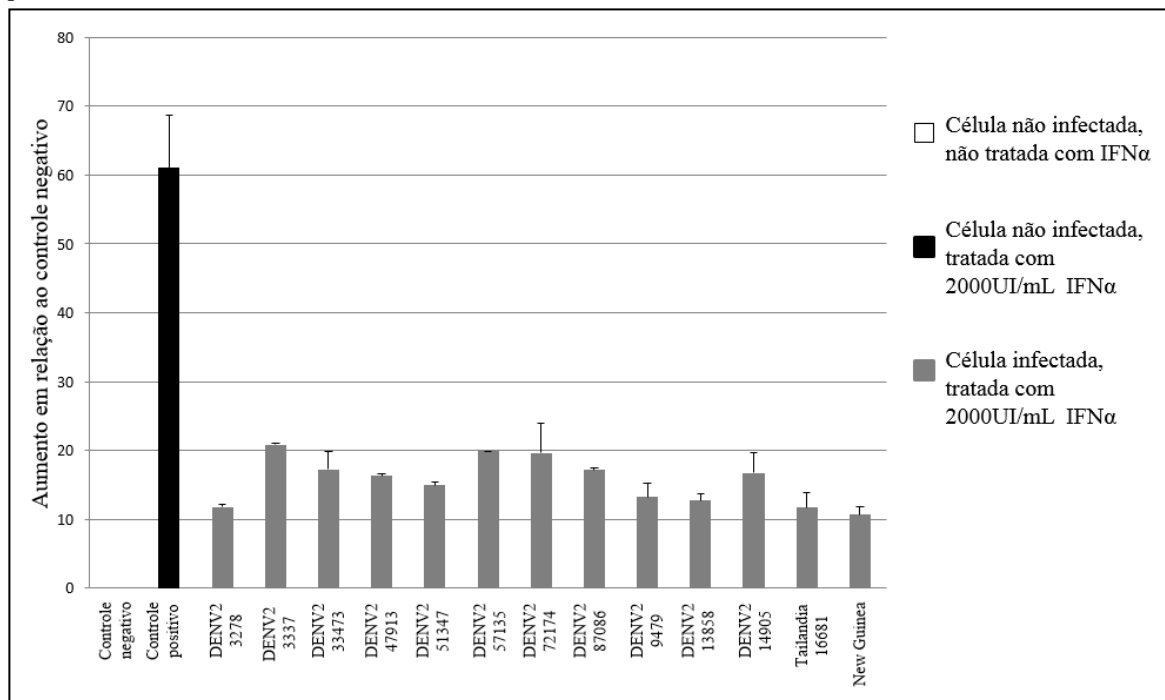
Gráfico 1 - Atividade da luciferase em células da linhagem BHK-21-ISRE-Luc-Hygro infectadas com diferentes cepas do DENV1 e tratadas durante 8 horas com 2000UI/MI de IFN α .



Fonte: A autora.

Nota: Dados expressos em relação ao controle negativo.

Gráfico 2 - Atividade da luciferase em células da linhagem BHK-21-ISRE-Luc-Hygro infectadas com diferentes cepas do DENV2 e tratadas durante 8 horas com 2000UI/MI de IFN α .

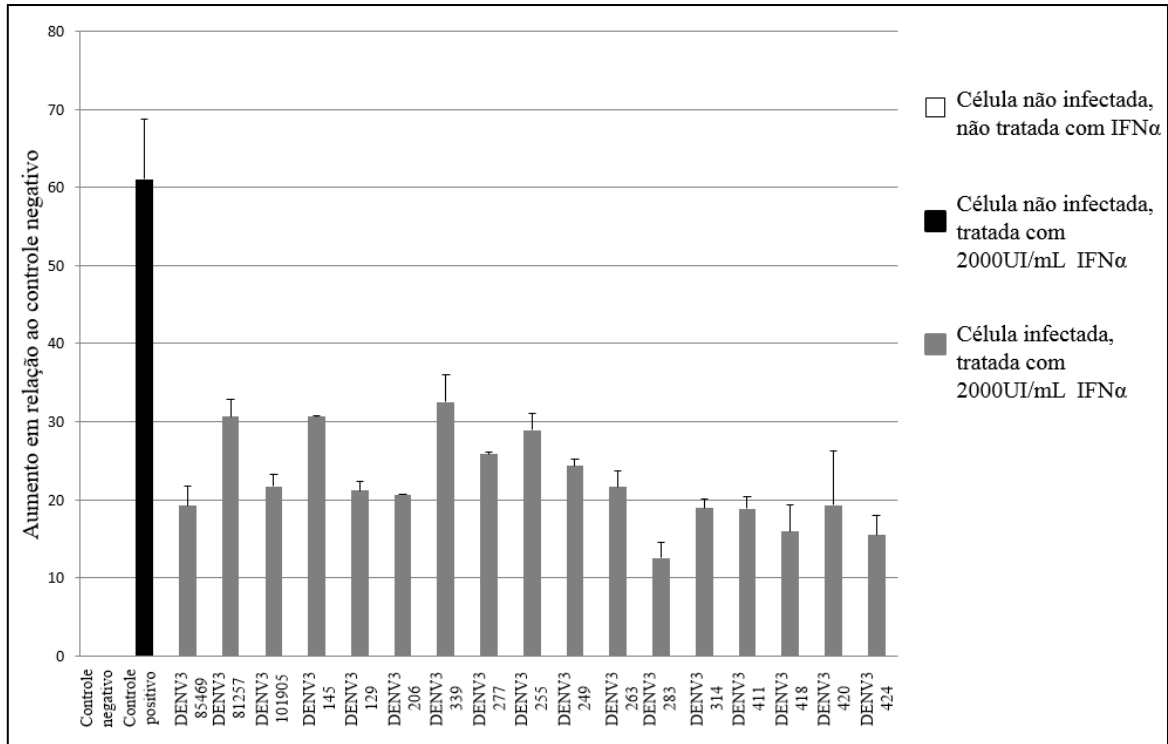


Fonte: A autora.

Nota: Dados expressos em relação ao controle negativo.

MOURA, L. R.

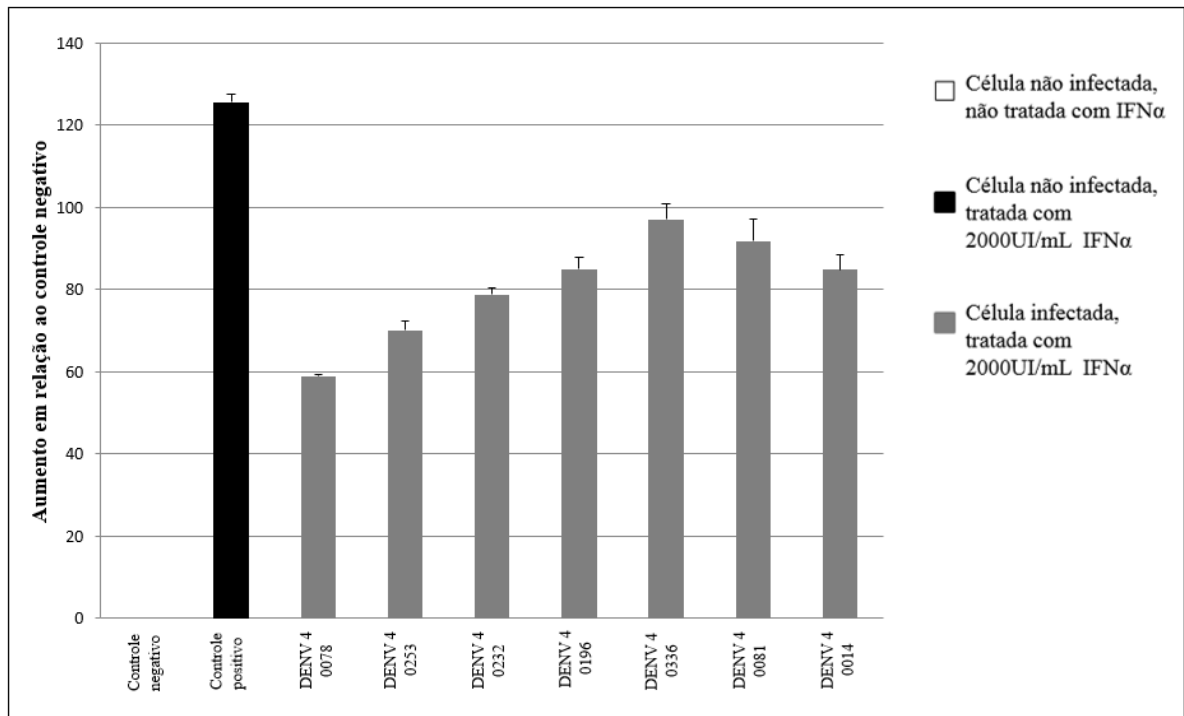
Gráfico 3 - Atividade da luciferase em células da linhagem BHK-21-ISRE-Luc-Hygro infectadas com diferentes cepas do DENV3 e tratadas durante 8 horas com 2000UI/MI de IFN α .



Fonte: A autora.

Nota: Dados expressos em relação ao controle negativo.

Gráfico 4 - Atividade da luciferase em células da linhagem BHK-21-ISRE-Luc-Hygro infectadas com diferentes cepas do DENV4 e tratadas durante 8 horas com 2000UI/MI de IFN α .



Fonte: A autora.

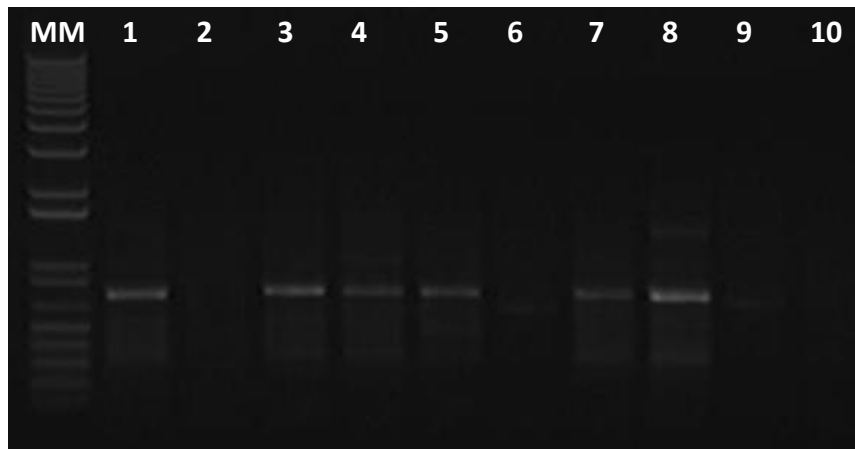
Nota: Dados expressos em relação ao controle negativo.

MOURA, L. R.

7.2 Construção do vírus recombinante pSVJS01-IC-DENV2GLuc

Dez clones de *S. cerevisiae* YPH 252 pSVJS01-IC-DENV2GLuc, selecionados de forma aleatória, foram testados após a recombinação homóloga. Após a extração do DNA plasmideal de levedura foi realizado PCR (como descrito no item 5.2.2) que confirmou a inclusão do gene da *Gaussia* luciferase no genoma viral (Figura 9).

Figura 9 - Confirmação da construção vírus recombinante pSVJS01-IC-DENV2GLuc por recombinação homóloga em levedura.

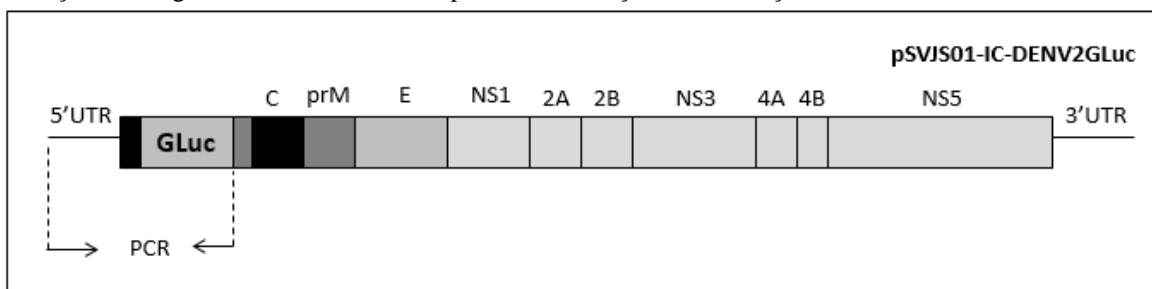


Fonte: A autora.

Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR. Os números indicam os clones de pSVJS01-IC-DENV2GLuc (1 ao 10), sendo a construção confirmada para os clones 1, 3, 4, 5, 7 e 8 com amplicon de 790pb. MM- marcador molecular 1 kb DNA Ladder Plus.

Os oligonucleotídeos, PBSC-RSRII-T7-5'DENV3 e Gluc-R (tabela 1), foram escolhidos por amplificarem um produto contendo parte do vetor e dos produtos recombinados (Figura 10) gerando um amplicon de 790pb, confirmando assim, a construção em seis dos dez clones selecionados (Figura 9).

Figura 10 - Representação esquemática da organização genômica do vírus pSVJS01-IC-DENV2GLuc e localização dos oligonucleotídeos utilizados para a confirmação da construção.



Fonte: A autora.

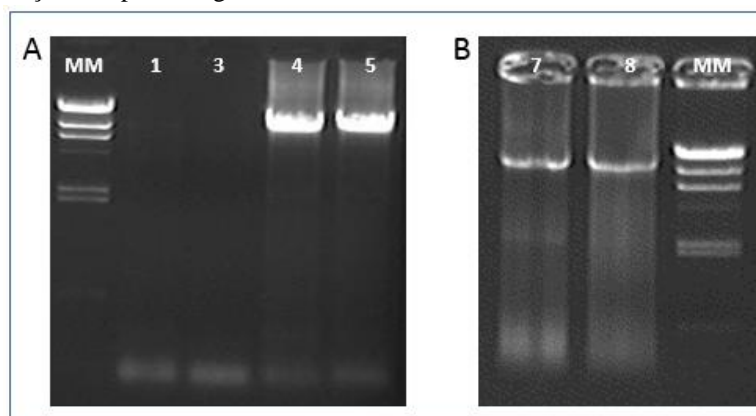
MOURA, L. R.

7.3 Recuperação da partícula viral recombinante

7.3.1 Recuperação da partícula viral

Uma vez confirmada a construção do vírus recombinante, os seis clones recombinantes (1, 3, 4, 5, 7 e 8) foram selecionados para amplificação de seus genomas completo por PCR. Desses clones, em apenas quatro (4, 5, 7 e 8) foi possível amplificar o genoma completo (Figura 11 A e B), sendo esses submetidos a posterior purificação com fenol-clorofórmio seguida por transcrição *in vitro* e eletroporação de células BHK-21, como descrito anteriormente na seção de Materiais e Métodos.

Figura 11 - Amplificação completa do genoma dos clones confirmados.



Fonte: A autora.

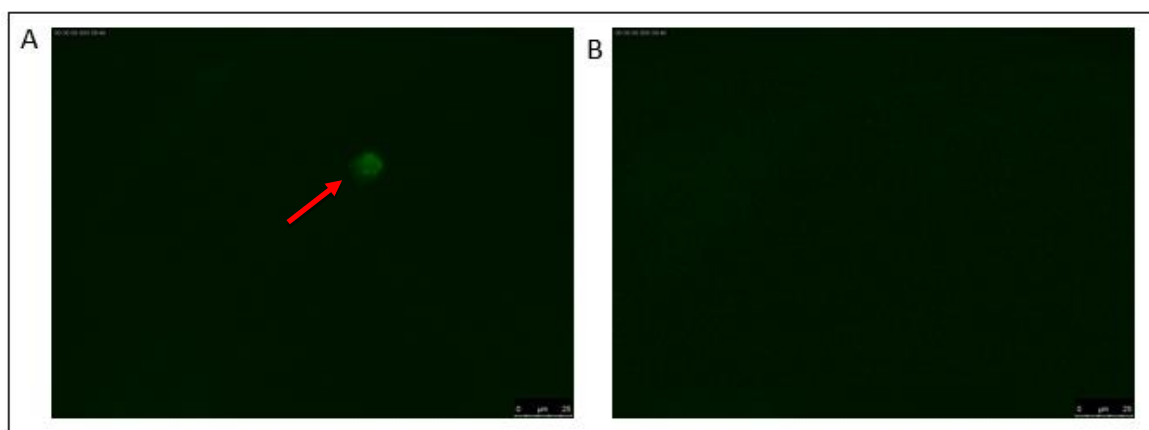
Nota: A – Amplificação do genoma completo dos clones 4 e 5. PCR não funcionou para os clones 1 e 3. B – Amplificação do genoma completo dos clones 7 e 8. MM – Marcador molecular Lambda DNA – hind III.

7.3.2 Replicação viral

Após a primeira passagem dos vírus, dez dias após a transfecção com o RNA transcrito *in vitro*, foi realizado o ensaio de imunofluorescência indireta (IFA) para observação da capacidade de infecção desses vírus, sendo observado fluorescência positiva no clone 5 (Figura 12). Não foi observado efeito citopático.

MOURA, L. R.

Figura 12 - Imunofluorescência indireta (IFI) em células BHK21 infectadas ou transfectadas pelo clone 5 da construção pSVJS01-IC-DENV2GLuc na primeira passagem.



Fonte: A autora.

Nota: A – IFA positiva (seta vermelha) do pSVJS01-IC-DENV2GLuc #5 transfectado; B - Controle negativo (células BHK-21).

7.3.3 Mensuração da atividade de *Gaussia Luciferase*

Durante a primeira passagem do vírus em células foi mensurada a expressão do gene repórter *Gaussia luciferase*, e comparada ao controle negativo (células não-infectadas). Dez dias após a infecção os clones não demonstraram expressão do gene repórter, o que pode ser decorrente do baixo título viral ou não replicação viral.

8 DISCUSSÃO

No presente trabalho, com o objetivo de esclarecer o envolvimento de diferentes cepas do DENV na inibição da via de sinalização do IFN-I, utilizamos a linhagem celular BHK-21-pISRE-Luc-Hygro, que possui em seu genoma o plasmídeo pISRE-Luc-Hygro que tem como promotor o ISRE (região responsiva ao IFN-I) fusionado ao gene repórter *firefly* luciferase, possibilitando estudar a ativação e inibição da sinalização da via do IFN-I pela mensuração da expressão desse gene repórter, que só é transcrito após a ativação do promotor ISRE estimulado pela ligação do IFN-I ao seu receptor na superfície celular.

Observamos que todas as cepas, mesmo de diferentes sorotipos, foram capazes de inibir, em diferentes proporções, a expressão da luciferase e conseqüentemente a sinalização do IFN α , esses dados estão de acordo com estudo realizado por Umareddy e colaboradores em que a resposta do IFN-I para diferentes cepas de dengue foi variada, sugerindo um fator de virulência viral a explicação para a resposta diferencial entre as cepas (UMAREDDY *et al.*, 2008). Dentre os sorotipos, o DENV2 (Gráfico 2) teve a maior capacidade inibição desta via. Essa característica pode ser devido a maior capacidade de replicação deste vírus e, portanto, maior produção de proteínas envolvidas na inibição. Estudos anteriores que compararam cepas DENV2 do Sudeste Asiático com os da América do Sul identificaram mutações na 3'UTR, bem como em prM, E, NS4B e NS5, que podem se correlacionar com as diferenças na sobrevivência viral e replicação (ALVAREZ *et al.*, 2005; EDGIL *et al.*, 2003). Curvas de crescimento viral dos diferentes sorotipos se encontram em andamento.

Estudos propõem que diferenças no antagonismo ao IFN pode ser um determinante importante das diferenças de patogenicidade observadas entre cepas de dengue (LEITMEYER *et al.*, 1999; UMAREDDY *et al.*, 2008). Isto é reforçado por Diamond e colaboradores em seu estudo onde a replicação foi inibida quando diferentes tipos de células foram tratadas com IFN antes da exposição ao vírus, mostrando que a replicação viral é essencial para o estabelecimento de uma infecção sólida no hospedeiro (DIAMOND *et al.*, 2000). Experimentos feitos com camundongos *knockout* para receptores IFN-I desenvolveram a forma mais grave da doença após infecção com o DENV, sugerindo que o IFN desempenha um papel importante na limitação da replicação do vírus dengue (JOHNSON, 1999; SHRESTA, 2004).

Além disso, foi observado que o pré-tratamento de células cultivadas com IFN-I reduz drasticamente a replicação do vírus dengue (DIAMOND, 2000, 2001). Isto ocorre principalmente através da inibição da tradução do RNA do vírus por um mecanismo ainda

MOURA, L. R.

desconhecido (DIAMOND, 2001). Esses relatos fornecem informações sobre fatores virais que modula a resposta da célula hospedeira e, possivelmente, modulam o desfecho clínico da infecção por DENV.

Muñoz-Jordan e colaboradores, 2005, num estudo *in vitro*, analisou a capacidade das proteínas do vírus da dengue em bloquear o sistema IFN, na qual concluiu que NS4B e possivelmente NS2 e NS4A atuam como inibidores da sinalização de IFN. Eles mostraram que a NS4B bloqueia a transdução de sinal em resposta tanto a IFN- β como IFN- γ em uma linhagem de células de mamífero, o que sugere que o alvo para a inibição de IFN via NS4B pode ser um componente comum as vias, possivelmente STAT1 fosforilado (MUNOZ-JORDAN *et al.*, 2005). Outro estudo sugere que NS5 seja um inibidor específico da sinalização do IFN-I atuando sobre STAT2 (MAZZON *et al.*, 2009).

Vários vírus RNA e DNA desenvolveram mecanismos específicos para subverterem os efeitos antivirais do IFN por meio da síntese de proteínas que interferem com a resposta do hospedeiro (FLORES, 2007), nossos resultados entram de acordo com o efeito anti DENV por IFN-I como descrito anteriormente na literatura. Estudos como estes são um passo importante na definição da patogênese da dengue, fornecendo pistas que sugerem possíveis novas abordagens para combater esta doença.

A construção do vírus repórter recombinante de DENV, no qual foi baseada na estratégia utilizada por Zou *et al.* (2011), em que o gene repórter foi inserido logo após os 38 primeiros aminoácidos do capsídeo. É também o primeiro relato de um clone infeccioso para DENV2 expressando o gene repórter *Gaussia luciferase* utilizando a técnica de recombinação homóloga em levedura.

Um obstáculo importante no desenvolvimento de clones infecciosos de genoma completo é a relativa instabilidade dos clones gerados a partir de sistemas de procariotos (POLO *et al.*, 1997; RUGGLI; RICE, 1999). Diferentes abordagens têm sido empregadas na tentativa de superar esta instabilidade. Através da manipulação do genoma do DENV e aproveitando as características da recombinação homóloga em levedura, geramos vírus recombinante repórter para monitorar a infectividade do DENV em cultura de células.

Dividido em cinco fragmentos, o genoma viral juntamente com o gene repórter foi recombinado com o vetor através da técnica de recombinação homóloga em levedura. A partir do DNA plasmidial extraído a construção de seis dos dez clones selecionados de forma aleatória foi confirmada. O genoma completo dos clones confirmados foi amplificado, sendo que apenas quatro apresentaram o amplicon esperado, isso pode ter sido causado pela qualidade do DNA extraído de leveduras.

MOURA, L. R.

Dos quatro clones transfectados em BHK-21 apenas o clone 5 apresentou baixa positividade no ensaio de IFA quando comparado ao controle negativo. O mesmo não apresentou efeito citopático, resultado semelhante ao encontrado por Leardkamolkarn *et al.* (2011) com uma construção de DENV2 expressando GFP. Nesse estudo, o vírus repórter de genoma completo falhou em gerar partículas infecciosas, que pode ter sido causado pela inserção do gene repórter na sequência sinal que impediria a dinâmica correta da clivagem de C e prM. Outro fator que pode ter contribuído para a baixa positividade na IFA, na nossa construção, é a qualidade do amplificado e conseqüente baixa qualidade no RNA transcrito *in vitro*. Outros clones serão testados na recuperação da partícula viral.

9 CONCLUSÕES

Baseado na linhagem celular BHK-21-ISRE-Luc-Hygro que expressa o gene *firefly* luciferase, podemos estudar a ativação da via de sinalização do IFN-I pela mensuração da expressão desse gene repórter, uma vez que o mesmo só é transcrito após a ativação do promotor ISRE estimulado pela ligação do IFN-I ao seu receptor na superfície celular.

Os resultados indicam que as diferentes cepas virais pertencentes a sorotipos distintos do DENV foram capazes de inibir em diferentes proporções a ativação da via de sinalização do IFN α , sendo o sorotipo DENV2 o que apresentou a maior capacidade inibição, possivelmente devido sua melhor replicação. Entretanto, estudos com diferentes tipos celulares são necessários para melhor conhecimento da inibição dessa via.

É descrito o primeiro relato de um clone infeccioso para DENV2 expressando o gene repórter *Gaussia luciferase* utilizando a técnica de recombinação homóloga em levedura. Esse sistema teve como base a introdução do repórter *in frame* com o genoma do vírus previamente construído em nosso laboratório. No entanto a transfecção de células com transcrito *in vitro* do clone cinco da construção falhou ao gerar partícula infectiva, sendo assim, outros clones deverão ser testados.

10 PERSPECTIVAS

A perspectiva é ampliar o número de cepas estudadas, utilizando a linhagem de células BHK-21-ISRE-Luc-Hygro. É visado também o desenvolvimento de linhagens para a avaliação da via de indução do IFN-I, assim como outras citocinas do sistema imune inato, na tentativa de ampliar o conhecimento sobre as respostas iniciais a infecção pelo DENV, contribuindo assim para o esclarecimento dos mecanismos imunopatológicos causados por este vírus.

Uma vez que a estratégia da construção do vírus repórter foi previamente publicado, esperamos recuperar partículas infectivas. Para isso será necessário a melhora da qualidade do RNA para posterior transfecção. Os vírus serão então caracterizados *in vitro* por ensaio de placa e curva de crescimento, tornando-se uma ferramenta útil para estudos de replicação e patogênese do DENV.

MOURA, L. R.

REFERÊNCIAS

- ALAM, J.; COOK, J.L. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 188, n. 2, p. 245-254, 1990.
- AGUIRRE, S. *et al.* DENV Inhibits Type I IFN Production in Infected Cells by Cleaving Humam STING. **PLOS Pathogens**, Washington, v.8, p.1-14, 2012.
- ALVAREZ, D. E. *et al.*, Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. **Virology**, New York, v. 339, p. 200–212, 2005.
- ASHOUR, J. *et al.* NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 83, n. 11, p. 5408-5418, 2009.
- BADR, C. E.; TANNOUS, B. A. Bioluminescence imaging: progress and applications. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 29, n. 12, p. 624-633, 2011.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G., Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos avançados**, São Paulo, v. 22, n. 64, p. 53-72, 2008.
- BAUM, A.; GARCIA-SASTRE, A. Differential recognition of viral RNA by RIG-I. **Virulence**, Providence, v. 2, p. 166–169, 2011.
- BOYER, J. C.; HAENNI, A. L. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. **Virology**, New York, v. 198, n. 2, p. 415-426, 1993.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico**. 3 ed. Brasília, DF: Ed. do Ministério da Saúde, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7 ed. Brasília, DF: Ed. do Ministério da Saúde, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **A dengue no Brasil**. Cartilha dengue, 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/flash/cartilha_dengue.html> Acesso em: 2 abr. 2014.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Informe Epidemiológico da Dengue**. Semanas 1 a 52 de 2009. Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=836&Itemid=>>. Acesso em 30 jun. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **A dengue no Brasil**. Cartilha dengue, 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/flash/cartilha_dengue.html>. Acesso em 16 jun. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos graves de dengue caem 44% e mortes têm retração de 20%**. Brasília, DF, 2013a. Disponível em:

MOURA, L. R.

<<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/9531/785/casos-graves-de-dengue-caem-44-e-mortes-tem-retracao-de-20.html>>. Acesso em 07 abr. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Mapa da dengue aponta 157 municípios em situação de risco e 525 em alerta**. Brasília, DF, 19 nov 2013b. Disponível em:

<<http://www.blog.saude.gov.br/index.php/programasecampanhas/33253-mapa-da-dengue-aponta-157-municipios-em-situacao-de-risco-e-525-em-alerta>>. Acesso em 09 mar 2014.

BRASIL. Boletim Epidemiológico. Brasília, DF: **Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 45, n. 6, 2014.

BREIMAN, A. *et al.* Inhibition of RIG-I-dependent signaling to the interferon pathway during hepatitis C virus expression and restoration of signaling by IKKepsilon. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 79, n. 7, p. 3969–3978, 2005.

BREDENBEEK, P. J. *et al.* A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. **The Journal of General Virology**, London, v. 84, n. 5, p. 1261-1268, 2003.

CHAMBERS, T. J. *et al.* Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Reviews of Microbiology**, Palo Alto, v. 44, p. 649-688, 1990.

CHANG, G. Molecular biology of dengue virus. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed). **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. New York: CAB International, p. 175-197, 1997.

CHUNG, K. M. *et al.* West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, Washington, v. 103, n. 50, p. 19111-19116, 2006.

CLYDE, K.; KYLE, J.; HARRIS, E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. **Journal of Virology**, Baltimore, v.80, p. 11418-11431, 2006.

CORDEIRO, M. *et al.* Dengue and dengue hemorrhagic fever in the State of Pernambuco, 1995-2006. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, p. 605-611, 2007a.

CORDEIRO, M. *et al.* Characterization of a dengue patient cohort in Recife, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 77, p. 1128-1134. 2007b.

CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA DE PERMANBUCO. **Estado confirma primeiros casos de dengue do tipo 4**. Disponível em:

<http://www.cremepe.org.br/leitorClipping.php?cd_clipping=44035>. Acesso em 30 jun 2014.

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

MOURA, L. R.

DIAMOND, M. S., *et al.* Modulation of dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 74, p. 4957–4966, 2000.

DIAMOND, M. S.; HARRIS, E. Interferon inhibits dengue virus infection by preventing translation of viral RNA through a PKR-independent mechanism. **Virology**, New York, v. 289, p. 297-311, 2001.

DIAMOND, M. S. Mechanisms of evasion of the type I interferon anti- viral response by flaviviruses. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, New York, v. 29, p. 521–530, 2009.

DONALÍSIO M. R. **O dengue no espaço habitado**. São Paulo: Humanismo, Ciência e Tecnologia, 1999.

EDGIL, D. *et al.* Translation efficiency determines differences in cellular infection among dengue virus type 2 strains. **Virology**, New York, v. 317, p. 275–290, 2003.

FERSH, J.W. Philippine hemorrhagic fever: a clinical, laboratory and necropsy study. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, New York, v. 73, n. 3, p. 451-458, 1969.

FIGUEIREDO L. T. M. Dengue. In: _____. **Tratado de Infectologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2002. p. 204-217.

FLORES, E. Diagnóstico laboratorial das infecções víricas. In: _____. **Virologia Veterinária**, editora ufsm, Santa Maria, 2007, p. 297- 326.

GALE, J. R. M.; SEN, G. Viral Evasion of the Interferon System. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, New York, v. 9, n. 9, p. 475-476, 2009.

GLUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 3, p. 480-96, 1998.

GREEN, A. M. *et al.* Innate Immunity to Dengue Virus Infection and Subversion of Antiviral Responses. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 426, p. 1148–1160, 2013.

GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Dengue: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 2, n. 1, p. 33-42, 2002.

HALSTEAD, S. B.; MARCHETTE, N. J. Biologic properties of dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: studies at the University of Hawaii. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 69, n. 6, p. 5-11, 2003.

HAMMON, W. M. Dengue hemorrhagic fever: do we know its cause? **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 22, p. 82–90, 1973.

HARRIS, E. *et al.* Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 63, n. 1-2, p. 5-11, 2000.

MOURA, L. R.

HOSSAIN, M. J. *et al.* Establishment and characterization of a Madin-Darby canine kidney reporter cell line for influenza A virus assays. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.48, n. 7, p. 2515–2523, 2010.

IMOTO, J. I.; KONISHI, E. Dengue tetravalent DNA vaccine increases its immunogenicity in mice when mixed with a dengue type 2 subunit vaccine or an inactivated Japanese encephalitis vaccine. **Vaccine**, Guildford, v. 25, p. 1076-1084, 2007.

JOHNSON, A. J.; ROEHRIG, J. T. New mouse model for dengue virus vaccine testing. **Journal of Virology**, Baltimore, v.73, p.783–786, 1999.

JONES, M. *et al.* Dengue Virus Inhibits Alpha Interferon Signaling by Reducing STAT2 Expression, **Journal of Virology**, Baltimore, v. 79, p. 5414-5420, 2005.

KHROMYKH, A. A. *et al.* Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin virus. **Journal of Virology**, Washington, v. 75, n. 10, p. 4633-4640, 2000.

KURANE, I., B. L. *et al.* High levels of interferon alpha in the sera of children with dengue virus infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.48, p.222–229, 1993.

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

LEARDKAMOLKARN, V. *et al.* Development of Dengue type-2 virus replicons expressing GFP reporter gene in study of viral RNA replication. **Virus Research**, Amsterdam, v. 163, p. 552-562, 2012.

LEI, H. Y. *et al.* Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. **Journal of Biomedical Science**, Dordrecht, v.8, p. 377-388, 2001.

LEITMEYER, K. C. *et al.* Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 73, p. 4738–4747, 1999.

LEUNG, J. Y. *et al.* Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 82, n. 10, p. 4731-4741, 2008.

LI, S. *et al.* Coronavirus Papain-like Proteases Negatively Regulate Antiviral Innate Immune Response through Disruption of STING-Mediated Signaling. **PLOS One**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. 2012.

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

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 73, n. 6, p. 4611-4621, 1999.

MOURA, L. R.

LINDENBACH, B.; THIEL, H.; RICE, C. Flaviviridae: The Viruses and Theirs Replication. In: KNIPE, D.; HOWLEY, P. **Fields Virology**. 5 ed., Washington: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, v. 2, 2007, p. 250-255.

LÓPEZ, C. *et al.* Type I interferon induction pathway, but not released interferon, participates in the maturation of dendritic cells induced by negative-strand RNA viruses, **The Journal of Infectious Disease**, Boston, v. 187, p. 1126-1136, 2003.

MAEDA, A.; MAEDA, J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. **The Veterinary Journal**, London, v.195, p. 33-40, 2013.

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**, Baltimore, v. 75, n. 20, p. 9633-9643, 2001.

MAZZON, M. *et al.* Dengue virus NS5 inhibits interferon-alpha signaling by blocking signal transducer and activator of transcription 2 phosphorylation, **Journal Infectious Diseases**, Chicago, v. 200, p. 1261-1270, 2009.

MODIS, Y. *et al.* Structure of the Dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, Basingstoke, v. 427, n. 6972, p. 313-319, 2004.

MORRISON, J.; AGUIRRE, S.; FERNANDEZ-SESMA, A., Innate Immunity Evasion by dengue virus. **Viruses**, Basel, v. 4, p. 397-413, 2012.

MORRISON, J. *et al.* Dengue Virus Co-opts UBR4 to Degrade STAT2 and Antagonize Type I Interferon Signaling. **PLOS Pathogens**, Washington, v. 9, n. 3, p. 1-13, 2013.

MORRISON, J.; GARCÍA-SASTRE, A. STAT2 signaling and dengue virus infection. **Landes Bioscience**, London, v. 3, p. 1-6, 2014.

MUNOZ-JORDAN, J. L. *et al.* A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, Washington, v. 100, n. 24, p. 14333-14338, 2003.

MUNOZ-JORDAN, J. L. *et al.* A. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 79, n. 13, p. 8004-8013, 2005.

NAVARRO-SÁNCHEZ, E.; DESPRÉS, P.; CEDILLO-BARRÓN, L. Innate Immune Responses to Dengue Virus. **Archives of Medical Research**, New York, v. 36, n. 5, p. 425–435, 2005.

NAYLOR, L. H. Reporter gene technology: the future looks bright. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 58, n. 5, p. 749–757, 1999.

NG, C. Y. *et al.* Construction and characterization of a stable subgenomic dengue virus type 2 replicon system for antiviral compound and siRNA testing. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 76, n. 3, p. 222-231, 2007.

MOURA, L. R.

NIELSEN, D. G. The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. **Virology journal**, London, v. 6, p. 211, 2009.

NOBLE, C. G *et al.* Strategies for development of dengue virus inhibitors. **Antiviral Research**, Amsterdam, v.85, n.3, p.450-462, 2010.

NOGUEIRA, R. M. R. *et al.* Dengue Hemorrhagic Fever/Dengue Shock Syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 1, p. 269, 1991.

NOGUEIRA, R. M. *et al.* Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 7, p. 925-6, 2001.

NORMILE, D. **First new dengue virus type in 50 years**. Washington, 2013. Disponível em: <<http://news.sciencemag.org/health/2013/10/first-new-dengue-virus-type-50-years>>. Acesso em: 23 abr 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Dengue and severe dengue**. Geneva, 2012. (Factsheet No 117, revised november 2012) Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em 03 abr 2013.

OSANAI, C. *et al.* Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 25, n.1, p.53-54, 1984.

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

PERERA, R; KUHN, R. J. Structural proteomics of dengue virus. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 11, n. 4, p. 1-9, 2008.

PICHYANGKUL, S. *et al.* A blunted blood plasmacytoid dendritic cell response to an acute systemic viral infection is associated with increased disease severity. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 171, p. 5571–5578, 2003.

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

QUEIROZ, S. R. A *et al.* Construction of yellow fever virus subgenomic replicons by yeast-based homologous recombination cloning technique. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, p.159-168, 2011.

RODRIGUEZ-MADOZ *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. 18, p. 9760–9774, 2010a.

RODRIGUEZ-MADOZ *et al.* Dengue virus inhibits the production of type I interferon in primary human dendritic cells. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 84, n. 19, p. 4845–4850, 2010b.

MOURA, L. R.

ROSSI, S. L. *et al.* Adaptation of West Nile virus replicons to cells in culture and use of replicon-bearing cells to probe antiviral action. **Virology**, New York, v. 331, n. 2, p. 457-470, 2005.

ROSEN, L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 26, p. 337-343, 1977.

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

SABIN, A. B. Research on Dengue during World War II. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.1, p.30-50, 1952.

SCHATZMAYR, H. G. *et al.* An outbreak of dengue vírus at Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81, p. 245-246, 1986.

SCHATZMAYR, H. G. Dengue situation in Brazil by year 2000. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, supl. 1, p. 179-181, 2000.

SCHOGGINS, J.W. *et al.* Dengue reporter viruses reveal viral dynamics in interferon receptor-deficient mice and sensitivity to interferon effectors in vitro. **PNAS**, New York, p. 1-6, 2012.

SCHRAUF, S. *et al.* Extension of Flavivirus Protein C Differentially Affects Early RNA Synthesis and Growth in Mammalian and Arthropod Host Cells. **Journal of virology**, Baltimore, v. 83, p. 11201-11210, 2009.

SETH, R. B.; SUN, L.; CHEN, ZHIJIAN J. Antiviral innate immunity pathways, **Cell Research**, Beijing, v. 16, p. 141-147, 2006.

SHRESTA, S. J. L. *et al.*, Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. **Journal of Virology**, Baltimore, v.78, p.2701-2710, 2004.

SIERRA, B. C.; KOURI, G.; GUZMÁN, M. G. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. **Archives of Virology**, Viena, v. 152, p. 533-542, 2007.

SILVA, A. M. **Caracterização molecular dos vírus dengue circulantes em Pernambuco: implicações epidemiológica.** Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

SOUZA, J.L.D. **Dengue: diagnóstico, tratamento e prevenção.** 1 ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2007.

SOUZA, R. P. *et al.* Dengue Virus Type 4 Phylogenetics in Brazil 2011: Looking beyond the Veil. **PLOS Neglected Tropical Disease**, San Francisco, v. 5, n. 12, p. 1-7, 2011.

MOURA, L. R.

SONG, Y.; PAUL, A.V.; WIMMER, E. Evolution of Poliovirus Defective Interfering Particles Expressing Gaussia Luciferase. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 86, n. 4, p. 1999-2010, 2011.

SUDIRO, T. M., *et al.* Analysis of plasma viral RNA levels during acute dengue virus infection using quantitative competitor reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Medical Virology**, New York v. 63, p. 29-34, 2001.

TANNOUS B.A. *Gaussia* luciferase reporter assay for monitoring of biological processes in culture and in vivo. **Nature Protocols**, London, v. 4, n. 4, p. 582-591, 2009.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, p. 99-102, 2001.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p. 867-871, 2002.

TEIXEIRA, M.G.; BARRETO, M.L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe Epidemiológico do SUS**, Brasília, DF, v. 8, p. 5-33. 1999.

TEO, K.; WRIGHT, P. Internal proteolysis of the NS3 protein specified by dengue virus 2. **Journal of General Virology**, London, v. 78, p. 337-341, 1997.

TSAI, Y. *et al.* Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. **Cellular Microbiology**, Taiwan, v. 11, n. 4, p. 604-615, 2009.

UMAREDDY, I. *et al.* Dengue virus regulates type I interferon signalling in a strain-dependent manner in human cell lines. **Journal of General Virology**, London, v. 89, p.3052-3062, 2008.

VAUGHN, D. W. *et al.* Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **Journal Infection Disease**, Chicago, v.181, p. 2-9, 2000.

WANG, W. *et al.* Slower rates of clearance of viral load and virus-containing immune complexes in patients with dengue hemorrhagic fever. **Clinical Infectious Diseases**, Boston, v. 43, n. 8, p. 1023-30, 2006.

WENXIANG, S. *et al.* ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. **PNAS**, New York, v. 106, n. 21, p. 8653-8658, 2009.

WURDINGER, T. *et al.* A secreted luciferase for *ex-vivo* monitoring of *in vivo* processes. **Nature Methods**, New York, v. 5, n. 2, p. 171-173, 2009.

YAMSHCHIKOV, G. *et al.* The suitability of yellow fever and Japanese encephalitis vaccines for immunization against West Nile virus. **Vaccine**, Guildford, v. 23, p. 4785-4792, 2005.

YANG, C. C. *et al.* Characterization of an efficient dengue virus replicon for development of assays of discovery of small molecules against dengue virus. **Antiviral research**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 228-241, 2012.

MOURA, L. R.

YESSEINIA, I. *et al.* Dengue Virus Subverts the Interferon Induction Pathway via NS2B/3 Protease-IB Kinase ϵ Interaction. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 21, n. 1, p. 29-38, 2014.

YUN, S. I. *et al.* Development and Application of a Reverse Genetics System for Japanese Encephalitis Virus. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 77, n. 11, p. 6450–6465, 2003.

ZABEREZHNYI, A. D. The technology of recombinant infectious genomes in studies of RNA-containing viruses. **Molecular genetics, microbiology and virology**, Moskva, v. 4, p. 13-19, 2004.

ZHU, W. *et al.* A reporter system for assaying influenza virus RNP functionality based on secreted Gaussia luciferase activity. **Virology Journal**, London, v. 8, n. 1, p. 29, 2011.

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