

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE,
SOCIEDADE E ENDEMIAS NA AMAZÔNIA**

**MICROEVOLUÇÃO *IN VITRO* DO VÍRUS DENGUE, SOROTIPO-4:
ESTUDO DE VARIAÇÕES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO AUMENTO
DA COMPETÊNCIA VIRAL**

VALDINETE ALVES DO NASCIMENTO

**Manaus
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE,
SOCIEDADE E ENDEMIAS NA AMAZÔNIA**

VALDINETE ALVES DO NASCIMENTO

**MICROEVOLUÇÃO *IN VITRO* DO VÍRUS DENGUE, SOROTIPO-4:
ESTUDO DE VARIAÇÕES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO AUMENTO
DA COMPETÊNCIA VIRAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito necessário para a obtenção do título de Mestre.

Linha de Pesquisa: Biologia de agentes infecciosos e parasitários.

Orientador: Dr. Felipe Gomes Naveca

**Manaus
2014**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

N244m	Nascimento, Valdinete Alves Microevolução in vitro do vírus dengue, sorotipo-4: estudo de variações genéticas associadas ao aumento da competência viral / Valdinete Alves Nascimento. 2014 75 f.: il. color; 31 cm.
	Orientador: Felipe Gomes Naveca Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia) - Universidade Federal do Amazonas.
	1. Arbovírus. 2. Dengue. 3. Evolução. 4. Genômica. 5. Competência Viral. I. Naveca, Felipe Gomes II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

DEDICATÓRIA

Com todo carinho eu dedico esta conquista a minha mãe Ivanete e meu pai Aldi, meus grandes exemplos de vida e os maiores tesouros que eu possuo. Cada passo que dou em busca dos meus sonhos e cada vitória alcançada é para eles também. Com muito amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, sem o qual nada sou, pelo dom da vida, pela força concedida a cada dia e por se mostrar sempre presente na minha vida realizando maravilhas e orientando-me nas minhas escolhas.

A minha amada família, minha mãe Ivanete e meu pai Aldi, dois guerreiros e batalhadores que tenho muito orgulho e admiração. Agradeço por todo amor a mim dedicado, todo o carinho, apoio e incentivos em todos os momentos e pelo esforço para proporcionarem minha educação permitindo que eu chegasse até aqui. O mérito é deles também. E ao meu irmão Valdenir pelo amor e apoio essencial em todos os momentos e por torcer sempre pelas minhas vitórias.

Ao meu orientador Felipe Naveca, que tive a felicidade de conhecer no ano de 2009 e desde então vem exercendo importante papel na minha formação profissional. Agradeço pela orientação recebida, por todo o apoio fundamental no desenvolvimento deste trabalho, por todos os ensinamentos repassados, pelas demonstrações de confiança que são muito importantes para mim e também pela amizade construída ao longo desse período. Meu muito obrigada.

Aos meus amigos do coração Ricardo e Giselle por sempre me apoiarem e incentivarem a seguir em frente. Pelo companheirismo, chegando ao ponto de ir ao laboratório simplesmente para me fazer companhia e eu não ficar sozinha.

Ao Tiago, meu namorado pelo carinho, incentivo e compreensão em todos momentos de falta, que foram muitos e por me ceder sua internet nos momentos em que a minha simplesmente resolvia não funcionar.

Ao amigo Victor Costa, por toda ajuda fornecida no desenvolvimento deste trabalho e por sua atuação fundamental nas reações de sequenciamento, principalmente por NGS e também pelo apoio e companhia nos momentos que precisei.

As amigas Tati, Dana e Brenda pela companhia agradável no laboratório, pelo incentivo e torcida sincera por minha conquista e por realizarem eletroforese nos momentos que eu precisava permanecer livre de *amplicons* para dar seguimento a outros experimentos.

A Dra Claudia Rios, pelo incentivo e pelas palavras de força e perseverança nos momentos difíceis. Também por disponibilizar seu tempo no desenvolvimento de um plano alternativo para a realização deste mestrado.

Aos amigos Antonio e Juci que mesmo sendo alunos de outro programa de Mestrado conseguimos dividir muitos momentos principalmente os mais desesperadores quando tudo parecia dar errado e assim fomos construindo uma amizade. Agradeço pelo apoio e torcida sincera.

As amigas Thais e Fernanda que mesmo estando longe nunca deixaram de me apoiar e sempre me davam palavras de força. Agradeço o apoio, torcida e preocupação de vocês.

As amigas mais implicantes que eu tenho Fran, Priscila e Erica, pela torcida sincera, pelo apoio e incentivo sempre fornecidos e por compreenderem meus horários e aceitarem se encaixar neles para que eu pudesse continuar participando de nossas reuniões.

Ao Yury e George pelo apoio na realização dos experimentos de citometria.

Aos colegas da turma de mestrado, pelos momentos compartilhados principalmente durante a realização das disciplinas do curso.

Ao ILMD - FIOCRUZ/AM pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos com a realização deste trabalho e pela estrutura fornecida.

A CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

A todos que sempre torceram por mim e que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desta conquista.

“Os dias correm, somem e com o tempo não vão voltar. Só há uma chance para viver. Não perca a força e o sonho, não deixe nunca de acreditar que tudo vai acontecer”

Rosa de Saron

RESUMO

O vírus Dengue (DENV) pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, sendo reconhecidos quatro sorotipos distintos denominados DENV-1 a DENV-4. Assim como os demais vírus RNA, o DENV exibe variação em suas sequências, com uma taxa de erro durante o ciclo de replicação estimada em 10^{-3} a 10^{-5} erros/nucleotídeo. Essas variações são observadas não só quando analisadas amostras de diferentes indivíduos, mas também dentro de um mesmo hospedeiro. Considerando a necessidade de uma maior compreensão dos mecanismos relacionados ao processo evolutivo do DENV e a emergência de subpopulações virais, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a microevolução *in vitro* do vírus dengue, sorotipo-4, analisando a existência de variações genéticas associadas ao aumento da competência viral (*viral fitness*). Para tanto, uma amostra do DENV-4 denominada BrAM005/2011 foi inoculada em células C6/36, sendo realizadas passagens seriadas do vírus nesta linhagem celular até a passagem 25. Finalizadas as passagens, foi realizada extração do RNA viral e o cDNA foi produzido utilizando iniciador específico para DENV-4. O genoma completo da amostra BrAM005/2011 e das passagens 1, 5, 10, 15, 20 e 25 foi obtido pelo método Sanger utilizando sequenciador automático ABI 3130 *genetic analyzer* e por meio de sequenciamento de nova geração (NGS) utilizando a tecnologia *Ion Torrent* no equipamento Ion PGM™ System. Os arquivos gerados após as reações de sequenciamento foram analisados utilizando o software Geneious versão 7.1.7. A análise dos dados fornecidos pelo sequenciamento de Sanger mostrou que no decorrer das passagens ocorreram duas mutações de nucleotídeos, sendo uma na região codificante para a proteína do envelope que resultou na substituição de um resíduo de aminoácido e outra na região da proteína NS1, porém esta foi uma mutação silenciosa. Os resultados do NGS corroboraram com os obtidos pelo sequenciamento de Sanger e apresentaram outras dezessete mutações não observadas pelo método anterior, sendo as mesmas nas regiões codificantes para as proteínas E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. Do total de mutações observadas, seis delas resultaram em substituição de resíduo de aminoácido. Considerando as mutações observadas, realizamos o estudo de cinética viral por RT-qPCR utilizando o método de $\Delta\Delta C_t$ que indicou um aumento do número de cópias de RNA viral, dependente do tempo pós-infecção, tanto presente no sobrenadante de células infectadas quanto no interior das células, indicando um possível aumento da competência viral. Outros estudos se tornam necessários para confirmar se as mutações aqui encontradas também ocorrem em células de mamíferos e em sistemas *in vivo*, de maneira a verificar se o aumento do *fitness* viral observado neste estudo se repete em outros sistemas.

Palavras chave: Arbovírus, Dengue, Evolução, Genômica, Competência Viral

ABSTRACT

Dengue virus (DENV) belongs to the family *Flaviviridae* and the genus *Flavivirus*, being recognized as four distinct serotypes termed DENV-1 to DENV-4. Like other RNA viruses, DENV displays variation in their sequences, with an error rate during replication cycle estimated at 10^{-3} to 10^{-5} errors / nucleotide. These variations are observed not only when samples from different individuals are analyzed, but also within the same host. Considering the need for a better understanding of related mechanisms of DENV evolutionary process and the emergence of viral subpopulations, this study aimed to evaluate the *in vitro* microevolution of dengue virus serotype-4, analyzing the existence of genetic variations associated with increased viral fitness. For this purpose, a sample of DENV-4 called BrAM005/2011 was inoculated in C6/36 cells and 25 serial passages were performed. After these passages, viral RNA extraction was performed and the cDNA was produced using a specific DENV-4 primer. The full-length genome of the sample BrAM005/2011 and passages 1, 5, 10, 15, 20 and 25 were obtained by the Sanger method using the ABI 3130 Genetic Analyzer and by Next-Generation Sequencing (NGS) using the Ion Torrent technology. The files generated after the sequencing reactions were analyzed using Geneious software version 7.1.7. The analysis of the data provided by the Sanger sequencing has shown that during the 25 passages, two nucleotide mutations occurred, one in the region which encodes for the envelope protein, resulting in the substitution of an amino acid residue T501P, and other silent mutation at NS1 gene. The results of NGS corroborate those obtained by Sanger sequencing. Moreover, seventeen other mutations not previously observed, being the same in the coding regions for proteins E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5. Of the total observed mutations, six of them led to residue substitution. Considering the observed amino acids substitutions, we conducted a study of viral kinetics by RT-qPCR using the $\Delta\Delta C_t$ method which indicated a time-dependent increase in the number of copies of viral RNA present in both the supernatant or inside the infected cells, indicating a possible increase of the viral fitness. Other studies are necessary to confirm if the mutations described here also occurs in mammalian cells or *in vivo* systems, as well as to verify if the observed increase in viral *fitness* occurs in other systems.

Keywords: Arbovirus, Dengue, Evolution, Genomics, Viral fitness

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa representativo dos países ou áreas de risco para dengue no mundo.....	15
Figura 2: Etapas do Ciclo de replicação do DENV.....	18
Figura 3: Organização genômica dos <i>Flavivirus</i>	20
Figura 4: Estrutura esquemática da proteína E do vírus dengue.....	21
Figura 5: Esquema das passagens em série do vírus em cultura de células C6/36.....	27
Figura 6: Esquema das reações de PCR para amplificação do genoma completo do DENV4.....	32
Figura 7: Eletroforese da padronização das reações de PCR.....	44
Figura 8: Identificação de mutações através do sequenciamento capilar.....	46
Figura 9: Sequencia deduzida da proteína E destacando a mutação T222P.....	47
Figura 10: Monômero da proteína de envelope (E) das amostras P1 e P25, aminoácidos 1 a 395.....	51
Figura 11: Resultado da citometria de fluxo após teste de padronização das concentrações de anticorpos.....	52
Figura 12: Média de Ct de P1 e P25 para titulação da carga viral.....	54
Figura 13: Análise do <i>fitness</i> viral a partir do sobrenadante das culturas infectadas.....	55
Figura 14: Análise do <i>fitness</i> viral a partir do RNA obtido das células C6/36 infectadas...55	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados na padronização das reações de PCR.....	29
Tabela 2: Pares de iniciadores utilizados nas reações de PCR para amplificação do genoma completo do DENV-4.....	30
Tabela 3: Iniciadores utilizados na reação de sequenciamento capilar.....	35
Tabela 4: Identificação dos <i>barcodes</i> utilizados para cada biblioteca.....	37
Tabela 5: Iniciadores e sonda utilizados nas reações de RT-qPCR.....	41
Tabela 6: Iniciadores utilizados nas reações de PCR.....	44
Tabela 7: Sítios variáveis identificados por sequenciamento de nova geração e análise de variantes.....	49
Tabela 8: Porcentagem de sítios variáveis/tamanho do genoma identificados em cada passagem.....	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO	16
2.1 Dengue.....	16
2.1.1 Aspectos Epidemiológicos	16
2.1.2 Agente Etiológico.....	18
2.2 Processo Evolutivo em Arbovírus	22
2.3 Competência Viral (<i>Fitness Viral</i>).....	24
3 OBJETIVOS.....	26
4 METODOLOGIA	27
4.1 Amostra utilizada no estudo	27
4.2 Manutenção de culturas celulares	27
4.3 Passagens em série do vírus em cultura de células.....	28
4.4 Extração de Ácido Ribonucleico (RNA viral).....	29
4.5 Produção de Ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA).....	29
4.6 Padronização da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para amplificação do genoma completo.....	30
4.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	31
4.8 Purificação do produto da PCR por Polietilenoglicol (PEG)	34
4.9 Sequenciamento do genoma viral por eletroforese capilar	34
4.10 Sequenciamento de Nova Geração (NGS) – Ion Torrent.....	37
4.11 Modelagem de Proteína por homologia	39
4.12 Citometria de Fluxo.....	40
4.13 RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR).....	42
4.14 Análise estatística dos dados	42
5 RESULTADOS	44
5.1 Passagens em série.....	44
5.2 Padronização e reações de PCR.....	44
5.3 Reações de sequenciamento capilar	46
5.5 Reações de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) – Ion Torrent	48

5.6 Modelagem da proteína E por homologia	52
5.6 Citometria de Fluxo	53
5.7 PCR em Tempo Real.....	55
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÃO	69
REFERENCIAL	71

1 INTRODUÇÃO

Os arbovírus são importantes agentes causadores de doença humana em regiões tropicais e subtropicais. Mantêm-se em ciclos envolvendo hospedeiros vertebrados e vetores artrópodes (Ciota e Kramer 2010), dentre os quais destaca-se o vírus Dengue (DENV) como arbovírus mais prevalente em todo mundo.

A infecção pelo DENV pode ser assintomática ou resultar em uma doença de amplo espectro clínico, variando de uma forma leve e não diferenciada, até formas mais graves, caracterizadas pelo extravasamento do plasma, trombocitopenia e hemoconcentração, podendo em casos extremos levar ao óbito. Desde o ano de 2009 a organização mundial de saúde redefiniu a categorização dos quadros de dengue e hoje são classificados febre do dengue; dengue com sinais de alarme e dengue grave (WHO 2009).

Com base em estudos anteriores, Holmes e Burch (2000) sugeriram que a diversidade dos DENV está aumentando, bem como, a diferença de virulência entre as cepas virais. Assim, em uma epidemia podem circular diferentes variantes virais, estando entre elas vírus mutantes que obtiveram mais sucesso ao replicarem no hospedeiro e serem transmitidos (Rico-Hesse *et al* 1998).

Como consequência destas mutações, com o passar do tempo poderemos estar expostos a vírus com uma gama maior de propriedades patogênicas, uma vez que estudos indicam a presença de mutações em regiões específicas do genoma viral como possíveis determinantes para aumentar ou diminuir a virulência da cepa (Sanchez e Ruiz 1996; Leitmeyer *et al.* 1999) bem como podem estar associadas ao aumento da transmissão do dengue (Lambrechts *et al.* 2012).

Considerando a lacuna existente no conhecimento da circulação de subpopulações do vírus; a necessidade de um melhor entendimento dos mecanismos relacionados à mutações no genoma viral e emergência de subpopulações, bem como o fato de que o controle eficiente da

dengue requer entre outros aspectos o conhecimento do vírus circulante (Rico-Hesse 1990), torna-se importante compreender os processos que geram variabilidade genética em populações do DENV, e neste contexto, é imprescindível a realização de estudos que contribuam com a elucidação de tais questões.

Assim, o presente trabalho pretende contribuir com a ampliação dos conhecimentos sobre o processo de adaptação (seleção) do vírus dengue, em especial do sorotipo 4, em cultura de células de mosquito, descrevendo as mutações observadas no genoma viral ao longo de passagens sucessivas e verificar se as mesmas estão relacionadas ou não ao aumento da competência viral.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Dengue

2.1.1 Aspectos Epidemiológicos

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que a dengue é um dos principais problemas de saúde pública mundial com um cenário preocupante, no qual a doença se mostra presente de forma epidêmica em mais de 100 países, tendo aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas vivendo em área de risco para a doença (figura 1) e um número estimado de 50 – 100 milhões de casos anuais em todo o mundo (WHO 2014).



Figura 1: Mapa representativo dos países ou áreas de risco para dengue no mundo. Em amarelo estão destacadas as regiões onde a doença tem sido registrada. (WHO 2011).

As regiões das Américas, do Sudeste Asiático e do Pacífico Ocidental são as mais afetadas, onde um número crescente de casos vem sendo registrados a cada ano. Nestas regiões os casos registrados ultrapassaram 1,2 milhões em 2008. No ano de 2010 ultrapassaram 2,3 milhões e recentemente o número de casos notificados continua a aumentar com 2.350.000 casos registrados apenas nas Américas (WHO 2014).

No Brasil, o primeiro registro epidêmico com confirmação laboratorial ocorreu em 1982 em Boa Vista – Roraima, causado pelos sorotipos 1 e 4, acometendo cerca de 11.000 pessoas (Travassos-da-Rosa *et al.* 1982). Em seguida, foram registradas várias epidemias e surtos nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Alagoas e Ceará, com o sorotipo DENV-1 sendo o agente causador (Travassos-da-Rosa *et al.*, 1997).

Os primeiros casos reportados, na região Norte, com exceção do estado de Roraima, foram a partir de 1995, nas cidades de Redenção e Rondon, no estado do Pará (Travassos-da-Rosa *et al.*, 1997). Na cidade de Manaus - Amazonas a primeira epidemia deu-se no período de 1998-1999, com mais de 3.000 casos confirmados (Figueiredo *et al.* 2004).

Os números atuais do Ministério da Saúde mostram que a transmissão da doença no Brasil vem ocorrendo de forma continuada, intercalando com a ocorrência de epidemias geralmente associadas à introdução de novos sorotipos em áreas anteriormente indenes ou alteração do sorotipo predominante (Ministério da Saúde 2014a).

Considerando os anos de 2011 a 2013 é possível observar uma oscilação nos números de casos notificados. Observa-se um grande surto em 2011 apresentando cerca de 770 mil ocorrências, uma redução em 2012 com cerca de 590 mil casos e em 2013 ocorreu o maior surto já registrado no país com aproximadamente 1.500.000 notificações. Em 2014, no primeiro semestre foram registrados 659.051 casos da doença, número que quando comparado com mesmo período de 2013 mostra uma redução de 52% dos casos no país (Ministério da Saúde 2014b).

No que se refere aos sorotipos circulantes, os dados atualizados mostram que no período de janeiro a maio de 2014 foram enviadas, para os laboratórios ligados ao Ministério da Saúde, 6.321 amostras para realização do isolamento viral, sendo que destas, 2.032 apresentaram-se positivas. O resultado dos isolamentos virais mostrou que o país possui os quatro sorotipos circulando concomitantemente, sendo identificado o DENV-1 com maior ocorrência

representando 80,1% dos casos positivos, seguido pelo DENV-4 com 17,7% dos isolados e os sorotipos DENV-2 e DENV-3 aparecem com 1,8% e 0,4% respectivamente (Ministério da Saúde 2014b). Vale ressaltar que no estado do Amazonas 100% dos isolados foram do sorotipo 4 do vírus que foi reportado em 2008 (Figueiredo *et al* 2008) e novamente isolado em 2011, juntamente com os sorotipos 1 e 2 (Ministério da Saúde 2011).

2.1.2 Agente Etiológico

Os vírus dengue (DENV) são classificados em quatro sorotipos antígenicamente distintos, DENV-1 a DENV-4 e taxonomicamente pertencem a família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, sendo portanto um vírus envelopado cujo genoma é composto por uma fita única de RNA polaridade positiva com aproximadamente 10.700 nucleotídeos.

O DENV sorotipo 4, que é objeto de estudo neste trabalho, possui quatro genótipos descritos. Genótipo I representado pelas cepas da Tailândia, Filipinas, Sri Lanka e Japão. Genótipo II, representado por cepas da Indonésia, Ilhas Caribenhas e Américas. Genótipo III, cepas originárias de linhagens tailandesas distintas de outros isolados tailandeses e o genótipo IV com cepas silváticas da Malásia (Klungthong *et al* 2004; Weaver e Vasilakis 2009).

Seu ciclo natural é composto por um ciclo silvático, onde o vírus é transmitido a primatas não humanos, e um ciclo urbano que causa preocupação à saúde pública, denominado endêmico/epidêmico no qual os vírus são transmitidos aos hospedeiros humanos através da picada das fêmeas infectadas dos mosquitos *Aedes aegypti* (principal vetor) e *Aedes albopictus* (Gubler 1998; Whitehead *et al* 2007).

A replicação do DENV (figura 2) tem início com a ligação do vírus à célula, seguida de endocitose mediada pelo receptor viral e internalização em endossomos. A acidificação dos endossomos leva a mudanças conformacionais na proteína E que inicia o processo de fusão

com a membrana endossomal e resultam na liberação do genoma viral no citoplasma (Modis *et al* 2004).

A tradução do RNA viral em uma poliproteína no retículo plasmático rugoso é seguida de seu processamento e clivagem por proteases celulares e virais. As proteínas NS coordenam a tradução de novas proteínas e a replicação do RNA viral, associando-o à proteína C e posteriormente ao envelope lipídico contendo as proteínas E e prM na passagem à luz do retículo endoplasmático rugoso (Heaton e Randall, 2010; Avirutnan *et al.* 2011; Kelley *et al.* 2011).

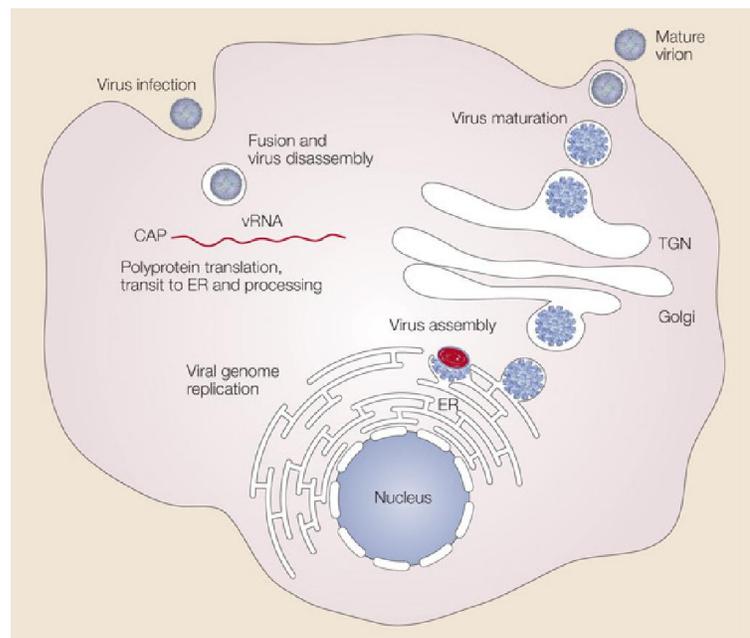


Figura 2: Etapas do Ciclo de replicação do DENV. O vírus se liga a célula hospedeira sendo internalizado por endocitose. Mudanças conformacionais induzidas por alteração de pH promovem a liberação do RNA viral. Ocorre, então a tradução e processamento da poliproteína. Posteriormente acontece a replicação do genoma viral, montagem dos vírions, transporte ao complexo de Golgi e maturação seguida de fusão à membrana plasmática e liberação dos vírions.

As partículas virais imaturas são conduzidas à via de secreção, sendo reprocessadas no complexo trans-Golgi, para clivagem da porção pré da proteína M e, posterior, secreção das

partículas virais maduras (Modis *et al.* 2004; Fernandez-Garcia *et al.* 2009; Fischl e Bartenschlager 2011).

Quando ocorre a clivagem da porção pré da proteína M de forma ineficiente há uma alta proporção de partículas imaturas, as quais têm sido associadas a estratégias virais de evasão imune e intensificação da infecção dependente de anticorpos (Rodenhuis-Zybert *et al.* 2010).

2.1.3 Organização Genômica

O genoma do DENV, por possuir polaridade positiva, funciona como RNA mensageiro para a produção das proteínas virais que são codificadas por uma única fase de leitura aberta (ORF), flanqueadas por regiões terminais não traduzidas (UTR) 5' e 3' que embora não sejam codificadoras, apresentam papel importante na replicação e tradução do genoma viral (Chambers *et al.* 1990).

A região 5' UTR desempenha função na tradução do genoma, além de atuar na complementariedade da cadeia negativa que serve de sítio de iniciação durante o processo de replicação (Lindenbach e Rice 2003), já a região 3' UTR atua durante o processo de replicação (Markoff, 2003). Alguns estudos indicam que esta região tenha interação com as proteínas não estruturais NS3 e NS5 (Chen *et al.* 1997; Cui *et al.* 1998).

A codificação do genoma viral gera uma única poliproteína precursora que após processo de clivagem origina dez proteínas virais, sendo três proteínas estruturais: C, prM e E, e sete proteínas não-estruturais: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (Guzmán *et al.* 2010). As proteínas não estruturais possuem caráter regulatório e são ativadas durante o processo de replicação viral (Chambers *et al.* 1990).

A clivagem da poliproteína acontece por meio de peptidases derivadas dos hospedeiros e proteases codificadas pelo vírus. Nas junções das proteínas C/prM; prM/E; E/NS1 e carboxi terminal da NS4A uma peptidase sinal derivada do hospedeiro é responsável pelas clivagens.

Enquanto nas junções das proteínas NS2A/NS2B; NS2B/NS3; NS3/NS4A; NS4A/NS4B e NS4B/NS5 uma serina protease codificada pelo vírus é responsável pelo processo de clivagem (figura 3) (Chambers *et al* 1990; Limdenbach e Rice 2003).

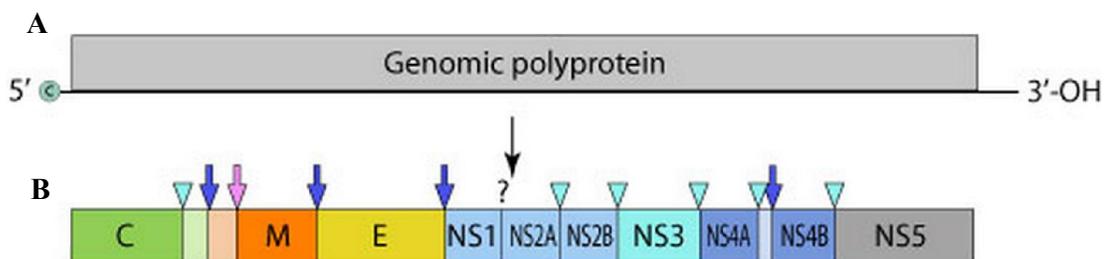


Figura 3: Organização genômica dos flavivírus. A) representação esquemática da poliproteína precursora. B) representação das dez proteínas virais e enzimas que atuam durante o processo de clivagem. Setas em azul escuro representam os sítios de clivagem da peptidase sinal. Triângulos em azul claro representam os sítios de clivagem da protease viral. Seta rosa indica o sítio de ação da golgi protease. A interrogação mostra que a enzima responsável pela clivagem da proteína NS1/NS2A ainda é desconhecida.

Fonte: <http://viralzone.expasy.org/>.

Entre as proteínas virais, a proteína E, principal componente proteico do envelope viral, tem sido alvo de muitos estudos por desempenhar papel importante na montagem do vírus, conter receptores de ligação; participar do processo de fusão da membrana e ser o principal alvo para a ação de anticorpos neutralizantes (Chambers *et al* 1990).

Mutações nesta proteína viral tem sido detectadas (Gonçalves *et al.* 2002; Rico- Hesse 2003; Carneiro *et al* 2012) o que indica algumas regiões como de importância para a ocorrência e fixação de mutações, bem como tem sido relacionadas com o aumento da virulência das cepas virais.

A obtenção da estrutura cristalizada desta proteína por Rey *et al* (1995) permitiu observar que é uma estrutura rica em folhas β , que após glicosilada forma homodímeros, sendo cada monômero composto por três domínios (figura 4). Domínio I (DI), constitui a região central N terminal que contém predominantemente tipos específicos de epítomos não neutralizantes, que pela ação de pH baixo desencadeia uma mudança conformacional. O

Domínio II (DII) representa uma interface entre os outros domínios e compreende uma região de dimerização. O DII consiste em uma estrutura alongada composta por duas alças descontínuas estendidas do domínio I. Esta região está envolvida na fusão da membrana através de uma região altamente conservada entre os *flavivírus* que funciona como um peptídeo de fusão localizado entre os resíduos de aminoácidos 98-112. Além disso o DII contém muitos epítomos de reação cruzada que geram ou não a neutralização viral por anticorpos monoclonais (mAbs) (Rey *et al* 1995; Modis *et al* 2004)



Figura 4: Estrutura esquemática da proteína E do vírus dengue. Estrutura primária com seus respectivos domínios. Em vermelho domínio I, em amarelo domínio II e em azul domínio III. FONTE: Rocha et al 2014.

O domínio III (DIII) forma a maioria dos *loops* da superfície viral e contém vários tipos e subtipos específicos de epítomos que geram a neutralização viral por mAbs. Devido a estes fatores, é relacionado como domínio de reconhecimento e ligação do vírus à membrana celular (Rey *et al* 1995; Modis *et al* 2004).

2.2 Processo Evolutivo em Arbovírus

Os vírus RNA exibem um alto nível de variação em suas sequências, não só quando analisadas amostras de diferentes indivíduos, mas também dentro de um mesmo hospedeiro (Martell *et al.* 1992; Wang *et al.* 2002).

A heterogeneidade nas sequências dos vírus RNA é determinada em parte pela falta de atividade de correção da RNA polimerase, estima-se que a taxa de erro durante o ciclo de replicação seja de 10^{-3} a 10^{-5} erros/nucleotídeo (Domingo e Holland 1994; Drake 1999) mas também pela alta taxa de replicação viral (Seligman 2008), Deste modo os agentes virais podem acumular mutações por um determinado período de tempo e com isso ocorrer uma mudança em seu caráter biológico, sendo selecionada a variante que possuir vantagem nos diferentes hospedeiros (Ishak *et al.* 2001).

Apesar do grande potencial de alterações genéticas comuns aos vírus RNA, no caso dos arbovírus observa-se que estes apresentam sequencias mais conservadas em condições naturais (Weaver *et al* 1992; Jenkins *et al* 2002; Holmes e Twiddy 2003), fato este geralmente atribuído à fortes pressões seletivas resultantes da alternância entre hospedeiros vertebrados e invertebrados (Scot *et al.* 1994; Woolhouse *et al.* 2001).

A característica de replicação dos vírus de genoma RNA faz com que estes existam como uma população de sequências correlatas denominadas *quasispecies* (Martell *et al.* 1992; Wang *et al.* 2002). De acordo com o conceito de *quasispecies*, um vírus não é propagado como um único genoma, mas sim como uma mistura de genomas. Isto resulta no fato de não haver então uma única sequência selvagem para um determinado vírus (Seligman 2008). Quando a sequência genômica de um vírus RNA é determinada, na verdade está sendo descrita a sequência majoritária naquela amostra.

Entre os arbovírus, o vírus que exerce maior impacto sobre a saúde pública é o DENV. Este fato faz com que o vírus seja alvo de estudos com a finalidade de melhor compreender o processo evolutivo do mesmo. Um estudo realizado por Leitmeyer *et al.* (1999) no qual foi realizada análise do genoma completo de 11 amostras de dois genótipos de DENV-2, previamente associadas a quadros de DF ou DHF, relatou diferenças nas sequências de

nucleotídeos das regiões codificantes para as proteínas prM, E, NS4b e NS5, além de diferenças nas sequências não traduzidas (UTR) nas extremidades 5' e 3'.

2.3 Competência Viral (*Fitness Viral*)

O conceito de *Fitness* é complexo na base de toda a ecologia e evolução. No caso de vírus este conceito foi originalmente definido como a capacidade de um vírus infeccioso para produzir progênie em um determinado hospedeiro (Domingo e Holland 1997) Esta definição ainda hoje é amplamente utilizada referindo-se mais especificamente a capacidade replicativa do vírus (Domingo 2010), entretanto esta definição atualmente tem sido ampliada e os pesquisadores tentam entender as implicações deste *fitness* em infecções naturais e sua relação com a gravidade das doenças (Wargo e Kurath 2012).

Vários estudos, como os realizados por Bray *et al.* (1998), Leitmeyer *et al.* (1999), Pandey *et al.* (2000), Pandey e Igarashi (2000), Guirakhoo *et al.* (2004), Blaney *et al.* (2004) apontaram determinantes moleculares da virulência ou atenuação em amostras do vírus dengue.

As substituições de aminoácidos nas sequências de DENV-2 observadas por Leitmeyer *et al.* (1999) por exemplo, estavam relacionadas apenas a carga dos aminoácidos. Entretanto as alterações encontradas nas regiões 5' e 3'UTR predizem alterações na estrutura secundária do RNA viral, embora não traduzidas, desempenham papel regulatório durante a replicação viral (Clyde *et al.* 2006; Clyde e Harris 2006).

Algumas mutações, mesmo únicas, na proteína E dos flavivírus tem sido relacionadas ao aumento da virulência da cepa viral (Rey *et al.* 1995; Thant *et al.* 1995; Sittisomut 1997). Essas alterações na proteína E melhorariam a capacidade de ligação viral à superfície celular ou dificultariam a ação de anticorpos neutralizantes (Chen *et al.* 1996). Assim, em uma epidemia, devem circular muitas e diferentes variantes virais, estando entre elas os vírus

mutantes que tiveram mais sucesso para replicarem nos hospedeiros e serem transmitidos (Rico-Hesse *et al* 1998).

Dados em relação à presença de mutações, inserções ou deleções associadas à virulência ou atenuação dos vírus dengue em amostras brasileiras são escassos. Um trabalho com amostras brasileiras e venezuelanas do vírus da Febre Amarela, um outro membro do gênero *Flavivirus*, mostrou que uma deleção na região 3'UTR estaria associada à diferenças na propagação viral *in vitro* e com características neuroinvasivas em modelo de infecção experimental murino (Bryant *et al.* 2005).

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a microevolução *in vitro* do vírus dengue, sorotipo-4, analisando a existência de variações genéticas associadas ao aumento da competência viral (*viral fitness*).

Objetivo Específico

- a) Descrever as mudanças na sequência majoritária do genoma completo de uma amostra do vírus dengue, sorotipo 4, durante o processo de adaptação (seleção) em culturas de células de invertebrado;
- b) Obter modelo *in silico* para as principais proteínas com substituição de aminoácidos observadas durante o processo de evolução viral.
- c) Descrever a frequência de mutações encontradas em subpopulações de cada passagem analisada.
- d) Analisar o impacto das mutações observadas sobre a competência viral.

METODOLOGIA

4.1 Amostra utilizada no estudo

A amostra viral de dengue sorotipo 4, genótipo 2 utilizada no desenvolvimento deste trabalho denominada BrAM005/11, foi originalmente isolada no ano de 2011 e teve confirmação do sorotipo 4 após resultado de RT-PCR conforme descrito por Lanciotti (1992). O genótipo foi caracterizado por sequenciamento nucleotídico da região C e prM, com posterior análise por inferência filogenética utilizando o método de máxima verossimilhança com o auxílio do programa PhyML e um conjunto de sequências de referência para cada genótipo, que agrupou esta amostra (BrAM005/11) com outras de dengue 4 genótipo 2 detectadas na Venezuela e Colômbia.

4.2 Manutenção de culturas celulares

Células de *Aedes albopictus* clone C6/36 foram mantidas em laboratório a 28°C em garrafas de cultivo celular descartáveis de 25 cm² (TPP, Suíça) contendo 5 mL de meio de cultura Leibovitz L-15 (Gibco, cat.: 41300-039). Esse meio era suplementado com 10% (meio de crescimento) ou 2% (meio de manutenção) de soro fetal bovino (Gibco, cat.: 12657029), 100 U/mL de penicilina (Gibco, cat.: 1540122), 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, cat.: 1540163) e 0,25 µg/ml de anfotericina B (Gibco, cat.: 15290-018).

A troca do meio de cultura ou repique das células dava-se a cada três dias consistindo na retirada do meio de cultura antigo, seguida de lavagem da monocamada com solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X) por duas vezes e então era colocado o meio novo. Caso fosse necessário realizar o repique das células utilizava-se o espalhador de células *cell scraper* (TPP; cat.: 99002) para soltar a monocamada e depois acrescentava-se o meio novo preparado conforme citado anteriormente.

4.3 Passagens em série do vírus em cultura de células

As passagens seriadas do vírus em cultura de células C6/36 (figura 5) iniciaram-se a partir do plasma BrAM005/11 que foi utilizado na diluição 1/10 (30 µL de plasma e 270 µL de meio de cultura). A partir da segunda passagem (P2) até a passagem 25 (P25) foi utilizado o sobrenadante da passagem anterior seguindo a mesma diluição da P1 para todas as passagens.



Figura 5: Esquema das passagens em série do vírus em cultura de células C6/36

As passagens foram realizadas em garrafas de cultivo celular descartáveis de 25 cm² (TPP, cat. 90025). Cada garrafa foi preparada 36 h antes da infecção (repique na proporção 1/2), após esse período as células apresentavam-se com uma monocamada de aproximadamente 80% - 90% de confluência e então era realizado o inóculo. Após o período de 1h para adsorção viral, com agitação a cada 15 minutos, a monocamada era lavada com PBS, para remoção das partículas virais não adsorvidas e em seguida adicionava-se 5 mL do meio de cultura a 2% de SFB acrescido de antibióticos e antifúngico conforme descrito anteriormente.

As culturas infectadas eram mantidas por um período de 72 horas e então as garrafas eram levadas ao freezer - 80°C onde permaneciam por 15 minutos, sendo posteriormente colocadas a 37°C com o objetivo de promover o rompimento das células e assim liberar uma maior quantidade de partículas virais no sobrenadante. Este sobrenadante era então retirado e utilizado para a infecção subsequente que era realizada no mesmo dia da retirada do inóculo anterior seguindo o mesmo protocolo de inoculação até a P25. O restante do sobrenadante viral

era armazenado em freezer -80° C (adicionado de 10% de glicerol estéril) até utilização nos demais experimentos.

4.4 Extração de Ácido Ribonucleico (RNA viral)

A extração do RNA foi realizada após cada passagem do vírus em cultura de células utilizando o *QIAamp Viral RNA mini kit* (Qiagen. cat.: 52906) segundo as orientações do fabricante. Em síntese, 140µL da amostra, sobrenadante da cultura de células, foram adicionados a 560 µL de tampão AVL contendo RNA carreador, essa mistura permaneceu em incubação a temperatura ambiente por um período de 10 minutos e então adicionou-se 560 µL de etanol 96-100%. Posteriormente essa solução foi passada em coluna de sílica com centrifugação a 6.000g por 1 minuto e em seguida realizou-se dois ciclos de lavagens com os tampões AW1 e AW2, seguido de etapas de centrifugação de 6.000g por 1 minuto e 16.000g por 3 minutos respectivamente. O RNA foi então eluído em 60 µL de tampão AVE e armazenado a -80°C até a utilização.

4.5 Produção de Ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA)

A produção de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA total, deu-se com a utilização da enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen, cat.: 18080-044) com volume para uma reação de 20µL, sendo adicionados 4µL da solução tampão 5X (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1µL de DTT [0,1M], 1µL de inibidor de RNase *SUPERase_InTM* [20U/µL] (Ambion cat.: AM2694), 5µL de água ultra-pura, 1µL da enzima SSIII (200U/µL) e 1µL de dNTPs [10µM].

As reações de transcrição reversa foram realizadas com iniciador específico para DENV-4 denominado D4AS1 (AGAACCTGTTGGATCAACAAC) que se liga aos primeiros 21 nucleotídeos da região 3' não traduzida. Inicialmente 2µl do iniciador [10 µM] e 7µl do RNA eram colocados em um microtubo de 0,2mL no termociclador (Proflex PCR Systems,

Applied Biosystems) a 65°C por 5 minutos, para desenovelar o RNA e assim permitir a hibridização dos iniciadores. Passados os cinco minutos o microtubo era colocado no gelo por dois minutos e em seguida acrescentava-se o mix contendo a enzima e então incubava-se a 50°C / 30 min; 55°C / 30 min e 70°C / 15 minutos.

4.6 Padronização da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para amplificação do genoma completo

Com a finalidade de obter a amplificação completa do genoma do DENV-4 presente na amostra BrAM005/11, tomamos como base os iniciadores utilizados por Naveca *et al* (2012).

Dezesseis pares de iniciadores (tabela 1) foram utilizados para a padronização das reações, e quatro temperaturas de hibridização dos mesmos foram testadas, sendo elas 50, 55, 58 e 62°C. Além disso, foram testadas também concentrações de Mg²⁺ variando de 1,5 mM a 2,5 mM.

Par de Iniciadores	Tamanho do alvo	Posição
D4S1 + D4 AS 21	1889 pb	1 - 1889
D4S1 + D4 AS 23	1048 pb	1 - 1048
D4S3 + D4 AS 16	3038 pb	982 - 4019
PTNES + PTNEAS	1877 pb	730 - 2606
D4S7 + D4 AS14	1704 pb	3040 - 4743
D4S6 + D4 AS15	1838 pb	2491 - 4328
D4S10 + D4 AS11	1784 pb	4374 - 6157
D4S9 + D4 AS11	2262 pb	3896 - 6157
D4S12 + D4 AS7	2758 pb	5295 - 8052
D4S12 + D4 AS8	2300 pb	5295 - 7594
D4S16 + D4 AS6	1585 pb	6908 - 8492
D4S14 + D4 AS7	1909 pb	6144 - 8052
D4S18 + D4 AS3	1834 pb	7928 - 9761
D4S17 + D4 AS4	2050 pb	7397 - 9446
D4S22 + D4 AS1	1117 pb	9472 - 10649
D4S21 + D4 AS 1	1476 pb	9174 - 10649

Tabela 1: Iniciadores utilizados na padronização das reações de PCR. A tabela apresenta todos os iniciadores utilizados nas reações de padronização, a posição do genoma amplificada por cada par de iniciadores e o tamanho do fragmento gerado após amplificação.

A amostra utilizada nas reações de otimização foi o cDNA da amostra BrAM005/11 passada duas vezes em cultura de células C6/36 onde permaneceu por dez dias e apresentou positividade pelo protocolo de Lanciotti (1992).

Todas as reações foram otimizadas para um volume final de 50 µl contendo 1µl de cDNA produzido com SSIII conforme já descrito (item 4.5) 0,2mM de dNTPs, 0,3 µM de iniciadores e 1 U de *Platinum Taq DNA polimerase* utilizando o termociclador Proflex PCR Systems configurado para simular o GeneAmp 9600 seguindo o programa 92°C / 2'; 40 X [92°C / 30'' — zonas de temperaturas 55, 55, 58 e 62°C / 30'' — 72°C/ 2' ou 3' dependendo do *Amplicon*] 72°C / 7' — 4°C ∞. Terminada a PCR, 5µl do produto de reação eram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com GelRed (Biotium. cat.41002) a 80V por uma hora, sendo em seguida observado em transiluminador UV (Loccus).

4.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os cDNAs do plasma BrAM005/11 e de todas as passagens selecionadas do vírus em cultura de células C6/36 (P1, P5, P10, P15, P20 e P25), foram submetidos a reações de PCR para amplificação do genoma completo do DENV-4 (figura 5), conforme apresentado na tabela 2.

<i>Amplicon</i>	Iniciadores	Tamanho	Temperatura	Extensão
<i>Amplicon 1</i>	D4S1 + D4 AS 21	1889 pb	62° C	2'
<i>Amplicon 2</i>	D4S3 + D4 AS 16	2294 pb	62° C	3'
<i>Amplicon 3</i>	D4S7 + D4 AS14	1704 pb	62° C	2'
<i>Amplicon 4</i>	D4S10 + D4 AS11	1784 pb	50° C	2'
<i>Amplicon 5</i>	D4S12 +D4 AS7	2758 pb	62° C	3'
<i>Amplicon 6</i>	D4S16 + D4 AS6	1585 pb	62° C	2'
<i>Amplicon 7</i>	D4S18 + D4 AS3	1834 pb	55° C	2'
<i>Amplicon 8</i>	D4S22 +D4 AS1	1117 pb	58° C	2'

Tabela 2: Pares de iniciadores utilizados nas reações de PCR para amplificação do genoma completo do DENV-4. A tabela apresenta os oito pares de iniciadores utilizados nas reações, o tamanho do fragmento gerado por cada combinação de iniciador, a temperatura de hibridização de cada par e o tempo de extensão utilizado.

O Mix de reação foi preparado para um volume final de 50 μ l contendo 0,2mM de dNTPs, 0,3 μ M de iniciadores, 1X de tampão RXN, 1 U de Platinum *Taq* DNA polimerase e H₂O livre de nucleases para completar o volume. O volume de 1 μ l de cDNA foi acrescentado a esse mix que foi levado ao termociclador utilizando as condições descritas na tabela 2.

Após a PCR, 5 μ l do produto de reação eram submetidos à eletroforeses em gel de agarose a 2% corado com GelRed, por 1 hora de corrida a 80V para confirmar amplificação do produto no tamanho esperado, para isso foi utilizado o padrão de peso molecular *Fast Ruller Midle Ranger* (Thermo scientific. cat.#SM13).

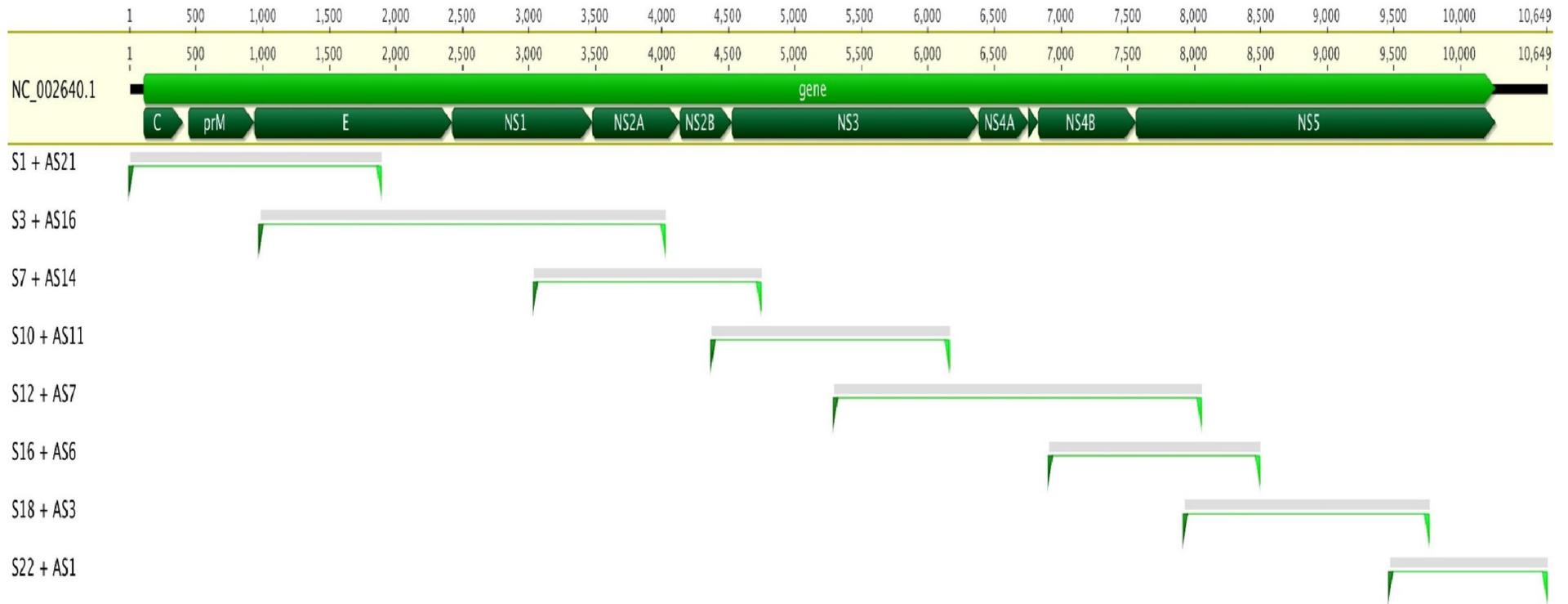


Figura 6: Esquema das reações de PCR para amplificação do genoma completo do DENV-4.

A figura mostra os pares de iniciadores utilizados e a região genômica amplificada por cada par tendo como base a sequência de referência para DENV 4 (NC_00240.1) depositada no GenBank. Figura produzida com auxílio do software Geneious v 7.1.7.

4.8 Purificação do produto da PCR por Polietilenoglicol (PEG)

Para a remoção de nucleotídeos e iniciadores não incorporados na PCR e que poderiam interferir na reação de sequenciamento, realizamos a purificação dos produtos de PCR utilizando o protocolo de precipitação por PEG (Humphreys et al., 1975 adaptado).

O produto de PCR a ser purificado era transferido para um microtubo de 1,5mL ao qual era acrescentado uma solução 20% de Polietilenoglicol 8.000 (PEG - Promega, Madison, WI, USA, Cat. V3011) na proporção 1/1, sendo que essa mistura permanecia em incubação a 37°C por 15 minutos. Após esta etapa era realizada centrifugação a 13.000g por 15 minutos e em seguida o sobrenadante era descartado sendo então adicionados 125µL de etanol 80% ao microtubo que era mais uma vez colocado para centrifugar, desta vez a 12.000g por 2 minutos e logo depois o sobrenadante era novamente descartado. No intuito de remover todo o etanol residual, o microtubo era colocado para secar a 37° por 15 minutos no concentrador de DNA a vácuo Mivac (Genevc SP Scientific) e em seguida o DNA era ressuspensionado em 35 µL de água livre de nucleases.

Após a purificação, o produto de PCR era quantificado em espectrofotômetro de microvolume (Biodrop Duo - Biochrom) para determinar o volume necessário de amostra a ser utilizado na reação de sequenciamento.

4.9 Sequenciamento do genoma viral por eletroforese capilar

Para as reações de sequenciamento utilizamos os *amplicons* previamente purificados do plasma BrAM005/11 e das passagens 1, 5, 10, 15, 20 e 25 do vírus em cultura de células.

Com a finalidade de obter a sequência do genoma completo, foram utilizados 49 iniciadores (Naveca *et al.* 2012) sendo 25 no sentido senso e 24 no sentido anti-senso (Tabela

3), alguns iniciadores se repetiam em dois *amplicons* e assim foram realizadas 65 reações de sequenciamento para cada passagem.

As reações foram realizadas com o Kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, cat.: 4336917) para um volume final de 10 µl utilizando 0,3 µL de BigDye (0,075 X final); 0,32 µM de cada primer; 1 X do tampão 5X, além do produto da PCR de acordo com a concentração ideal para o tamanho de cada fragmento (aproximadamente 20ng) e H₂O livre de nucleases para completar o volume. Preparado o mix, a placa era levada ao termociclador VERITI (Applied Biosystems), onde foi seguido o programa 96°C/ 1' — 20X [96°C/10'' — 55°C/15'' — 60°C/2'] 10X [96°C/2' — 55°C/15'' — 60°C/3'] 4°C/∞.

Ao final das reações os produtos eram purificados por precipitação com EtOH/EDTA/Acetado de Sódio, pelo seguinte protocolo: inicialmente era preparada uma mistura V/V de EDTA 125nM e acetato de sódio 3M, e em seguida 2µl dessa mistura e 25 µl de etanol (EtOH) 100% eram acrescentados em cada poço da placa de reação que permanecia em incubação por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Seguiam-se então duas etapas de centrifugação, uma a 2.000g por 45 minutos a 4°C, e outra a 180g por 1 minuto, com descarte do sobrenadante após cada etapa. Em seguida 35 µl de etanol 70% eram adicionados a placa que seguia para nova centrifugação a 1.650g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante era descartado, sendo então a placa levada ao termociclador por 5 minutos a 65°C. Para finalizar, acrescentava-se 10µl de formamida HI-DI em cada poço, a placa era aquecida a 95°C por 1 minuto e levada ao sequenciador automático ABI 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems), instalado na plataforma de genômica do Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazonas.

Os arquivos gerados pelo sequenciador foram analisados utilizando o software Geneious (v 7.1.7) para montagem dos *contigs* de cada amostra e identificação de variantes genéticas. O *contig* do plasma foi montado tomando como base a sequência de referência para DENV-4 depositada no GenBank sob o número de acesso NC_002640.1, e para as passagens de P1, P5,

P10, P15, P20 e P25 a sequência do plasma foi tomada como base para a montagem dos *contigs*.

O alinhamento foi realizado com a utilização do algoritmo MAFFT versão 7 (Katoh 2013).

Nome	Sentido	Sequência 5' – 3'	Posição
D4S1	S	AGTTGTTAGTCTGTGTGGACC	1-21
D4S2	S	GCTTGATTCCYACYGTAATGG	418-438
D4 PTNES	S	CACATTCAGGAATGGGATTGG	730-750
D4S3	S	TCTCAGGTGGAGCATGGGTCG	982-1002
D4S4	S	GACTTYAATGAGATGATTCTG	1512-1532
D4AS21	AS	ATGCTGTGTTTCTGCCATCTC	1869-1889
D4AS22	AS	TGRTTGGATGTGTCATTTCTCTAC	1389-1411
D4AS23	AS	CCCTGGGCCATGGTTGTGAC	1029-1048
D4AS24	AS	ATCAATGTCTTCRGGTTCGGT	615-635
D4AS25	AS	TCTYTTCAGAATCCCTGCTGT	282-302
D4S5	S	AGYGCATTAACACTCCATTGG	2091-2111
D4S6	S	ACAACGTGCACACTTGGACAG	2491-2511
D4S7	S	AAAACCAGACCTGGCAGATAG	3040-3060
D4AS18	AS	TGTTGTTCCGGGGCATTCTCC	3255-3275
D4AS19	AS	TCTTCGTTTCATTGGGGCATT	2848-2867
D4AS20	AS	TGATTCCTCCAACAGCTATGC	2374-2394
D4S8	S	AAGAGAACATGGTCAAATCAC	3448-3468
D4S9	S	TGACAACACYCAAGTGGGAAC	3896-3916
D4S10	S	GATGGCTCTTCTCCATACGG	4374-4394
D4AS14	AS	TCCTGACGTCAGCCCAAGATG	4723-4743
D4AS15	AS	TGCCATTYCATCCCCTGAC	4308-4328
D4AS16	AS	GCACAAAGGAATGAGTGTGACC	3998-4019
D4S11	S	GACCTAAGTGGAGAAATTGG	4874-4894
D4S12	S	GACCTCATGTGTCATGCAACC	5295-5315
D4S13	S	ATATCTGAAATGGGGGCCAATT	5751-5772
D4AS11	AS	CACACCGGAAGGTCTCCTCTC	6137-6157
D4AS12	AS	CCCCATTTCAGATATGTCTGT	5745-5766
D4AS13	AS	GTCTACAATCTCTCTTCTGTGTG	5274-5297
D4S14	S	GACCTTCCGGTGTGGCTGAGC	6144-6164
D4S15	S	GGAAACACTCATGCTTGTAGC	6533-6553
D4S16	S	GGAYTTGAGACCAGCYTCAGC	6908-6928
D4AS9	AS	GAGCGCCATCCTTTTCCAAG	7050-7070
D4AS10	AS	AAAGCTACAAGCATGAGTGTTC	6534-6556
D4S17	S	CTTGACTTTGGCCACAGGACC	7397-7417
D4S18	S	TTTGGTCAAATCCATTCAGG	7928-7948
D4AS6	AS	TTCATAGCTTCCATGATACGCC	8471-8492
D4AS7	AS	CTCTAATGTTCTTCTCCTCTAT	8028-8052
D4AS8	AS	TCTCCAGTGTCTCTCCTGTG	7574-7594
D4S19	S	GTATCATGGAAGCTATGAAGC	8474-8494
D4S20	S	ATGGACATCAGCCAGTGAAGC	8816-8836
D4S21	S	TGGGACACAAGAATCACTGA	9174-9193
D4AS3	AS	ATCCTGGTTTCTACATGGAAC	9741-9761
D4AS4	AS	GACTCCTTCAGCTTCCATTTG	9426-9446
D4AS5	AS	CCCTTCCACTCCACTCCATG	9070-9089
D4S22	S	CAAAAGGGTTGAAAGAAAGAG	9472-9492
D4S23	S	ATGGTTTCCAACAAGCAGAAC	9923-9943
D4S24	S	AACCGTGCTGCCTGTAGCTCC	10341-10361
D4AS1	AS	AGAACCTGTTGGATCAACAAC	10629-10649
D4AS2	AS	GTTCTGACCTGGGTTATGGC	10161-10181

Tabela 3: Iniciadores utilizados na reação de sequenciamento capilar. A tabela mostra todos os iniciadores utilizados para sequenciamento do genoma completo do DENV-4. Apresenta ainda a sequência de cada iniciador e a região do genoma reconhecida por cada um dos iniciadores. S=sentido senso. AS= sentido anti-senso.

4.10 Sequenciamento de Nova Geração (NGS) – *Ion Torrent*

As reações de NGS foram realizadas utilizando os 8 *amplicons* previamente purificados, que cobriam o genoma completo do plasma (BrAM005/11) e das passagens 1, 5, 10, 15, 20 e 25.

Antes do preparo das bibliotecas os 8 *amplicons* da cada passagem precisaram ser misturados em quantidades equimolares. Para isso realizamos a quantificação dos mesmos por fluorimetria no equipamento Qubit 2.0. Após a quantificação, preparamos uma solução para cada passagem contendo 25nM de cada um dos oitos *amplicons*. Deste *pool* de *amplicons* utilizamos 100ng completando com H₂O para um volume final de 35µl (recomendações do fabricante) para a etapa de fragmentação do DNA.

O sequenciamento NGS com a tecnologia *Ion Torrent* necessita da fragmentação do DNA alvo, de acordo com o protocolo dos kits utilizados. Neste projeto a fragmentação do DNA foi realizada utilizando o kit *Ion Shear Plus reaction* (Cat. 4471248 – Life Technologies), produzindo fragmentos de aproximadamente 200pb. Foi inicialmente preparado o mix contendo 100ng do *pool* de *amplicons*; 5µl do tampão *Ion Shear™ Plus 10X* e água livre de nucleases para completar o volume de 35 µl. Posteriormente adicionou-se 10 µl da enzima *Ion Shear™ Plus Mix II* sendo essa mistura incubada a 37° C por 4,5 minutos. Após este período foram adicionados 5µl do tampão *Ion Shear™ Plus stop* para inativar a enzima e seguiu-se a etapa de purificação do DNA fragmentado por microesferas magnéticas utilizando o reagente *Agencourt® AMPure® XP* (Cat. A63881 – Beckman Colter) seguindo orientações do fabricante.

Após a fragmentação do DNA foi realizada a ligação dos adaptadores e *barcodes*, pois na reação de sequenciamento todas as passagens (BrAM005/11, P1, P5, P10, P15, P20 e P 25) seriam colocadas no mesmo chip, uma vez que os *barcodes* nos permitiriam separar todas as amostras ao final da reação. Preparamos 7 reações (uma para cada passagem) contendo

26pM do *pool* de *amplicons*, 10 μ L do Tampão 10X Ligase, 2 μ L Adaptador P1, 2 μ L do adaptador *Ion Xpress™ Barcode 1 – 16* (Cat. 4471250) (tabela 4), 2 μ L de dNTP Mix, 2 μ L de DNA Ligase, 8 μ L *Nick Repair Polymerase* e água livre de nucleases para um volume final de 100 μ L. Esse mix foi levado ao termociclador para incubação a 25°C / 15 min. — 72°C / 5 min. Ao término da reação foi realizada nova etapa de purificação utilizando o reagente *Agencourt® AMPure® XP* seguindo orientações do fabricante.

<i>Barcode</i>	<i>Amostra (biblioteca)</i>
1	BrAM005/11
2	P1
3	P5
4	P10
5	P15
6	P20
7	P25

Tabela 4: Identificação dos *barcodes* utilizados para cada biblioteca.

Posteriormente à ligação dos adaptadores, os fragmentos passaram a tamanhos de aproximadamente 330 pb. Para selecionar esses fragmentos realizamos a etapa de *Size-select* utilizando o sistema *E-Gel® SizeSelect™ 2% Agarose* (Cat. G6610-02 – Life Technologies) e um padrão de peso molecular de 50pb (Cat. 10416014 - Invitrogen™).

Selecionados os fragmentos, realizamos a amplificação da biblioteca, visando aumentar da quantidade do produto fragmentado. Para isto preparamos o mix contendo 100 μ L de Platinum® PCR SuperMix High Fidelity (Cat. 12532016 - Invitrogen™), 5 μ L de primer mix para amplificação da biblioteca e 25 μ L da biblioteca a ser amplificada. O mix foi levado ao termociclador seguindo o programa 95° C / 5 min. — 8 X [95° C / 15 seg. — 58°C / 5 seg.] — 4°C (máximo 1 hora). Em seguida a biblioteca foi purificada e quantificada por fluorimetria no equipamento Qubit 2.0.

Uma vez concluído o preparo da biblioteca foi realizada a etapa de PCR em emulsão (emPCR), com microesferas (*Ion Sphere Particles* - ISP) contendo sequências complementares ao adaptador P1, utilizando o kit *Ion PGM™ Template OT2 200* (Cat.4480974 – Life Technologies/ *Ion Torrent™*) no equipamento *Ion OneTouch™ System 2* (Life Technologies). Após a emPCR as ISPs foram enriquecidas e então colocadas em um chip 314, que foi levado ao sequenciador *Ion PGM™ System*, onde ocorreu o sequenciamento genômico.

Os dados gerados pelo PGM foram inicialmente analisados utilizando o software *Torrent* suíte 4.2 instalado no servidor do PGM e posteriormente as sequências obtidas foram exportadas no formato *FastQ* para o software *Geneious 7.1.7* visando a montagem dos *contigs*. As sequências de cada *barcode* (*reads*) foram alinhadas individualmente com a sequência finalizada do plasma obtido no sequenciamento de Sanger, utilizando a ferramenta *Map to reference*, no software *Geneious* (v 7.1.7) sobre condições *default* de análise, porém com até 10 interações. A análise de sítios variáveis foi realizada pelo *plugin variantCaller v3.4.2*, instalado no software *Torrent Browser* no servidor do PGM sob condições *default* de análise, considerando uma frequência mínima de 10x para cada variante.

4.11 Modelagem de Proteína por homologia

Com o intuito de identificar a posição e o contexto estrutural de mutações não-silenciosas em P25 foi utilizada a abordagem de modelagem estrutural por homologia. A sequência nucleotídica majoritária das passagens 1 e 25 (P1 e P25) foi deduzida para a sequência da poliproteína viral. A região correspondente a proteína de envelope (proteína E) com 495 aminoácidos foi submetida a modelagem tridimensional no servidor SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>). O SWISS-MODEL é um ferramenta web para anotação automática e modelagem das estruturas terciária e quaternária de sequências proteicas, a partir

de um modelo resolvido por métodos experimentais como a cristalografia de Raios-X e a ressonância magnética nuclear de prótons (NMR) (Schwed *et al.* 2003; Biasini *et al.* 2014).

Nesta dissertação foi utilizada a abordagem automática para seleção de modelos (*template*) em bases de dados de estrutura; alinhamento e construção do modelo a partir de cada sequência da proteína E, em formato fasta. Todos os modelos gerados foram inicialmente avaliados quanto a qualidade global e local pelos métodos de GMQE e QMEAN4 (Benkert *et al.* 2011). Após a construção do modelo, o arquivo foi salvo e manipulado para melhor visualização no software Geneious 7.1.7.

4.12 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo foi realizada com P1 e P25 tendo como finalidade obter a titulação do vírus nestas passagens e fazer o estudo do *fitness viral*. Placas de seis poços contendo 1×10^6 células/mL (Lambeth 2005) foram utilizadas para todos os experimentos.

Após o período estipulado para infecção em cada passagem, as células foram marcadas e fixadas seguindo um protocolo construído com base nos trabalhos Kao *et al* (2001); Lambeth (2005) e Medina *et al* (2012).

Em todos os experimentos, as células foram contadas utilizando o equipamento para contagem automática Moxi Z (ORFLO Technologies, Hailey, ID, USA) com cassetes tipo S. A leitura das células neste equipamento além de fornecer o cálculo do número de células fornece também o cálculo da viabilidade celular.

Inicialmente realizamos a leitura no citômetro de fluxo apenas das células não infectadas, antes e após a etapa de fixação, para obter o perfil de tamanho e complexidade da linhagem C6/36 utilizada neste trabalho. Posteriormente executamos testes de titulação dos anticorpos a fim de obter a melhor diluição para uso. Foram testadas as diluições do anticorpo primário (monoclonal anti-flavivirus 4G2 – Millipore. Cat. MAB10216) 1/100; 1/500 e 1/1000

e do anticorpo secundário 1/200 e 1/3200 (FITC Goat anti-mouse IgG clone poly4053. Biolegend. Cat. 405305).

Para realização dos ensaios, cada placa foi preparada 36h antes da infecção e o inóculo foi feito em uma diluição 1/10 para um volume de 500 µl permanecendo por cinco dias até a retirada do sobrenadante e das células infectadas para dar continuidade as etapas seguintes.

Passado este período de infecção, a monocamada era lavada duas vezes com PBS 1X e em seguida utilizava-se o *cell scraper* para soltar as células que logo depois eram colocadas em microtubos de 1,5 mL e lavadas três vezes com 200 µL de PBS 1X e centrifugadas a 10.000g por cinco minutos. Após esta etapa as células eram ressuspensas em 100 µL de Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences. cat. 554722) e agitadas em vórtex por 5 segundos sendo posteriormente colocadas para incubar por 20 minutos no gelo e ao abrigo da luz.

Terminado o período de incubação eram realizadas três etapas de lavagem com tampão *Perm/Wash* (BD Biosciences. cat. 51-2091KZ) gelado e seguiam-se mais três etapas de centrifugação a 750g, 4°C por cinco minutos com posterior descarte do sobrenadante. A partir deste momento as células já estavam fixadas e permeabilizadas e então adicionava-se 100 µL do anticorpo primário 4G2 na diluição 1/250 seguindo um período de incubação a 37° por 1h ao abrigo da luz, depois desta etapa as células eram lavadas com Perm/Wash colocadas para centrifugar a 750g, 4°C por 5 minutos e o sobrenadante descartado.

Após a ligação do anticorpo primário adicionava-se 100 µL do anticorpo secundário diluído 1/800 e seguia-se nova incubação a 37°C por uma hora ao abrigo da luz, passado esse período realizava-se mais duas etapas de lavagem com Perm/Wash e ao final as células eram ressuspensas em 200 uL de Perm/Wash e levadas para leitura no citômetro de Fluxo FACS Canto II (Becton–Dickinson Immunocytometry Systems, Palo Alto, Califórnia) utilizando o software *CellQuest* (v.3.1), sendo adquiridos 100.000 eventos. Os dados eram então analisados no software FlowJo versão 7.6.5 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

4.13 RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

O RNA do sobrenadante de culturas infectadas e das próprias células infectadas com as passagens P1, P25 e o MOCK serviram como amostra para as reações de RT-qPCR visando a determinação da quantidade relativa de RNA viral nessas passagens. Os iniciadores e a sonda utilizados foram os descritos por Gurukumar (2009), porém com degenerações, apresentados na tabela 5 que tem como alvo a região 3'UTR.

O sobrenadante foi retirado das culturas com os tempos de 72h P.I.; 96h P.I e 120h P.I. sendo realizada a extração do RNA viral. Já as células foram recolhidas nos tempos de 72h P.I. e 120h P.I; foram centrifugadas a 10.000g durante 5 minutos. Os sobrenadantes foram removidos e os *pellets* celulares foram ressuspensos em 1mL de PBS 1X, novamente centrifugados e o sobrenadante descartado. Foi realizada uma segunda etapa de lavagem nas mesmas condições da primeira. Ao final os *pellets* foram ressuspensos em 140µL de meio de cultura e armazenados a -80°C até utilização para extração de RNA tal como descrito anteriormente.

Todas as reações utilizando o RNA obtido do sobrenadante foram realizadas em quadruplicata técnica, enquanto que os experimentos com o RNA obtido das células infectadas foram realizados em duplicata técnica, com um controle branco e um volume final de 20 µL utilizando 5 µL do mix *TaqMan Fast Virus* (Life Technologies Cat. 4444432); iniciadores a uma concentração de 300nM; sonda a 100nM; 5 µL de RNA e H₂O livre de nucleases para completar o volume. Preparado o mix, a placa era levada ao termociclador StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os dados fornecidos após a reação foram analisados por meio do software SDS fornecido pela Applied Biosystems. Os gráficos relativos aos valores de Ct foram produzidos no programa GraphPad PRISM® 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego CA).

Óligos	Sequência
Primer F	GARAGACCAGAGATCCTGCTGTCT
Primer R	ACCATTCATTTTCTGGCGTT
FAM MGB-Probe	ARCATCAWTCCAGGCAC

Tabela 5: Iniciadores e sonda utilizados nas reações de RT-qPCR. Primer F (sentido senso); Primer R (sentido anti senso).

4.14 Análise estatística dos dados

Todos os dados foram tabulados e analisados posteriormente com estatística descritiva representando as variações encontradas no genoma viral ao longo do processo de adaptação (seleção) à cultura de células C6/36.

Os resultados dos ensaios quantitativos: número de cópias de RNA viral detectados em cada passagem analisada por RT-qPCR foram analisados por inferência estatística em relação aos resultados dos valores de Ct apresentarem uma distribuição normal (teste de D'Agostino & Pearson) e significância estatística das diferenças entre os valores pelo teste T de Student, com 95% de confiança (alfa <0,05) no programa GraphPad PRISM® 6.0. Os resultados dos testes de cinética viral foram comparados através do método de $\Delta\Delta C_t$ (Laviak e Schmittgens 2001).

5 RESULTADOS

5.1 Passagens em série

A cepa viral utilizada neste trabalho não apresentou efeito citopático (ECP) em nenhuma das 25 passagens do vírus em cultura de células C6/36, o que impossibilitou visualizar sinais da infecção na monocamada celular quando observadas em microscópio óptico.

Visando confirmar a infecção em cada passagem do vírus nas células, todos os cDNAs obtidos do RNA extraído de cada passagem, foram submetidos a reação de PCR convencional seguindo o protocolo de Lanciotti (1992).

Fragmentos de amplificação na altura de 511pb na primeira PCR e na altura de 392pb na reação de nested, tamanho do fragmento específico para DENV-4, foram visualizadas em todas as reações, permitindo assim confirmar que as infecções tinham sido bem sucedidas.

5.2 Padronização e reações de PCR

Após as reações de padronização da PCR, selecionamos oito pares de iniciadores (Tabela 6) que apresentaram resultados satisfatórios para a realização dos nossos experimentos, não apresentando amplificação inespecífica e com o fragmento no tamanho esperado para cada *amplicon* (Figura 7).

Uma vez estabelecido o protocolo para realização das reações de PCR, os cDNAs obtidos do plasma e das passagens (P0, P1, P5, P10, P15, P20 e P25), foram submetidos à reações de PCR para amplificação do genoma completo, totalizando 208 reações. Todos os *amplicons* adquiridos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose para confirmação da amplificação dos produtos com os tamanhos esperados, comparando ao padrão de peso molecular *fast ruler middle ranger*. Dessa forma foram visualizadas fragmentos de tamanho compatível, conforme apresentado na tabela 6, para os oito *amplicons*.

Região	Iniciadores	Sequência	Posição	Fragmento
<i>Amplicon 1</i>	D4S1	AGTTGTTAGTCTGTGTGGACC	1-21	1889pb
	D4AS21	ATGCTGTGTTTCTGCCATCTC	1869-1889	
<i>Amplicon 2</i>	D4S3	TCTCAGGTGGAGCATGGGTCG	982-1002	3038pb
	D4AS16	GCACAAAGGAATGAGTGTGACC	3998-4019	
<i>Amplicon 3</i>	D4S7	AAAACCAGACCTGGCAGATAG	3040-3060	1704pb
	D4AS14	TCCTGACGTCAGCCCAAGATG	4723-4743	
<i>Amplicon 4</i>	D4S10	GATGGCTCTTTCTCCATACGG	4374-4394	1784pb
	D4AS11	CACACCGGAAGGTCTCCTCTC	6137-6157	
<i>Amplicon 5</i>	D4S12	GACCTCATGTGTCATGCAACC	5295-5315	2785pb
	D4AS7	GAGCGGCCATCCTTTTCCAAG	8028-8052	
<i>Amplicon 6</i>	D4S16	GGAYTTGAGACCAGCYTCAGC	6908-6928	1585pb
	D4AS6	TTCATAGCTTCCATGATACGCC	8471-8492	
<i>Amplicon 7</i>	D4S18	TTTGGTCAAACCTCCATTCAGG	7928-7948	1834pb
	D4AS3	ATCCTGGTTTCTACATGGAAC	9741-9761	
<i>Amplicon 8</i>	D4S22	CAAAAGGGTTGAAAGAAAGAG	9472-9492	1178pb
	D4AS1	AGAACCTGTTGGATCAACAAC	10629-10649	

Tabela 6: Iniciadores utilizados nas reações de PCR. A tabela apresenta os dezesseis iniciadores que geram oito fragmentos parcialmente sobrepostos cobrindo todo o genoma viral. Exibe também a sequência de cada iniciador, a posição de hibridização dos mesmos em relação a sequência de referência NC_002640.1 e o tamanho do fragmento gerado por cada par.

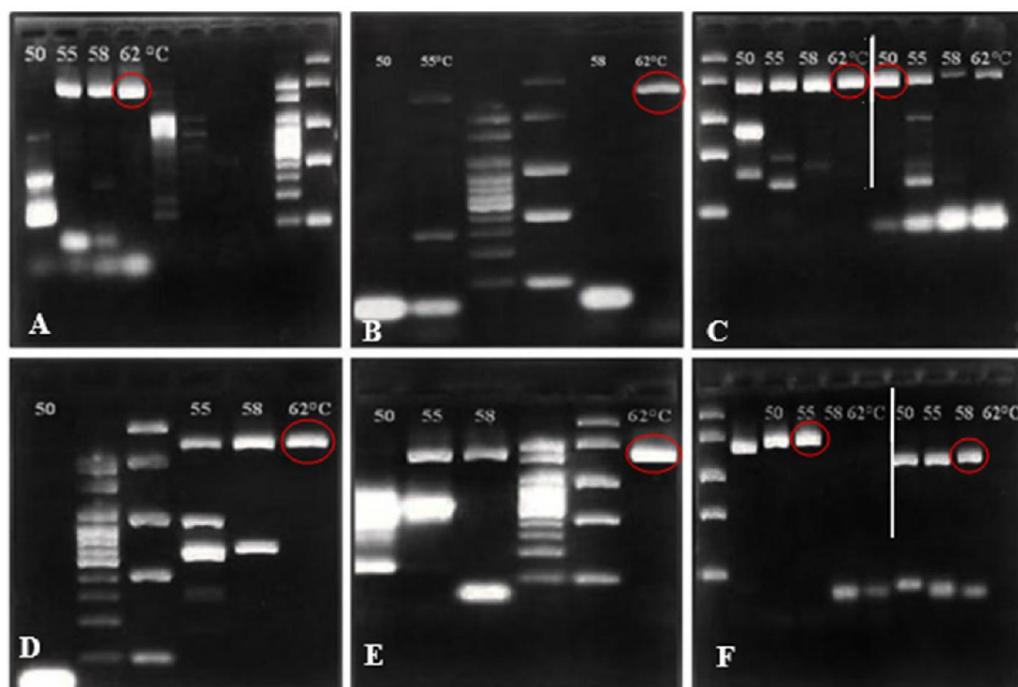


Figura 7: Eletroforese da padronização das reações de PCR. A figura mostra os fragmentos de amplificação obtidos após as reações de PCR. Os círculos em vermelho mostram a condição de temperatura selecionada para cada amplicon. A) *amplicon 1*; B) *amplicon 2*; C) *amplicon 3* a esquerda da linha branca e *amplicon 4* a direita; D) *amplicon 5*; E) *amplicon 6*; F) *amplicon 7* a esquerda e 8 a direita.

5.3 Reações de sequenciamento capilar

Após as reações de sequenciamento conseguimos obter o genoma completo da amostra BrAM005/11 (P0) e das passagens 10, 20 e 25. O sequenciamento das passagens 01, 05 e 15 apresentou baixa qualidade e assim não conseguimos completar o sequenciamento do genoma destas passagens tendo apenas parte do genoma.

Os eletroferogramas adquiridos de todas as reações foram devidamente analisados de forma visual e depois utilizados para alinhamento e obtenção de *contigs* utilizando o software Geneious (v 7.1.7). A sequência nucleotídica da amostra BrAM005/11 foi inicialmente alinhada com a sequência de referência NC_002640.1 para a obtenção de anotações. Esse alinhamento mostrou 272 diferenças de nucleotídeos e 29 de aminoácidos.

Uma vez obtido o *contig* da amostra BrAM005/11 e a sua sequência finalizada, este foi utilizado como referência para o alinhamento frente a P01, P05 e P15 (parciais) e P10, P20 e P25. O resultado desse alinhamento mostrou 2 diferenças observadas na P25 em relação as demais passagens (Figura 8).

As mutações ocorridas foram observadas no nucleotídeo 1602 correspondente a primeira posição do códon e no nucleotídeo 3365 na segunda posição, respectivamente nas regiões codificantes para a proteína do envelope viral e para NS1.

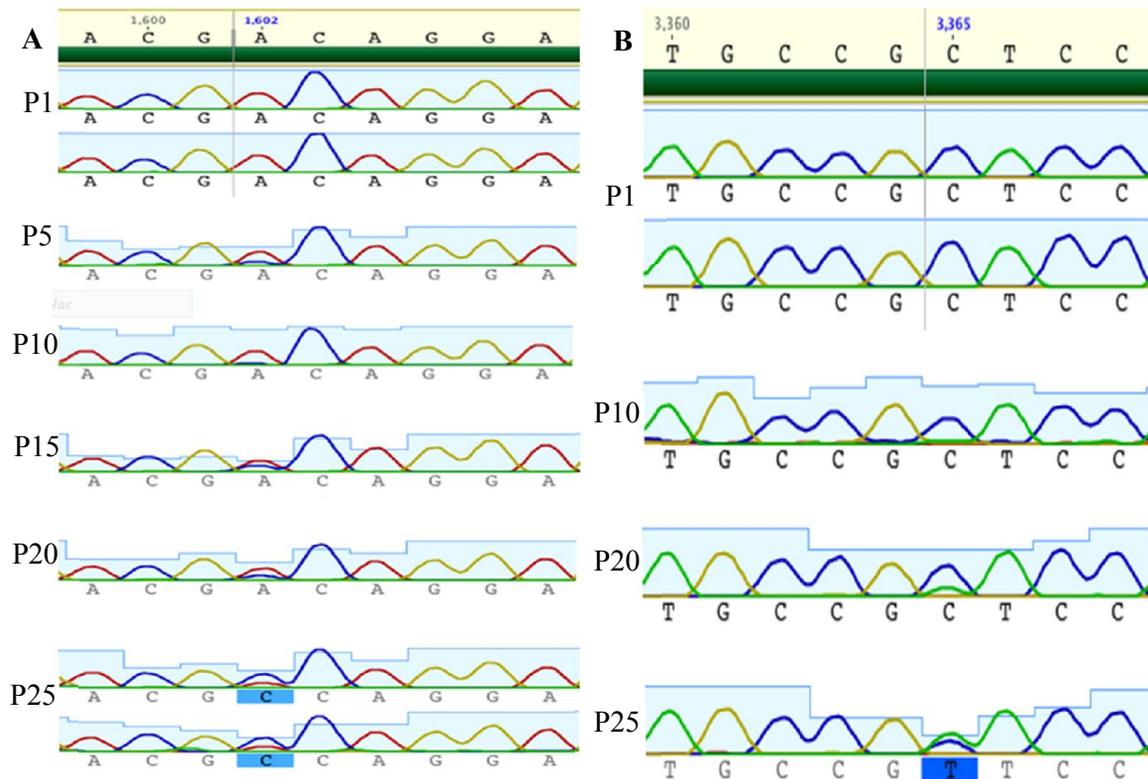


Figura 8: Identificação de mutações através do sequenciamento capilar. A: mutação observada no nucleotídeo 1602 no qual houve substituição de A (Adenina) por C (Citosina) na passagem 25 (P25) quando comparada com as demais passagens. B: mutação observada no nucleotídeo 3365 onde aconteceu a substituição de C (Citosina) por T (Timina) na passagem 25 (P25) quando comparada com as demais passagens.

A mutação no nucleotídeo 1602 foi uma transversão (A - C) e resultou em substituição de aminoácido passando de Treonina para Prolina na posição 501 da proteína E (Thr501Pro ou Thr222Pro na quando considerada apenas a proteína E) (figura 9). Já a mudança no nucleotídeo 3365 foi uma transição (C - T) e uma mutação silenciosa.

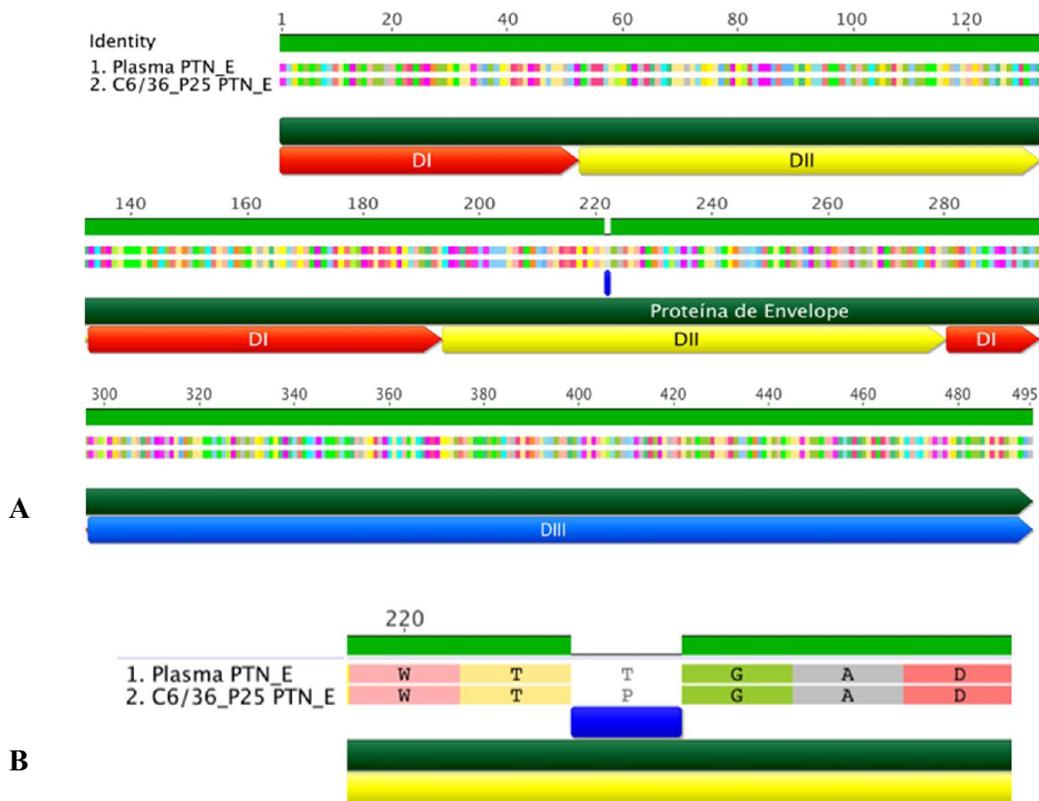


Figura 9: Sequência deduzida da proteína E destacando a mutação T501P. A) Imagem da proteína E completa destacando em azul a mutação observada em nosso trabalho. B) imagem ampliada da proteína E mostrando a sequência de aminoácidos. O retângulo azul destaca a mutação observada.

A substituição do aminoácido Thr501Pro consiste em uma importante mudança nas propriedades físico-químicas, pois muda de um aminoácido polar para um aminoácido apolar e portanto hidrofóbico, relacionado a dobra na cadeia polipeptídica.

5.5 Reações de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) – *Ion Torrent*

No preparo do chip para ser levado ao sequenciador obtivemos 76% de carregamento e deste total 100% dos poços foram preenchidos com amostra (ISPs), destas 57% eram clonais (somente um fragmento da biblioteca em cada ISP), e 90% foram aproveitadas gerando 954.446 *reads*, que após análise e edição totalizaram 484.647 *reads* com tamanho médio de fragmento de 221 bases utilizadas para análise final dos dados.

Foi obtido o genoma completo de todas as passagens submetidas a este método, com uma cobertura média de 1181x para plasma (P0); 1261x para P1; 669x para P5; 1100x para P10; 1014x para P15; 1112x para P20 e 997x para P25. Dezenove sítios variáveis nas posições 1025, 1602, 1810, 1887, 2519, 2632, 3174, 3365, 3648, 3832, 4248, 5306, 6428, 6911, 6912, 6923, 7067, 7863 e 10154 foram observados por meio de análise utilizando o plugin *variantCaller*. A tabela 7 mostra a variação encontrada nos sítios descritos anteriormente, bem como a frequência observada.

Passagem	Sítio	Ref.	Var.	Freq.	Tipo	Pos.	Consequência
P0	1887	C	T	17,6%	NS	<i>tat</i>	His593Tyr
	2632	A	G	18,8%	NS	<i>cga</i>	Gln844Arg
	3648	C	del	37,7%	NS	<i>-tc</i>	Del
	5306	C	T	15%	S	<i>tgt</i>	Cys1735
	6911	C	T	58,5%	S	<i>gat</i>	Asp2270
	6912	C	T	74,2%	S	<i>ttg</i>	Leu2271
	6923	T	C	15,3%	S	<i>gcc</i>	Ala2274
P1	3648	C	del	34,1%	NS	<i>-tc</i>	Del
	6911	C	T	17,7%	S	<i>gat</i>	Asp2270
	6912	C	T	27,8%	S	<i>ttg</i>	Leu2271
	6923	T	C	10%	S	<i>gcc</i>	Ala2274
P5	1602	A	C	20,1%	NS	<i>cca</i>	Thr501Pro
	1810	A	G	29,6%	NS	<i>aga</i>	Lys570Arg
	3174	T	C	13,9%	NS	<i>ctt</i>	Phe1025Leu
	3365	C	T	26,5%	S	<i>cgt</i>	Arg1088
	3648	C	del	36,6%	NS	<i>-tc</i>	Del
	4248	C	T	22%	S	<i>ttg</i>	Leu1383
	6911	C	T	28,9%	S	<i>gat</i>	Asp2270
	6912	C	T	40%	S	<i>ttg</i>	Leu2271
	6923	T	C	10,5%	S	<i>gcc</i>	Ala2274
P10	1025	A	T	39,6%	S	<i>ggt</i>	Gly308
	1602	A	C	13,9%	NS	<i>cca</i>	Thr501Pro
	1810	A	G	28,5%	NS	<i>aga</i>	Lys570Arg
	2519	C	T	10,08%	S	<i>tat</i>	Tyr806
	3365	C	T	15%	S	<i>cgt</i>	Arg1088

	3648	C	del	31,6%	NS	-tc	Del
	4248	C	T	29,4%	S	ttg	Leu1383
	7067	A	G	11,1%	S	ccg	Pro2322
P15	1025	A	T	29,6%	S	ggt	Gly308
	1602	A	C	32%	NS	cca	Thr501Pro
	1810	A	G	25%	NS	aga	Lys570Arg
	3365	C	T	33,8%	S	cgt	Arg1088
	3648	C	del	37%	NS	-tc	Del
	4248	C	T	29,7%	S	ttg	Leu1383
	5306	C	T	14,9	S	tgt	Cys1735
	6911	C	T	23,7%	S	gat	Asp2270
	6912	C	T	34,9%	S	ttg	Leu2271
	7863	A	G	12,9	NS	gaa	Lys2588Glu
P20	1025	A	T	24,8%	S	ggt	Gly308
	1602	A	C	24,8%	NS	cca	Thr501Pro
	1810	A	G	52%	NS	aga	Lys570Arg
	3365	C	T	26,2%	S	cgt	Arg1088
	3648	C	del	37%	NS	-tc	Del
	4248	C	T	48,7%	S	ttg	Leu1383
	5306	C	T	19,7%	S	tgt	Cys1735
	6911	C	T	17,4%	S	gat	Asp2270
	6912	C	T	25,4%	S	ttg	Leu2271
	7067	A	G	18,9%	S	ccg	Pro2322
P25	1025	A	T	17,5%	S	ggt	Gly308
	1602	A	C	65,8%	NS	cca	Thr501Pro
	1810	A	G	13,1%	NS	aga	Lys570Arg
	3365	C	T	69,3%	S	cgt	Arg1088
	3648	C	del	35,8%	NS	-tc	Del
	3832	A	G	17,3	NS	ggc	Asp1244Gly
	4248	C	T	11,1%	S	ttg	Leu1383
	6428	T	C	13,8%	S	ctc	Leu2109
	6911	C	T	22,1%	S	gat	Asp2270
	6912	C	T	32,1%	S	ttg	Leu2271
	10154	T	C	14,4	S	atc	Ile3351

Tabela 7: Sítios variáveis identificados por sequenciamento de nova geração e análise de variantes. Ref. (nucleotídeo encontrado na sequência de referência). Var. (variação encontrada). Freq. (frequência da mutação encontrada). S (mutação sinônima), NS (mutação não sinônima). Pos. (Posição do nucleotídeo mutante e em negrito a posição no códon).

A variação nos sítios 1887, 2519, 2632, 3174, 3832, 6428, 7863 e 10154 foi observada em apenas uma passagem. O sítio variável 7067 foi observado em duas passagens, e outros dois sítios variáveis, 5306 e 6923 foram observados em três passagens. Já a variação no sítio 1025 foi visualizada em quatro passagens, enquanto as variáveis dos sítios 1602, 1810, 3365 e 4248 foram observáveis em cinco passagens. Os sítios 6911 e 6912 foram observados em seis passagens e por fim, a variação no sítio 3648 foi observada em todas as passagens incluindo a sequência do plasma (tabela 8).

Passagem	Sítios variáveis	Sítios variáveis/tamanho do genoma %
P0	7	0,06
P1	4	0,03
P5	9	0,08
P10	8	0,07
P15	10	0,09
P20	10	0,09
P25	11	0,10

Tabela 8: Porcentagem de sítios variáveis/tamanho do genoma identificados em cada passagem. A porcentagem de sítios variáveis foi calculada tomando como base o genoma completo de 10.649 nucleotídeos sequenciado em cada passagem.

No que se refere a região da proteína onde essas mutações ocorreram, quatro delas foram na proteína E (1025, 1602, 1810 e 1887), outras quatro ocorreram na NS1 (2519, 2632, 3174 e 3365), duas na NS2A (3648 e 3832) e uma mutação tanto na NS2B (4248) quanto nas regiões codificantes para NS3 (5306) e NS4A (6428). Na proteína NS4B ocorreram quatro mutações (6911, 6912, 6923 e 7067) e por fim, duas mutações na região da NS5 (7863 e 10154).

Dentre os dezenove sítios variáveis dois consistiram em mutação do tipo transversão 1025 (A - T) e 1602 (A - C), sendo que a segunda resultou em substituição de aminoácido Thr501Pro, enquanto que a mutação na posição 1025 foi silenciosa. Já as mudanças nos nucleotídeos 1810, 1887, 2519, 2632, 3174, 3365, 3832, 4248, 5306, 6428, 6911, 6912, 6923, 7067, 7863 e 10154

foram transições e destas, seis resultaram em substituição de aminoácido 1810 (Lys570Arg); 1887 (His593Tyr); 2632 (Gln844Arg); 3174 (Phe1025Leu); 3832 (Asp1244Gly) e 7863 (Lys2588Glu), as demais foram silenciosas. O sítio 3648 consistiu em uma deleção.

5.6 Modelagem da proteína E por homologia

A busca automática de possíveis modelos para a construção da estrutura tridimensional da proteína de envelope (E) de P1 e P25 retornou 164 resultados. Posteriormente, o algoritmo automático do SWISS-MODEL reduziu a busca para 34 estruturas, sendo esse número reduzido manualmente para 17, baseado em critérios de tamanho, identidade e resolução da estrutura.

Em função dos valores de dois testes para a estimativa de qualidade global e por resíduo do modelo (GQME e QMEAN – Benkert *et al* 2011) foi escolhida a estrutura gerada com base no arquivo 3uaj.1. Este arquivo contém as coordenadas atômicas da estrutura cristalográfica da proteína de envelope do DENV-4 com 395 aminoácidos (1-395) e 3,23 Å de resolução, publicada em 2012 (Cockburn *et al* 2012). Maiores informações quanto ao modelo utilizado estão disponíveis no banco de dados de proteínas (PDB) sob o link: <http://pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3uaj>.

A partir do modelo foi possível verificar que a mutação T501P está localizada em uma estrutura em folha-beta no domínio II da proteína de envelope. Tal como esperado, por se tratar de mudança para prolina, foi possível verificar uma mudança estrutural no monômero da proteína com a formação de uma curvatura não existente na proteína de P1 (figura 10).

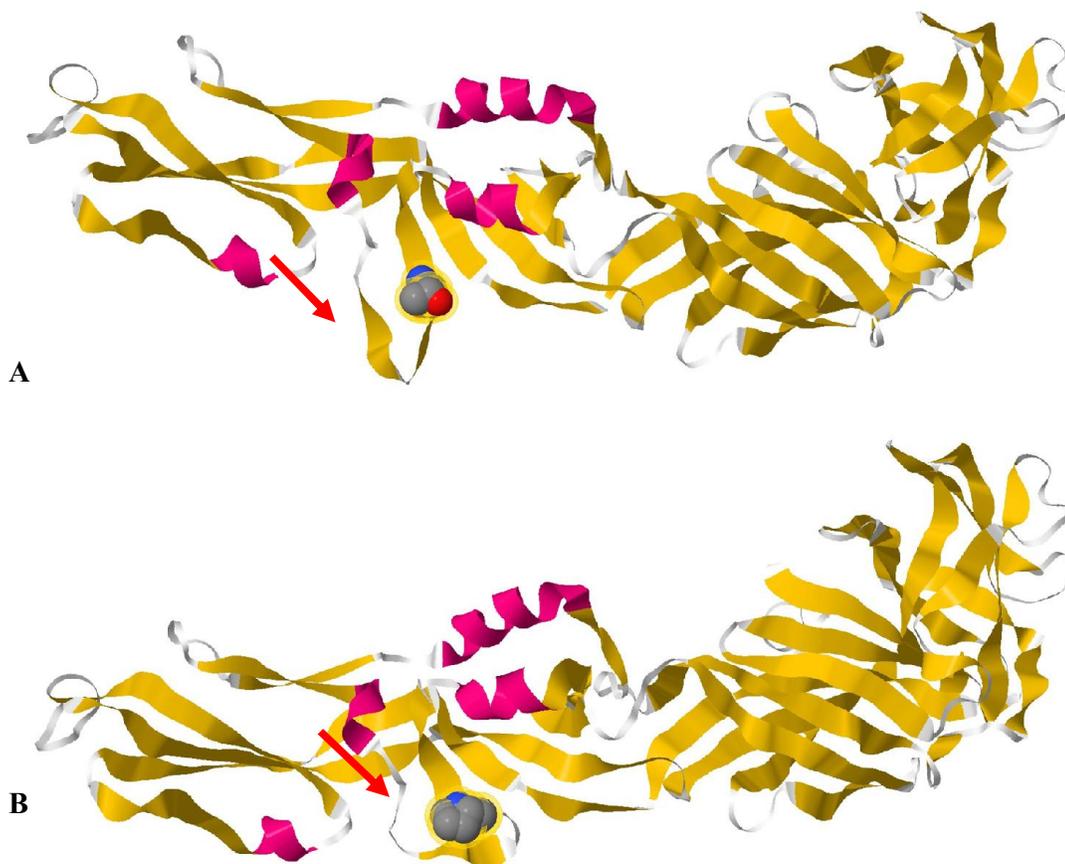


Figura 10: Monômero da proteína de envelope (E) das amostras P1 e P25, aminoácidos 1-395. A figura A representa o monômero de P1 e a figura B o monômero de P25. Estrutura produzida por modelagem por homologia no servidor SWISS-MODEL, a partir da coordenadas atômicas do arquivo 3uaj.1 (PDB). Molécula exibida no estilo *ribbons*, estruturas em alfa-hélice representadas em rosa; folhas-beta em amarelo e regiões em *loop* em branco. Destaque para os aminoácidos treonina (P1) e prolina (P25) na posição 501 representados no estilo *spacefill*.

5.6 Citometria de Fluxo

Os testes de citometria, todos realizados em duplicatas biológicas, mostraram marcação em todas as diluições utilizadas (figura 11). O anticorpo secundário apresentou uma auto fluorescência com uma média de 7% de células marcadas na menor diluição. Considerando este fator descartamos a possibilidade de utilizar este anticorpo nesta diluição. Então a melhor opção seria a diluição de 1/500 do anticorpo primário e 1/3200 do anticorpo secundário que apresentou uma média de 46% de células marcadas.

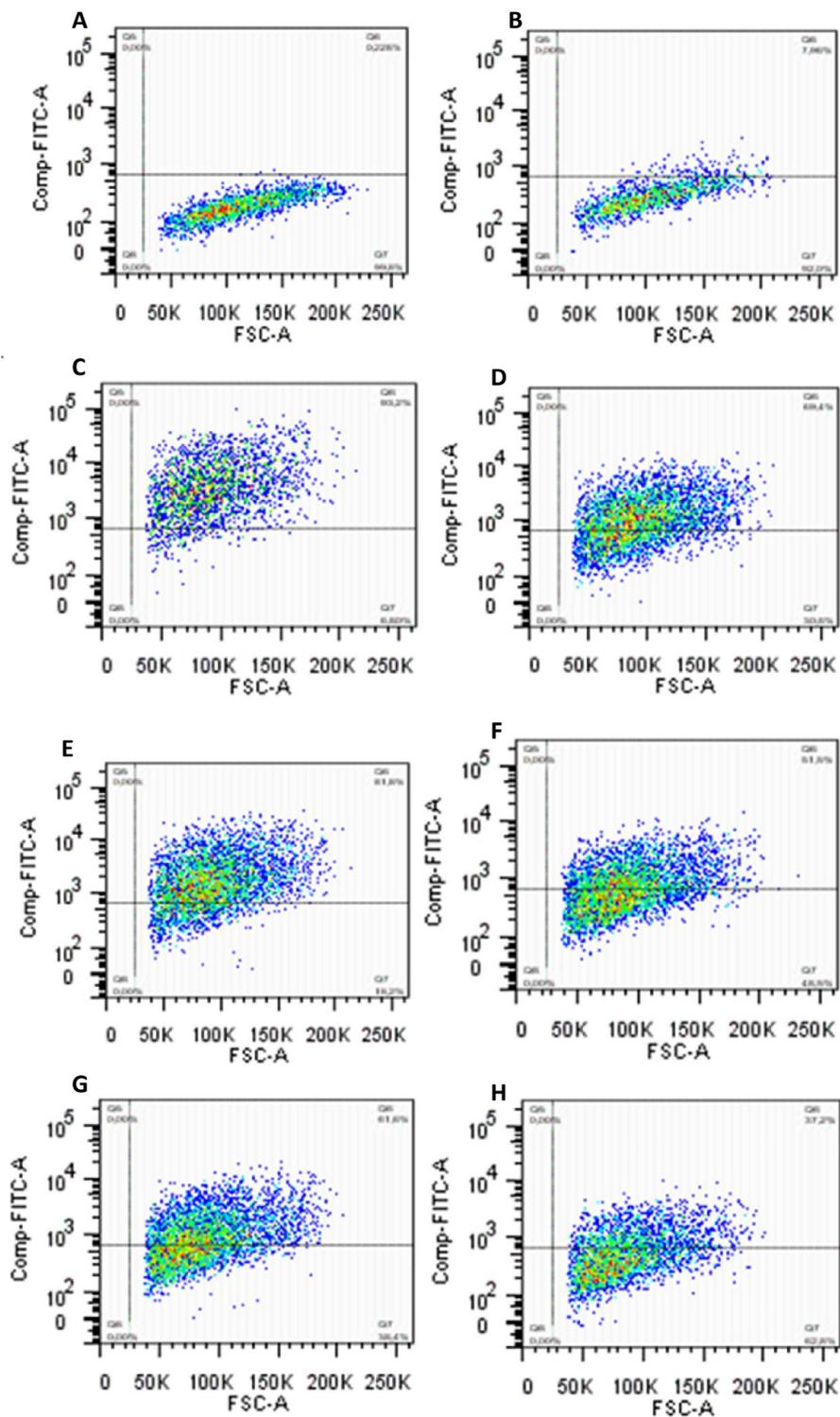


Figura 11: Resultado da citometria após teste de padronização dos anticorpos. A) células não infectadas e sem marcação. B) MOCK (9,21% células marcadas). C) Anticorpo primário na diluição 1/100 e secundário 1/200 (91% de marcação). D) Anticorpo primário na diluição 1/100 e secundário 1/3200 (62% de marcação). E) Anticorpo primário na diluição 1/500 e secundário 1/200 (77% de células marcadas). F) Anticorpo primário na diluição 1/500 e secundário 1/3200 (46% de células marcadas). G) Anticorpo primário na diluição 1/1000 e secundário 1/200 (57% de células marcadas). H) Anticorpo primário na diluição 1/1000 e secundário 1/3200 (30% marcação).

Tendo as diluições de uso do anticorpo definidas realizamos os ensaios para titulação viral. Entretanto não conseguimos obter marcação em nenhum dos ensaios que foi repetido mais de uma vez, inclusive aumentando o volume do inóculo e o tempo de espera para retirada do mesmo, além de diminuirmos a diluição do anticorpo

Realizamos outro teste substituindo o anticorpo secundário que estávamos utilizando por um disponibilizado pela plataforma de citometria do ILMD e utilizamos na diluição 1/100 (indicadas pelo responsável pela plataforma, como diluição usual em alguns dos protocolos). Verificamos marcação em P25, porém o anticorpo apresentou auto fluorescência atingindo praticamente a mesma intensidade de fluorescência observada nas células infectadas o que não nos permitiu aproveitar os dados.

Não tínhamos mais tempo hábil para repetir os experimentos e por este motivo não obtivemos a titulação viral nas passagens avaliadas e conseqüentemente não foi possível analisar o *fitness* viral por citometria.

5.7 RT-PCR em Tempo Real

Para avaliar o impacto das variações genéticas encontradas em P25 sobre a competência viral foram realizados dois experimentos de cinética de infecção, onde a quantidade relativa de RNA viral (normalizada frente a um controle inserido – bacteriófago MS2) foi avaliada por RT-qPCR. O primeiro passo foi verificar se a quantidade dos títulos virais para o inóculo era igual. Para tanto foi realizado um experimento de inoculação de culturas de células C6/36 em triplicata biológica com as amostras P1 e P25. Após 5 dias as células foram congeladas e descongeladas, sendo realizada a extração de RNA, como descrito anteriormente. Este RNA foi utilizado em reações de RT-qPCR em quadruplicata técnica para se comparar a quantidade de RNA viral a partir do inóculo de P1 e P25. Os valores de Ct de P1 e P25 se apresentavam dentro de uma distribuição normal (teste de D'Agostino & Pearson) e com uma média bastante próxima: 33,08;

DP 0,14 para P1 e 33,07; DP 0,44 para P25 (figura 12). Com base neste resultado foi possível determinar que as suspensões virais possuíam títulos muito próximos e que então poderiam ser utilizadas em ensaios de cinética sem a necessidade de correções para inóculos em quantidades iguais.

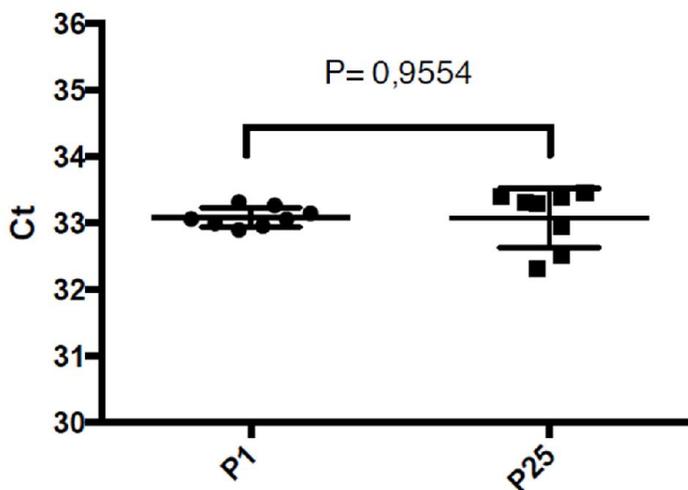


Figura 12: Média de Ct de P1 e P25 para titulação da carga viral. A figura mostra a média do Ct muito próxima para P1 e P25. Valor de P: 0,9554 mostra que não existe diferença com significância estatística entre os dois resultados.

Nos experimentos de cinética, a carga viral relativa do DENV, normalizada em função da carga viral do controle inserido (bacteriófago MS2), foi avaliada pelo método de $\Delta\Delta Ct$ (Livak e Schmittgen 2001) para três tempos diferentes pós-infecção. Os valores encontrados mostram que 72h P.I. a quantidade relativa de RNA viral na passagem P25 é 57% da quantidade de RNA viral encontrada para P1 no sobrenadante das culturas celulares. No entanto, a partir de 96h p.i. há uma inversão nestes valores com a carga viral relativa de P25 atingindo 300 (96h) e 187% (120h) da encontrada nas culturas inoculadas com P1 (figura 13).

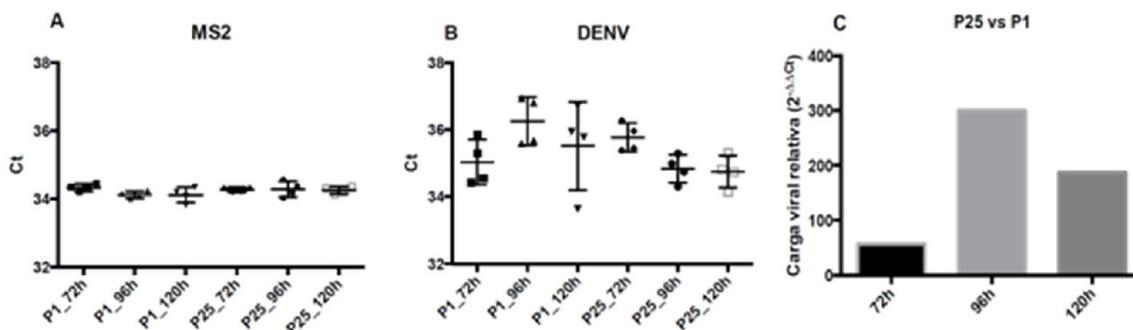


Figura 13: Análise do *fitness* viral a partir do sobrenadante das culturas infectadas. A) média do Ct para MS2. B) média do Ct para P1 e P25 nos tempos de 72h, 96h e 120h. C) razão entre P25 e P1 mostra aumento do *fitness* em P25 a partir do tempo de 72h.

De maneira análoga, a carga viral relativa do DENV foi analisada a partir da extração de RNA, não do sobrenadante, mas do interior celular. Os resultados obtidos a partir do RNA viral no interior celular demonstram uma inversão daquilo observado no sobrenadante das culturas celulares. Com 72h P.I. a quantidade relativa de RNA viral no interior celular para P25 é 141% do que é encontrado para P1, enquanto que no tempo de 120h essa razão é de 87% (figura 14).

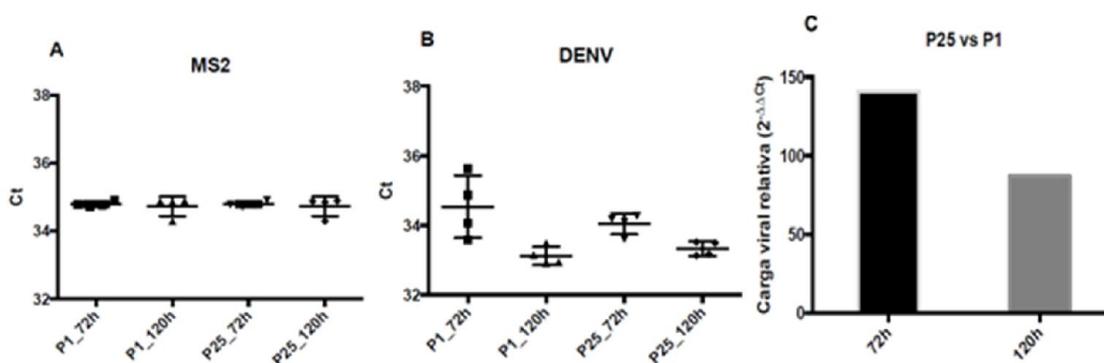


Figura 14: Análise do *fitness* viral a partir do RNA obtido das células C6/36 infectadas. A) média do Ct para MS2. B) média do Ct para P1 e P25 nos tempos de 72h e 120h. C) razão entre P25 e P1 mostra a quantidade relativa de RNA em P25 no momento de 72h superior a observada em P1 e inversão da situação no tempo de 120h.

6 DISCUSSÃO

As infecções por arbovírus representam um importante risco à saúde pública, sendo os vírus dengue, de acordo com os números de casos notificados, os principais agentes causadores destas síndromes febris (Azevedo *et al* 2007). No Brasil os primeiros registros epidêmicos datam do início dos anos 80 (Travassos – da- Rosa *et al* 1997) e desde então a transmissão vem ocorrendo de forma continuada intercalando períodos de grandes epidemias com períodos de menores ocorrências (Ministério da Saúde 2014b).

Assim como os demais vírus RNA o DENV possui altas taxas de erro durante seu ciclo de replicação, estimadas em $4,55 \times 10^{-4}$; $7,19 \times 10^{-4}$; $11,58 \times 10^{-4}$ e $7,27 \times 10^{-4}$ substituições/sítio/ano para os sorotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 respectivamente (Twiddy *et al* 2003).

Essas substituições tem sido alvo de diversos estudos Bray *et al.* (1998), Leitmeyer *et al.* (1999), Pandey *et al.* (2000), Pandey e Igarashi (2000), Chen *et al* (2003), Guirakhoo *et al.* (2004), Blaney *et al.* (2004), Vasilakis *et al* (2009) que buscam compreender os mecanismos relacionados ao processo evolutivo do DENV, uma vez que a diversidade genética tem sido associada ao aumento do risco de epidemias (Dos Santos *et al* 2011) e provavelmente representam maior impacto sobre a virulência e epidemiologia da doença no mundo (Klungthong *et al* 2008).

No presente estudo analisamos o processo de adaptação do DENV-4 em condições *in vitro* sendo escolhida a linhagem de células de *Aedes albopictus* (C6/36) para o desenvolvimento dos trabalhos. A opção por esta linhagem celular deu-se pelo fato de a mesma ser derivada de um vetor do DENV; ser sensível ao isolamento dos quatro sorotipos do vírus e possuir relativa facilidade de manuseio (Travassos da Rosa *et al* 1994; Samuel e Tyagi 2006), o que contribui também pra que seja amplamente utilizada nos laboratórios (Fonseca e Fonseca 2002).

Uma série de 25 passagens sucessivas do vírus foi realizada em cultura de células C6/36 e ao final do período de infecção determinado, não foram observadas alterações na morfologia celular características de infecções virais, o conhecido efeito citopático (ECP) em nenhuma passagem. Figueiredo *et al* (1990) observaram que o ECP parecia ser variável entre infecções com diferentes cepas do DENV nesta linhagem celular, sendo que a cepa de DENV-4, no trabalho realizado por eles, não apresentou ECP mesmo após sete dias de infecção. Em outro trabalho, Travassos da Rosa *et al* (1994) relataram que o DENV-4 pode não apresentar ECP ou apresentar um efeito muito discreto, capaz de passar muitas vezes despercebido.

A ausência de ECP inviabilizou a confirmação da infecção viral por meio da visualização direta das culturas celulares em microscopia ótica, sendo necessário utilizar uma metodologia para detecção de subcomponentes virais, neste caso optamos pela detecção do genoma viral. Em função do descrito anteriormente, a cada cinco passagens em cultura de células, era realizada a extração de RNA e a confirmação da presença do genoma viral pela metodologia de semi-nested RT-PCR desenvolvida por Lanciotti e colaboradores em 1992 (dados não mostrados).

Confirmada a presença do RNA viral, foram realizadas as amplificações dos genomas virais provenientes de algumas passagens. Inicialmente verificamos a necessidade de reavaliar um protocolo que já havia sido utilizado com sucesso em nosso laboratório para a amplificação do genoma completo do DENV-4 (Naveca *et al.*, 2012), uma vez que alguns *amplicons* das passagens seriadas não foram gerados. Não está claro porque o protocolo utilizado inicialmente não funcionou de forma satisfatória, mas uma possível explicação esteja no fato de que no estudo anterior foi utilizado material de isolamento em cultura de células após 12 dias de infecção, portanto com grande quantidade de RNA viral, o que facilitaria a amplificação de fragmentos longos, no caso 2-3KB, mesmo em condições sub-ótimas de eficiência de amplificação.

Após a obtenção dos produtos de amplificação de cada amostra testada, foi possível a realização do sequenciamento nucleotídico, a montagem de *contigs* e a detecção de mutações nas passagens P0, P1, P5, P10, P15, P20 e P25. Para a montagem do primeiro *contig* foi utilizada a sequência de referência do GenBank (NC_002640.1) como base, enquanto que nas montagens subsequentes foi utilizada com referência a sequência de P0.

Não foi possível determinar os 10.649¹ nucleotídeos de todas as passagens, em função da qualidade do eletroferograma de algumas sequências. Assim, pelo método de sequenciamento capilar, foi possível obtermos o genoma quase-completo do DENV-4 de P0, P10, P20 e P25. Por outro lado, não foi possível concluir o sequenciamento das outras passagens (P1, P5 e P15) por esta metodologia. No entanto, como estava prevista a utilização de outra metodologia de sequenciamento para as mesmas passagens, decidimos não repetir os experimentos de sequenciamento capilar.

Para promover o alinhamento das sequências finalizadas no sequenciamento capilar utilizamos o algoritmo MAFFT versão 7 (Kato 2013). Dois motivos nos levaram a optar pelo MAFFT: 1) a alta velocidade para processamento do alinhamento; 2) a relativa simplicidade em se alinhar sequências muito próximas como as desse estudo.

A outra metodologia de sequenciamento também utilizada neste trabalho foi o NGS, empregado com a finalidade de verificar mutações ocorridas em subpopulações virais. Através desta metodologia conseguimos determinar próximo dos 10.649 nucleotídeos de todas as passagens submetidas (P0, P1, P5, P10, P15, P20 e P25).

No primeiro método utilizado, o sequenciamento de Sanger, detectamos duas mutações localizadas nas posições 1602 e 3365 somente em P25. No segundo método (NGS) detectamos

¹ O tamanho das sequências finalizadas variou de 10.621 a 10.649. Os 10.649 nucleotídeos incluem as sequências dos iniciadores D4S1 e D4AS1, as quais devem ser removidas da análise uma vez que não podem ser validadas.

dezenove variações, ao longo das passagens, localizadas nas posições 1025, 1602, 1810, 1887, 2519, 2632, 3174, 3365, 3648, 3832, 4248, 5306, 6428, 6911, 6912, 6923, 7067, 7863 e 10154.

De posse das novas sequências genômicas (obtidas por NGS) foi realizada a comparação do genoma das passagens obtidas neste estudo. Dezenove mutações foram detectadas nas regiões codificantes para as proteínas E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 sendo a maior parte delas nas regiões das proteínas E, NS1 e NS4B com quatro mutações em cada.

O total de mutações detectadas pelo método NGS neste trabalho correspondeu a uma faixa entre 0,03% e 0,10% de sítios variáveis/tamanho do genoma, mostrando uma baixa variabilidade genética do DENV quando comparada com outros vírus de genoma RNA. Este fato já foi relatado em outros trabalhos como no de Zanotto *et al* (1993) no qual o autor relata que a taxa de substituição global do DENV é menor que a encontrada em outros vírus de genoma RNA. E no trabalho de Romano *et al* (2013) no qual foi detectada uma baixa variabilidade genética do DENV intra-hospedeiro.

Ao confrontarmos nossos resultados com os de outros trabalhos observamos que os mesmos diferem dos resultados obtidos por Chen *et al* (2003) que mesmo após 30 passagens do DENV-2 (Nova Guiné C) em cultura de células C6/36 não encontraram qualquer mutação. No entanto, este trabalho se ateve a estudar apenas a região que codifica para as proteínas de envelope e NS1, além disso não deixa claro o histórico da cepa utilizada, uma vez que a amostra DENV-2 (Nova Guiné C) é a amostra protótipo do DENV-2. Por este motivo torna-se necessário conhecer quantas passagens anteriores e em quais sistemas biológicos: culturas de células de invertebrado; vertebrado; inoculação intratorácica em vetores ou inoculação em cérebro de camundongo recém-nascido esta amostra passou previamente, que possa ter tido influência prévia na seleção de subpopulações virais.

O trabalho de Vasilakis *et al* (2009); submeteu duas amostras de DENV-2, uma silvática (P8-1407) e outra endêmica (IQT-1950) à dez sucessivas passagens em dois diferentes sistemas

celulares (C6/36 e Hu-7) com passagens seguidas em cada sistema ou alternadas. Diferente dos nossos resultados, em apenas 10 passagens os autores foram capazes de encontrar até 12 mutações, a partir da cepa endêmica inoculando alternadamente as duas linhagens celulares. Quando as passagens foram mantidas em uma única linhagem celular foram encontradas 10 mutações nas inoculadas em células Hu-7 e seis nas passagens realizadas em C6/36.

Semelhante aos resultados obtidos por nós quanto ao tipo de mutação, sendo duas transversões e seis transições; as mutações encontradas no trabalho de Vasilakis *et al* (2009) foram em sua maioria do tipo transição e apenas duas do tipo transversão. Quanto as regiões do genoma na qual essas mutações ocorreram, cinco substituições de nucleotídeos observadas no trabalho acima mencionado foram nas mesmas regiões da poliproteína encontradas em nosso estudo (NS1; NS2A; NS2B; NS3; NS4A E NS5), porém os autores não detectaram nenhuma mutação nas regiões das proteínas E, NS2B e NS4B, todavia detectaram substituições nucleotídicas na região 3'UTR não observadas em nossos experimentos.

Ao analisar todas as mutações detectadas em nossos experimentos três variações chamaram atenção pelo fato de terem aparecido com uma frequência maior que 50% no NGS e não terem sido detectadas no sequenciamento de Sanger. As mutações 6911 e 6912 apareceram com frequências de 58,5% e 74,2% respectivamente na P0 e a mutação no nucleotídeo 1810 aparece na P20 com uma frequência de 52%. Tal situação, portanto, pode mostrar um possível erro de sequenciamento da tecnologia Ion Torrent.

Em relação a variação no sítio 1810, foi possível observar que esta mutação aparece com uma frequência muito próxima da mutação no sítio 4248, embora esta segunda não tenha ultrapassado 50% de frequência em nenhuma passagem, chegou a 48,7% na P20. Vale destacar que quando a frequência da variante 1810 aumenta, a frequência da 4248 também aumenta e o mesmo ocorre em caso contrário, se diminui a frequência da 1810 a 4248 também diminui sua ocorrência.

Ao compararmos essas duas mutações com as duas mutações observadas no sequenciamento de Sanger, foi possível observar que no momento em que a variante nos sítios 1810 e 4248 estava com frequência elevada, a frequência nos sítios 1602 e 4248 estava menor e o mesmo ocorria em caso inverso. Considerando que os vírus RNA são propagados na forma de populações denominadas *quasispecies* (Martell *et al.* 1992; Wang *et al.* 2002), este fato pode indicar que as mutações nos sítios 1810 e 4248 estão em uma população distinta da que possui as variantes nos sítios 1602 e 3365, sendo que a segunda população tornou-se majoritária na P25 e por este motivo foi detectada no sequenciamento de Sanger.

As duas mutações observadas pelo método Sanger foram também observadas no NGS, porém dezessete variações foram detectadas apenas pelo segundo método. Dado semelhante foi relatado no trabalho de Araújo *et al.* (2013), no qual inicialmente os autores realizaram um teste piloto comparando os resultados de sequenciamento pelas mesmas metodologias aqui citadas e observaram que todas as mutações detectadas pelo método Sanger eram também observadas no NGS porém o segundo método apresentava mutações em regiões não detectadas por Sanger. Esses resultados foram decisivos para que os autores sequenciassem as demais amostras apenas no PGM.

O fato de termos observado que algumas mutações são detectadas apenas por NGS nos permite dizer que esta tecnologia, justamente por possibilitar o sequenciamento massivo e paralelo de fragmentos de DNA (Morozova e Marra 2008; Varuzza 2013), fornece resultados com uma grande cobertura de cada fragmento, permitindo verificar a presença de mutações fora da sequência majoritária como observado no método de Sanger, sendo portanto uma ferramenta indicada no estudo de variações genéticas em subpopulações virais.

Do total de mutações detectadas na P25, última passagem de nossos experimentos, apenas três resultaram em substituição de resíduos de aminoácidos, sendo elas a substituição do nucleotídeo 1602 ocasionada por uma mutação do tipo transversão (A-C), na primeira

posição do códon 501 (quando considerada apenas a proteína E, essa posição passa a ser 222) que leva a alteração de treonina para prolina na sequência deduzida da poliproteína viral. A outra mutação não-silenciosa foi encontrada na posição 1810, sendo do tipo transição (A-G) na segunda posição do códon 570 (quando considerada apenas a proteína E essa posição passa a ser 291) que leva a alteração de lisina para arginina e, por fim, a última mutação não sinônima ocorreu no nucleotídeo 3832 na segunda posição do códon resultando em alteração de Asp1244Gly.

Após o processamento da poliproteína viral, verificamos que as substituições encontradas em nosso estudo estão nos domínios I (nt 1810) e II (nt 1602) da proteína E, que possuem funções importantes na entrada do vírus na célula hospedeira. E também na proteína NS2A (3832) que possui função na síntese de RNA, tem importante papel na montagem viral e no processamento da NS1 (Kummerer e Rice 2002; Melian *et al* 2010) e ainda tem sido relacionada a resposta imune inibindo a ação dos interferons α/β (Munoz-Jordan *et al* 2003).

A construção do modelo teórico da proteína E permitiu observar que a mutação no nucleotídeo 1602, única mutação fixada em P25 (65,8% de frequência da variante) que altera o resíduo de aminoácido, alterou a curvatura de folhas β em uma região próxima a um *loop* no domínio II. O domínio I (DI) ou domínio central contém epítomos específicos não neutralizantes e o domínio II (DII) compreende uma região de dimerização da proteína, o peptídeo de fusão e representa a interface entre os outros dois domínios, além de conter muitos epítomos de reação cruzada que podem gerar ou não a neutralização por anticorpos monoclonais (Rey *et al* 1995; Chin *et al* 2007).

Mutações nessa região da poliproteína viral tem sido detectadas por outros autores (Gonçalves *et al.* 2002; Carneiro *et al* 2012) que ao compararem a frequência das mutações encontradas em seus experimentos, tem observado maior ocorrência na região codificadora para a proteína E que nas demais proteínas virais.

Vale destacar que alguns trabalhos tem indicado as regiões da proteína E e 3'UTR como importantes alvos para a ocorrência e fixação de mutações (Gonçalves *et al.* 2002; Rico- Hesse 2003), bem como o fato de que mutações nessa proteína podem resultar em aumento da virulência das cepas virais (Leitmeyer *et al.* 1999 ; Foster *et al.* 2003; Gardella-Garcia *et al.* 2008; Gonçalves *et al.* 2002; Rico- Hesse 2003).

Considerando as mutações detectadas nesta dissertação, localizadas na proteína E, torna-se importante destacar que esta proteína tem sido alvo de diversos estudos que objetivam mapear regiões conservadas (Mazumder *et al* 2007), bem como compreender a importância dessas regiões para a viabilidade viral (Kroschewsk *et al* 2009).

No trabalho realizado por Mazumder *et al* (2007) foram detectadas por análise computacional seis regiões conservadas, na proteína E, para os quatro sorotipos do DENV, nas posições N(37); Q(211); D(215); P(217); H(244) e K(246).

Nas pesquisas realizadas por Kroschewsk *et al* (2009) os autores analisaram os aminoácidos das regiões descritas por Mazumder *et al* (2007), utilizando um clone infeccioso do DENV-2 contendo mutações nas regiões descritas. Como resultado, encontraram que os resíduos Asp215; Pro217 e His244 são essenciais para a viabilidade viral, uma vez que não conseguiram recuperar partículas infecciosas de culturas inoculadas com clone infeccioso contendo mutações nestas posições.

Todos os trabalhos supramencionados que tiveram como alvo de estudo o domínio II da proteína do envelope viral, revelam a importância desta região para a o entendimento dos mecanismos de infecção viral. Vale enfatizar que as mutações com substituição de resíduos de aminoácidos detectadas em nosso trabalho também correspondem a essa região do envelope viral, porém em nenhum trabalho haviam sido descritas. De fato, não encontramos sequencias de DENV-4 depositadas nos bancos de dados públicos (GenBank, DDBJ, EMBL) com prolina na posição 501 (dados não mostrados).

De posse de todas as sequências e conhecendo as regiões com mutações, a segunda parte desta dissertação consistiu em verificar se tais variações poderiam estar associadas com o aumento da competência viral. Para isto foi necessário inicialmente titular os vírus das passagens 1 e 25 que correspondiam a amostra sem mutação e amostra com mutação, respectivamente.

O fato de a cepa viral utilizada neste estudo não gerar ECP, nos impossibilitou de realizar a titulação por ensaio de plaqueamento em células VERO (unidades formadoras de placas-PFU), uma vez que este tipo de titulação requer que a cepa gere ECP permitindo a contagem de placas formadas. Outra questão também determinante para que desconsiderássemos a titulação por meio da técnica de PFU, consistiu no fato de que esta metodologia utiliza células de vertebrado para realização do ensaio e nossos experimentos foram conduzidos em células de inseto o que poderia não representar o real título viral nas células utilizadas em nosso trabalho. Levando em consideração estes fatores, optamos por realizar a titulação pela metodologia de citometria de fluxo baseado nos protocolos descritos por Kao *et al* (2001), Lamberth (2005) e Medina (2012) através do qual a titulação é expressa em FACS IU/ml.

Apesar dos ensaios de padronização terem sido concluídos com sucesso, o ensaio de citometria de fluxo para a determinação do título viral não obteve o mesmo sucesso, mesmo após repetição dos testes trocando o anticorpo secundário. Este fato pode ser explicado por duas hipóteses: a) os anticorpos primários ou secundários provavelmente sofreram alguma degradação, provocando uma queda significativa na fluorescência detectada; b) os títulos virais em nossas amostras, poderiam estar abaixo de 10^4 PFU/ml, pois o protocolo de Medina (2012) é indicado para quantificação viral com concentrações maiores que 10^4 pfu/ml.

Frente a essas dificuldades para titulação e a falta de tempo hábil para adquirir novo anticorpo e repetir os experimentos, realizamos a quantificação relativa de RNA viral por RT-

qPCR (carga viral) que tem sido utilizada por outro autores (Lima 2011; Coffey *et al* 2011) inclusive para realizar experimentos de *fitness viral* conforme observado no trabalho Coffey *et al* (2011) que utilizou a metodologia de qPCR para avaliar o *fitness* do vírus Chikungunya (CHIKV) após ser inoculado em células BHK (*Baby Hamster Kidney*) e C6/36. Esta metodologia não permite conhecer a quantidade de partículas infecciosas, mas fornece a carga viral presente na amostra e assim nos foi permitido realizar as inoculações partindo de uma carga de RNA viral igual para os inóculos.

Relacionando os resultados obtidos do RNA extraído do sobrenadante de células infectadas frente aos obtidos do RNA extraído diretamente das células, observamos que no sobrenadante com 72 horas P.I. os títulos virais eram maiores que os observados em P25, porém após 96 horas P.I. os títulos de P25 eram três vezes maiores que os detectados em P1; com 120 horas P.I. essa diferença diminuiu (187% do encontrado em P1). Já no RNA obtido diretamente das células, no momento de 72 horas P.I. os títulos de P25 são maiores que os de P1, porém quando observamos o tempo de 120h os títulos de P1 já eram maiores que os de P25.

Estes dados nos permitem sugerir que as mutações observadas em P25 contribuíram para um provável aumento da competência viral da cepa utilizada no presente estudo, observado a partir do tempo de 72h P.I. no qual a carga viral presente no sobrenadante era relativamente maior que a carga viral observada para P1, permanecendo esses títulos mais altos pelo menos até 120h P.I., o maior tempo analisado neste estudo.

O aumento na competência pode estar relacionado com fato de as mutações por nós observadas estarem localizadas na proteína E, que é relacionada a patogenicidade de diversos flavivírus, não apenas pela definição do tropismo celular, mas também pela entrada do vírus na célula alvo (MODIS *et al.* 2004; REY *et al.* 1995). Outro ponto merecedor de destaque é a mutação em DII que é uma interface entre os outros domínios e mudanças nestas posições foram

apontadas como determinantes de patogenicidade, talvez por maior título viral (REY *et al.* 1995)

Estes resultados, obtidos em nossos experimentos vão de encontro a outros da literatura que apontam algumas mutações, mesmo únicas, na proteína E de *flavivirus* como determinantes para o aumento da virulência da cepa viral (Rey *et al.* 1995; Thant *et al.* 1995; Sittisomut 1997). Uma vez que estas alterações na proteína poderiam atuar na melhoria da capacidade de ligação viral à superfície celular ou dificultariam a ação de anticorpos neutralizantes (Chen *et al.* 1996).

Contudo é importante enfatizar que os resultados encontrados em relação ao *fitness* não podem ser considerados compatíveis com a realidade das infecções naturais, uma vez que foram realizados em condições *in vitro* e na titulação não foram consideradas apenas as partículas infecciosas. Além disso, a população viral encontrada em P25 é uma população mista (65,8% P501). Embora as sequências mutantes estejam presentes em maior porcentagem não podemos afirmar que os resultados observados em relação ao *fitness* são decorrentes apenas dessa população. Por essa questão, pretendemos dar continuidade as passagens com a finalidade de obter uma passagem que apresente apenas a população mutante e ainda realizar a titulação viral por citometria de fluxo e repetir os experimentos de titulação para confirmar ou não os dados até aqui obtidos.

7 CONCLUSÃO

No presente trabalho o vírus dengue foi passado continuamente em cultura de células C6/36, o que deu origem a 25 gerações do vírus e sete destas foram escolhidas para obtenção de genoma completo. Quatro sequencias foram obtidas pelo método Sanger e sete pelo NGS. Assim, pode-se afirmar que neste estudo o NGS apresentou-se de modo mais eficiente para a obtenção do genoma completo.

Após as reações de sequenciamento, a comparação dos genomas mostrou duas mutações pelo método de Sanger e nove mutações por meio do NGS. Este resultado nos permite dizer que o método NGS é capaz de mostrar alterações no genoma que não podem ser detectadas pelo método Sanger, fato este já esperado uma vez que a eletroforese capilar fornece como resultado apenas a sequência majoritária presente na amostra.

Ao final das 25 passagens do vírus em cultura de células, duas mutações foram fixadas nos nucleotídeos 1602 e 3365. Estas mutações apareceram na última passagem com uma frequência muito similar, 65,8% e 69,3% da população viral existente, respectivamente, o que sugere que estas possam estar no mesmo genoma, explicando assim o fato de uma mutação silenciosa ter sido selecionada.

O total de mutações detectadas no genoma do DENV-4 durante o processo de seleção/adaptação, realizado neste trabalho em cultura de células C6/36, correspondeu a uma faixa de 0,03% a 0,10% de sítios divergentes/tamanho do genoma, levando a sugerir que o vírus apresenta uma baixa variabilidade genética em células de invertebrados.

A análise do *fitness* realizada pelo método de RT-qPCR sugere que as mutações observadas na passagem 25 apresentam vantagem na infecção pelo vírus, entretanto outros estudos são necessários para confirmar este aumento de *fitness*, uma vez que o teste de cinética foi baseado na carga viral relativa por RT-qPCR, o que não significa dizer que todas as partículas eram infecciosas.

Em perspectiva a finalização deste trabalho abre uma série de questões e aponta para a necessidade do desenvolvimento de outras análises. A ideia futura é realizar experimentos que respondam se as mutações aqui encontradas também ocorrem em células de mamíferos e em sistemas *in vivo*, assim como verificar se o aumento do *fitness* aqui observado se repete nestes outros sistemas.

REFERÊNCIAL

- AZEVEDO, Raimunda do Socorro da Silva, et al. Reemergence of Oropouche fever, northern Brazil. *Emerg Infect Dis*: 2007 13:912–5.
- AVIRUTNAN, Panisadee, et al. Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. *J Immunol.*: 2011. p. 424-33.
- BENKERT, Pascal, et al. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*. 2011. Vol. 27 no. 3, p. 343–350. doi:10.1093/ /btq662.
- BIASINI, Marco, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*. 2014. vol. 12, Web Server issue.
- BLANEY, Joseph E, et al. Genetically modified, live attenuated dengue virus type 3 vaccine candidates. *Am J Trop Med Hyg*. 2004 Dec.;71(6):811–821.
- BRAY, Michael, et al. Genetic determinants responsible for acquisition of dengue type 2 virus mouse neurovirulence. *J Virol*. Feb 1998: 72(2):1647–1651.b.
- BRYANT Juliet E, et al. Size heterogeneity in the 3' noncoding region of South American isolates of yellow fever virus. *J Virol*. Mar 2005.;79(6):3807–3821.
- CARNEIRO, Adriana Ribeiro, et al. Molecular characterization of dengue vírus type 1 reveals lineage replacement during circulation in Brazilian territory. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Vol. 107. Nº 6. Rio de Janeiro:2012.
- CIOTA, Alexander; KRAMER Laura. Insights into Arbovirus Evolution and Adaptation from Experimental Studies. *Viruse*. 2010. 2594-2617; doi:10.3390/v2122594.
- CHEN Li-Kuang, et al. Generation and characterization of organ- tropism mutants of Japanese encephalitis virus in vivo and in vitro. *Virology* 223: 79-88, 1996.
- CHAMBERS, T.J., et al., Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol*, 1990. 44: p. 649-88
- CLYDE K, HARRIS E. RNA secondary structure in the coding region of dengue virus type 2 directs translation start codon selection and is required for viral replication. *J Virol* 2006 Mar.;80(5):2170–2182.
- CLYDE K, KYLE JL, HARRIS E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol* 2006 Dec.;80(23):11418–11431.
- COCKBURN et al. Structural insights into the neutralization mechanism of a higher primate antibody against dengue vírus. *The EMBO Journal* (2012) 31, 767–779
- COFFEY, Lark et al. Arbovirus high fidelity variant loses fitness in mosquitoes and mice. *PNAS* September 2011. vol. 108.| no. 38 p. 16038 -16043.

- CUI et. al. Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. *Virology*, v.246, n.2, p.409-17, 1998.
- DOMINGO, E.; HOLLAND, J.J. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In *Evolutionary Biology of Viruses*; Morse, S.S., Ed.; Raven Press: New York, NY, USA, 1994; pp.161–184.
- DOMINGO E: Mechanisms of viral emergence. *Veterinary Research* 2010, 41:14.
- DOMINGO E, HOLLAND JJ: RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Review of Microbiology* 1997, 51:151-178.
- DOS SANTOS et al. First report multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brasil. *Virology Journal*. 2011.
- DRAKE, J.W., HOLLAND, J.J. Mutation rates among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999, 96, 13910–13913.
- FERNANDEZ-GARCIA, M.D., et al., Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe*, 2009. 5(4): p. 318-28.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Uso de células de *Aedes albopictus* C6/36 na propagação e classificação de arbovírus das famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* e *Rhabdoviridae*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 23:13-18, jan-mar, 1990.
- FIGUEIREDO, R. M. P de et al. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. *Emerging Infect Dis* 2008 Apr.;14(4):667–669.
- FIGUEIREDO R. M. P. de et al. Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas, no período de 1998-1999. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37(6):476-479, nov-dez, 2004
- FISCHL, W.; BARTENSCHLAGER, R., Exploitation of cellular pathways by Dengue virus. *Curr Opin Microbiol*, 2011. 14(4): p. 470-5
- FONSECA, B. A. L. da; FONSECA, S. N. S. Fonseca e Fonseca. Dengue virus infections. *Current opinion in pediatrics*. 2002.
- GONÇALVES et al. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology* 2002.
- GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998 Jul.;11(3):480–496.
- GUIRAKHOO, F. et al. A single amino acid substitution in the envelope protein of chimeric yellow fever-dengue 1 vaccine virus reduces neurovirulence for suckling mice and viremia/viscerotropism for monkeys. *J Virol* 2004 Sep.;78(18):9998–10008.

- GURUKUMAR et al. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. *Virology Journal* 2009, **6**:10 doi:10.1186/1743-422X-6-10
- GUZMÁN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. Nature Publishing Group 2010 Dec.;**8**(12 Suppl):S7–16.
- HEATON, N.S.; RANDALL, G., Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe*, 2010. **8**(5): p. 422-32.
- HOLMES, E. C.; BURCH, S. S. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends Microbiol*, v.8, n.2, p.74-7, 2000.
- HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect. Genet. Evol.* 2003, **3**, 19–28.
- HUMPHREYS et al. A simple method for the preparation of large quantities of pure plasmid DNA. *Biochimica et Biophysica Acta*, 383 (1975) 457-463.
- ISHAK, et. al. Molecular Evidence of mother to child transmission of HTLV-IIc in the Kararao village in the Amazon Region of Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **35**: 519 – 525, 2001.
- JENKINS, G.M.; RAMBAUT, A.; PYBUS, O.G.; Holmes, E.C. Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *J. Mol. Evol.* 2002, **54**, 156–165
- KASSEN, R. The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity. *J. Evol. Biol.* 2002, **15**, 173–190.
- STANDLEY, K. MAFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* **30**:772-780, 2013.
- KELLEY, J. F., et al., Maturation of dengue virus nonstructural protein 4B in monocytes enhances production of dengue hemorrhagic fever-associated chemokines and cytokines. *Virology*, 2011. **418**(1): p. 27-39.
- KLUNGTHONG et al. The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. *Virology*, v. 329, p. 168–179, 2004.
- KROSCHEWSKI et al. Identification of amino acids in the dengue virus type 2 envelope glycoprotein critical to virus Infectivity. *Journal of General Virology* (2009), **90**, 2457–2461.
- KUMMERER; B. M.; RICE, C. M. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J. Virol.* **76**:4773–4784, 2002.
- LAMBRECHTS et al. Dengue-1 Virus Clade Replacement in Thailand Associated with Enhanced Mosquito Transmission. *J. Virol.* 2012, **86**(3):1853. DOI: 10.1128/JVI.06458-11.

- LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1992, 30(3):545.
- LEITMEYER; K. C. et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol Jun.*;73(6):4738–4747, 1999.
- LINDENBACH, B. D., RICE, C. M. Molecular biology of Flavivirus. In: *Advances in Virus Research: The Flavivirus: structure, replication and evolution* Chambers T.J. and Monath T.P. (Eds.). California, Elsevier, v. 59, p.23-61, 2003.
- LIVAK, K. J. ; SCHMITTGEN, T. D., . Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2\Delta\Delta C_t$ method. *Method* 25, 402 – 408, 2001.
- MARKOFF, L. 5 and 3 NCRs in Flavivirus RNA. In: *Advances in Virus Research: The Flavivirus: structure, replication and evolution.* Chambers, T.J., Monath, T.P. (Eds.), California, Elsevier, 2003, v. 59, p. 177-223.
- MARTELL, M. et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol May*;66(5):3225–3229, 1992.
- MAZUMDER, R. et al. Computational analysis and identification of amino acid sites in dengue E proteins relevant to development of diagnostics and vaccines. *Virus Genes.* 2007 Oct;35(2):175-86.
- MEDINA, F. et al. Dengue Virus: Isolation, Propagation, Quantification, and Storage. *Current Protocols in Microbiology* 15D.2.1-15D.2.24, Published online November 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com), 2012.
- MELIAN, E. B. et al. NS1' of flaviviruses in the Japanese encephalitis virus serogroup is a product of ribosomal frameshifting and plays a role in viral neuroinvasiveness. *J. Virol.* 84:1641–1647, 2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE 2014. DENGUE. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/dengue>).
- MINISTÉRIOS DA SAÚDE - Secretaria de vigilância em saúde .Boletim epidemiológico. Volume 45. Numero 16 de 2014.
- MODIS, Y., et al., Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, 2004. **427**(6972): p. 313-9.
- MUNOZ-JORDAN, J. L. et al. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:14333–14338, 2003.
- NAVECA et al. Complete Genome Sequence of a Dengue Virus Serotype 4 Strain Isolated in Roraima, Brazil. *J. Virol.* 86(3):1897, 2012.
- PANDEY, B. D.; IGARASHI, A. Severity-related molecular differences among nineteen strains of dengue type 2 viruses. *Microbiol Immunol* 2000;44(3):179–188.

- PANDEY, B.D. et al. Molecular evolution, distribution and genetic relationship among the dengue 2 viruses isolated from different clinical severity. *Southeast Asian J Trop Med Public Health Jun.*;31(2):266–272, 2000.
- REY, F. A. et al. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375: 291-298, 1995.
- RICO-HESSE, R. et al. Evolution and virulence of Dengue viruses. *Adv. Virus res* 1990.
- RICO-HESSE, R et al. Molecular evolution of dengue type 2 virus in Thailand. *Am J Trop Med Hyg Jan.*;58(1):96–101, 1998.
- RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res* 59: 315-341, 2003.
- RODENHUIS-ZYBERT, I.A., et al., Immature dengue virus: a veiled pathogen? *PLoS Pathog*, 2010. 6(1): p. e1000718.
- ROMANO, C. M. et al. Inter- and Intra-Host Viral Diversity in a Large Seasonal DENV2 Outbreak. *PLoS ONE* 8(8), 2013.
- SAMUEL, P. e TYAGI, B. K. Diagnostic methods for detection and isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. *The Indian Journal of Medical Research*. 2006.
- SANCHEZ, I. J.; RUIZ, B. H. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. *J Gen Virol*, v.77, n.10, p.2541-5, 1996.
- SCWEDE, T. et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, 2003, Vol. 31, No. 13.
- SCOTT, T.W.; WEAVER, S.C.; MALLAMPALLI, V.L. Evolution of mosquito-borne viruses. In *The Evolutionary Biology of Viruses*; Morse, S.S., Ed.; Raven Press, Ltd: New York, NY, USA, 1994; pp. 293–324.
- SELIGMAN, S. J. Constancy and diversity in the flavivirus fusion peptide. *Virol J* 2008;5:27.
- SITTISOMUT, N. et al. Possible occurrence of a genetic bottleneck in dengue serotype 2 viruses between the 1980 and 1987 epidemic seasons in Bangkok, Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 57: 100-108, 1997.
- THANT, K. Z. et al. Sequences of E/NS1 gene function from four dengue-2 viruses of Northeastern Thailand and their evolutionary relationships with other dengue-2 viruses. *Microbiol Immunol* 39: 581-590, 1995
- TRAVASSOS-DA-ROSA AP, ROCHA JM, SILVA OV, LINS ZC. Surto de Dengue em Boa Vista, território de Roraima, Brasil. *Boletim Epidemiológico* 1982; 14:93-100.

- TRAVASSOS – DA- ROSA, A. P. da. et al. Os Arbovirus no Brasil: Generalidades, Métodos e Técnicas de estudo. Documento técnico nº2. Instituto Evandro Chagas. Ministério da Saúde. 1994.
- TRAVASSOS-DA-ROSA, A. P. et al. Dengue. *In*: Leão RNQ, coordenador. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. Belém: CEJUP/Universidade do Estado do Pará, p. 227-248, 1997.
- TWIDDY et al. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. *Mol. Microbiol. Evol.* 2003.
- VASILAKIS, N. et al. Mosquitoes put the brake on arbovirus evolution: experimental evolution reveals slower mutation accumulation in mosquito than vertebrate cells. *PLoS Pathog* Jun.5 (6):e1000467, 2009.
- WANG, W. K. Dengue type 3 virus in plasma is a population of closely related genomes: quasispecies. *J Virol* 2002 May; 76 (9):4662–4665.
- WARG, A. R.; KURATH, G.. Viral fitness: definitions, measurement, and current insights. *Current Opinion in Virology* 2012, 2:538–545.
- WEAVER, S.C.; RICO-HESSE, R.; SCOTT, T.W. Genetic diversity and slow rates of evolution in New World alphaviruses. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 1992, 176, 99–117.
- WEAVER, S.C.; VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understand the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 9, p. 523-540, 2009.
- WHITEHEAD, S.S., et al., Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol*, 2007. (7): p. 518-28.
- WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control - New edition 2009. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data 2009 Oct.:1–160.
- WHO. Dengue and severe dengue. Factsheet N 117, update march 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.
- WILSON, D.S.; YOSHIMURA, J. On the coexistence of specialists and generalists. *Amer. Naturalist* 1994, 144, 692–707.
- WOOLHOUSE, M.E, et al. Population biology of multihost pathogens. *Science* 2001, 292, 1109–1112.
- ZANOTTO, P.M. et al. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 548–553, 1996.
- WOOLHOUSE, M.E.; TAYLOR, L.H.; HAYDON, D.T. Population biology of multihost pathogens. *Science* 2001, 292, 1109–1112.