



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
INSTITUTO CARLOS CHAGAS – FIOCRUZ/PR  
Doutorado em Biologia Celular e Molecular



**VÍRUS DA DENGUE: NOVAS ABORDAGENS PARA O ESTUDO DA  
NEUROPATHOGENESE**

DAISY MARIA STROTTMANN

CURITIBA  
JANEIRO 2013

DAISY MARIA STROTTMANN

**VÍRUS DA DENGUE: NOVAS ABORDAGENS PARA O ESTUDO DA  
NEUROPATHOGÊNESE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Área de Concentração em Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Dra Claudia N. Duarte dos Santos






CURITIBA  
JANEIRO 2013

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia  
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná  
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

### ATA DA TRECENTÉSIMA VIGÉSIMA SEXTA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Aos dez dias do mês de Janeiro de dois mil e treze, às 13h30min, nas dependências do Instituto Carlos Chagas (ICC), reuniu-se a banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, composta pelos Profs: Drs. Myrna Cristina Bonaldo (Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ), Daniel Santos Mansur (Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC), Nilson Ivo Tonin Zanchin (Instituto Carlos Chagas – ICC), Bruno Correa Dallagiovanna Muniz (Instituto Carlos Chagas - ICC), e Cláudia Nunes Duarte dos Santos (Orientadora do Instituto Carlos Chagas ICC), com a finalidade de julgar a Tese da candidata **Daisy Maria Strottmann**, intitulada: “Vírus da dengue: novas abordagens para o estudo da neuropatogênese” para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular. A candidata teve em torno de 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação e cada examinador, teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de mais 30 (trinta) minutos para resposta da candidata ou de 60 (sessenta) minutos, quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pela orientadora, Dra. Cláudia Nunes Duarte dos Santos. Após analisar a tese e arguida a candidata, os membros da banca examinadora deliberaram pela “**APROVADA**”, habilitando-a ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Fisiologia. A emissão do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

<u>Examinador/Afiliação</u>	<u>Parecer</u>	<u>Assinatura</u>
<b>Profa. Dra. Cláudia Nunes Duarte dos Santos</b> Orientadora e presidente da banca Instituto Carlos Chagas - ICC	APROVADO	
<b>Profa. Dra. Myrna Cristina Bonaldo</b> Instituto Oswaldo Cruz –FIOCRUZ/RJ	APROVADA	
<b>Prof. Dr. Daniel Santos Mansur</b> Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC	APROVADA	
<b>Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin</b> Instituto Carlos Chagas - ICC	APROVADA	
<b>Prof. Dr. Bruno Dallagiovanna Muniz</b> Instituto Carlos Chagas - ICC	APROVADA	

Dedico este trabalho aos meus pais, Jane e Ricardo, que sempre me apoiam em minhas escolhas profissionais e não mediram esforços para que eu as pudesse realizar.

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Carlos Chagas-ICC/FIOCRUZ-PR, um dos esteios da ciência, por oferecer as condições necessárias para a realização deste trabalho e para a minha formação científica;

À Universidade Federal do Paraná (UFPR) por possibilitar através do programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Biologia Celular e Molecular a minha formação acadêmica profissional;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos em um período deste doutorado;

À minha orientadora, Dra. Claudia N. Duarte dos Santos, pelo constante apoio, estímulo e principalmente pela confiança a mim concedida desde o início do desenvolvimento deste trabalho;

Ao Dr. Samuel Goldenberg, Diretor do Instituto Carlos Chagas, pelo apoio e facilidades oferecidas, sem as quais teria sido mais difícil concluir esta tese;

Aos meus colegas de laboratório, em especial ao Guilherme Ferreira Silveira, Giovanni A. C. Mazzaroto, Vanessa Stella e Luana de Borba pelas constantes discussões científicas e auxílio na execução de experimentos;

Ao colega Nilson José Fidêncio e sua equipe de trabalho pelo preparo cuidadoso de reagentes e materiais necessários para realização de nossos experimentos.

À minha grande amiga e colega de trabalho Mariana Serpeloni pelo companheirismo e pelas árduas discussões científicas geradas nas madrugadas durante nossa jornada de trabalho no ICC ou durante os nossos "*Bar Tours*";

Aos membros da banca examinadora, Dra. Myrna Cristina Bonaldo, Dr. Bruno Dallagiovanna Muñiz, Dr. Daniel Santos Mansur e Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin, que gentilmente aceitaram o convite para avaliação deste trabalho;

Ao Dr. Luiz Juliano Neto e sua equipe pela colaboração para execução dos ensaios funcionais de protease;

Eu não poderia deixar de agradecer a quem, que com grande sabedoria, encaminhou os meus primeiros passos na arte da pesquisa científica, ao Prof. Dr. Luiz Carlos Kreutz meus sinceros agradecimentos.

Aos meus pais, Jane e Ricardo, que através de seu exemplo me ensinaram os caminhos da ética, honestidade e amabilidade. Agradeço pelos ensinamentos de vida, pelo amor incondicional e pelo incentivo que me encoraja a sempre seguir em frente.

Por fim, gostaria de expressar meus mais sinceros agradecimentos às pessoas que contribuíram para minha formação acadêmica, profissional e pessoal. Seria difícil

listar a todos, porquanto não haveria espaço disponível. Assim, vão minhas escusas para aqueles que por ventura tenha omitido.

*Daisy Maria Strottmann*

*"Nada grandioso no mundo foi realizado sem paixão."*

**Georg Wilhelm Friedrich Hegel**

## RESUMO

A dengue constitui um grande problema de saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais do globo. Apesar dos grandes avanços na biologia do vírus da dengue (DENV), muitos aspectos da patogênese permanecem desconhecidos. A ausência de um modelo animal adequado, que mimetize o espectro da infecção pelo DENV, institui uma das principais dificuldades no estudo da dengue. Múltiplas linhas de evidências indicam que a gravidade da doença é, provavelmente, determinada pela interação entre fatores virais e do hospedeiro. Alguns determinantes genéticos de virulência intrínseca do DENV no hospedeiro foram identificados, no entanto, nenhuma correlação conclusiva entre genótipo viral, transmissibilidade do vírus e patogenicidade foi estabelecida. Neste estudo, foi utilizado um painel de DENV tipo 1 (DENV-1) recombinante para investigar o papel de determinantes genéticos de virulência previamente identificados em duas cepas altamente neurovirulentos (FGA/NA D1D e FGA/NA P6). A replicação e capacidade de produção de partículas virais infecciosas foram avaliadas *in vivo* (modelo de camundongos imunocompetentes), *in vitro* (linhagens celulares humanas e de insetos) e *ex vivo* (células dendríticas derivadas de monócitos humanos, mdDCs). Os resultados demonstraram que a associação das mutações na proteína de envelope (E) e no domínio helicase da proteína NS3 (NS3<sub>hel</sub>) apresentam um efeito sinérgico na modulação do *fitness* viral *in vitro* e *in vivo*, aumentando a síntese de RNA, a carga viral, a robustez da resposta imune e mortalidade dos animais. No entanto, os vírus contendo apenas as mutações na proteína NS3 (NS3<sub>435</sub> e NS3<sub>480</sub>) foram capazes de se replicar eficientemente no SNC de camundongos, de causar encefalite e altas taxas de mortalidade, o que sugere que essas mutações desempenham um papel importante na modulação da replicação viral *in vivo*. As mutações NS3<sub>435</sub> e NS3<sub>480</sub> aumentam também o *fitness* viral em mdDCs, aumentando a síntese de RNA e a carga viral. Além disso, foi demonstrado que as mutações no domínio helicase não afetam significativamente a atividades de protease e NTPase da NS3 *in vitro*. Apesar do elevado nível de replicação do RNA viral, a infecção pelo DENV foi capaz de reduzir a produção de IFN tipo I em mdDCs após estímulo dos receptores do tipo Toll (TLR). Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a presença de uma única mutação no genoma do DENV aumenta o *fitness* viral *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo* e é suficiente para modular a resposta imunológica do hospedeiro e promover uma infecção produtiva. Dadas as limitações atuais para a compreensão das bases moleculares da patogênese da dengue, estes resultados podem contribuir para fornecer subsídios sobre as interações vírus/hospedeiro e novas informações sobre os mecanismos da biologia básica da dengue.

**Palavras-chave:** Vírus da dengue (DENV), proteína não estrutural 3 (NS3), proteína de envelope (E), clone infeccioso do DENV, replicon subgenômico do DENV, modelo murino, célula dendrítica (DC)



## ABSTRACT

Dengue constitutes a significant public health problem in tropical and subtropical regions of the world. Despite major advances in dengue virus (DENV) biology, many aspects of dengue pathogenesis remain largely unknown. The absence of a suitable animal model, mimicking the full spectrum of DENV infections, is one of the main difficulties in studying dengue disease. Multiple lines of evidence indicate that disease severity is probably determined by the interplay of viral and host factors. Some viral genetic determinants of the intrinsic virulence of DENV in the host have been identified; nevertheless, no conclusive evidence of a correlation between viral genotype and virus transmissibility and pathogenicity has been obtained. In this study, we used a panel of recombinant DENV type 1 (DENV-1) to investigate the role of genetic determinants of virulence previously identified in two highly neurovirulent strains (FGA/NA d1d e FGA/NA P6). The replication and viral production capacity of the recombinant viruses were assessed *in vivo* (immunocompetent mice model), *in vitro* (human and insect cells lines) and *ex vivo* (dendritic cells derived from human monocytes, mdDCs). Our results demonstrated that paired mutations in the envelope protein (E) and in the helicase domain of the NS3 (NS3<sub>hel</sub>) protein have a synergistic effect enhancing viral fitness both *in vitro* and *in vivo* by increasing RNA synthesis and viral load, the strength of the immune response and animal mortality. However, the virus carrying mutations only at the NS3 protein (NS3<sub>435</sub> and NS3<sub>480</sub>) was able to replicate efficiently in the CNS of mice and to cause encephalitis and high mortality rates, suggesting that these mutations play an important role on the viral fitness modulation *in vivo*. These mutations also enhanced viral fitness in mdDCs by increasing RNA synthesis and viral load. Additionally, it has been demonstrated that the mutations NS3<sub>435</sub> and NS3<sub>480</sub> in the helicase domain do not significantly affect the protease and NTPase activities of NS3 *in vitro*. Despite the high level of RNA replication, DENV reduces the ability of mdDCs to produce type I IFN triggered by Toll-like receptor (TLR) signaling. The results presented herein show that a single mutation in DENV genome enhances viral fitness *in vivo*, *in vitro* and *ex vivo* and is enough to subvert the host immune response and establish a productive infection. Given current limitations to our understanding of the molecular basis of dengue pathogenesis, these results could contribute to provide insights into virus/host interactions and new information about the mechanisms of basic dengue biology.

**Keywords:** Dengue virus (DENV), non-structural protein 3 (NS3), envelope protein (E), DENV infectious clone, DENV subgenomic replicons, murine model, dendritic cells (DC)

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	<b>Página</b>
Figura 1 - Mapa da distribuição global dos casos de dengue.....	27
Figura 1.1 - Número de casos de dengue reportados no Brasil entre os anos de 1990 e 2011.....	28
Figura 1.2 - Organização esquemática do genoma e da poliproteína viral.....	33
Figura 1.3 - Proteínas codificadas pelo genoma do DENV.....	34
Figura 1.4 - Representação esquemática da partícula dos flavivírus durante o processo de maturação e fusão da partícula viral.....	36
Figura 1.5 - Representação da arquitetura e motivos conservados da proteína NS3 DEXH helicase dos flavivírus.....	41
Figura 1.6 - Interação das proteínas virais e da célula hospedeira com as regiões não traduzidas do genoma dos DENVs.....	44
Figura 1.7 - Modelo do ciclo replicativo do complexo de replicação dos flavivírus.....	47
Figura 1.8 - Alvos da resposta dos linfócitosT frente a infecção pelo DENV.....	50
Figura 1.9 - Número de casos graves de dengue reportados no Brasil entre os anos de 1999 e 2011.....	54
Figura 1.10 - Localização das mutações nas proteínas E e NS3 no contexto do genoma do DENV.....	60
Figura 3.1 - Representação esquemática do genoma dos clones de DENV-1.....	86
Figura 4.1 - Representação esquemática do genoma dos clones infecciosos recombinantes.....	102
Figura 4.2 - Cinética de infecção no SNC de camundongos individuais infectados com mock e com os DENV-1 recombinantes vBACDV1 e vBAC-E <sub>402</sub> /NS3 <sub>209</sub> /NS3 <sub>480</sub> ..	105
Figura 4.3 - Determinação da taxa de RNA genômico equivalente	

	(GE) a dose de 562 ffu/C6/36 dos DENV-1 recombinantes.....	106
Figura 4.4 -	Detecção dos DENV-1 recombinantes no cérebro de camunongos 8 dpi.....	107
Figura 4.5 -	Detecção de RNA viral na medula espinhal de animais inoculados via i.c. com mock e os DENV-1 recombinantes vBACDV1 e VBAC-E <sub>402</sub> NS3 <sub>209</sub> NS3 <sub>480</sub> .....	108
Figura 4.6 -	Cinética de infecção dos DENV-1 em células C6/36 e Huh7.5.....	109
Figura 4.7 -	Análise do CPE induzido pela infecção dos DENV-1 recombinantes em células Huh7.5 72 hpi.....	111
Figura 4.8 -	Ensaio de ligação dos DENV-1 recombinantes em células Neuro 2a.....	112
Figura 4.9 -	Alinhamento de aminoácidos da região prM-E dos vírus quiméricos de YF/DENV-1 (MATEU et al., 2006) (vPAC-YF/DENV-1, vPAC-YF/DEN-1-E <sub>402</sub> e vPACYF/DEN-1-E <sub>405</sub> ) e DENV-1, cepas BR/90 (número de acesso GenBank AF226685) e FGA/89 (número de acesso GenBank AF226687).....	113
Figura 4.10 -	Eletroforese em gel de agarose 0,8% das ampliações e clonagem dos fragmentos mutados.....	114
Figura 4.11 -	Preparação do material para transfecção do RNA viral em linhagem celular.....	115
Figura 4.12 -	Análise da cinética de transfecção do RNA dos vírus quiméricos recombinantes pela técnica de imunofluorescência.....	116
Figura 4.13 -	Efeito das mutações E402 e E405 na modulação fenotípica dos vírus quiméricos recombinantes YF/DENV-1 em células C6/36 7dpi.....	117
Figura 4.14 -	Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% das ampliações por PCR da região prM-E dos vírus quiméricos recombinantes vPAC-YF/DENV-1 da P2 em células C6/36.....	118

Figura 4.15 -	Análise da expressão e purificação da proteína NS3 <sub>hel</sub> recombinante do DENV-1 por SDS-PAGE, realizada sob condições desnaturantes em gel de poliacrilamida 13%.....	119
Figura 4.16 -	Análise da produção de anticorpos policlonais em soro de camundongos BALB/c imunizados com a proteína NS3 <sub>hel</sub> do DENV por ensaio de <i>western blotting</i> .....	120
Figura 4.17 -	Análise da reatividade dos mAbs anti-NS3 <sub>hel</sub> por imunofluorescência em células C6/36 infectadas com os DENV1-4.....	122
Figura 4.18 -	Alinhamento de aminoácidos do domínio helicase dos DENV.....	122
Figura 4.19 -	Análise da reatividade dos mAbs 1402-7B e 1722-1B contra a proteína do DENV-1 cepa BR/90.....	123
Figura 4.20 -	Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% dos clones subgenômicos do DENV-1 contendo os genes repórteres GFP e renila luciferase.....	124
Figura 4.21 -	Cinética de transfecção dos RNAs subgenômico do DENV-1 em células de inseto C6/36.....	125
Figura 4.22 -	Esquema da estratégia de clonagem para obtenção dos replicons subgenômicos de DENV-1, contendo as mutações de interesse na proteína NS3.....	127
Figura 4.23 -	Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% dos clones subgenômicos do DENV-1.....	128
Figura 4.24 -	Imunofluorescência em células C6/36 transfectadas com os RNAs subgenômico dos DENV-1.....	129
Figura 4.25 -	Análise da transfecção do RNA subgenômico do RepBACDV1 em cultura de células C6/36 e mdDCs humanas por citometria de fluxo.....	130
Figura 4.26 -	Análise da cinética de infecção dos DENV-1 recombinantes em mdDCs.....	132
Figura 4.27 -	Perfil da expressão de marcadores moleculares de ativação em mdDCs infectadas com mock vBACDV1, vBAC-NS3 <sub>435</sub> e vBAC-NS3 <sub>480</sub> .....	134

Figura 4.28 -	Expressão dos genes TLR3 e TLR7 em mdDCs infectadas com os vírus vBACDV1, vBAC-NS3 <sub>435</sub> , vBAC-NS3 <sub>480</sub> durante a cinética de infecção (hpi).....	135
Figura 4.29 -	Análise da infectividade dos DENV-1 recombinantes em mdDCs a diferentes MOIs.....	137
Figura 4.30 -	Análise da expressão de genes de resposta imune e produção de IFN tipo I em mdDCs infectadas com diferentes MOIs dos DENV-1 recombinantes.....	139
Figura 4.31 -	Análise da cinética de transfecção dos DENV-1 recombinantes em mdDCs.....	140
Figura 4.32 -	Perfil da expressão de marcadores moleculares de ativação em mdDCs tranfectadas com os RNAs subgenômicos do DENV-1 RepBACDV1, RepBAC-NS3 <sub>209</sub> , RepBAC-NS3 <sub>435</sub> e RepBAC-NS3 <sub>480</sub> .....	141
Figura 4.33 -	Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da amplificação dos genes correspondentes ao domínio do co-fator NS2B e da proteína NS3 dos DENV-1 (FGA/89, FGA/NA d1d (435Mut) e FGA/NA P6 (209/480Mut).....	143
Figura 4.34 -	Análise da expressão da proteína NS2B <sub>47</sub> NS3 <sub>209/480</sub> recombinante em <i>E. coli</i> cepa Rosetta-gami 2 (DE3).....	144
Figura 4.35 -	Localização das mutações em estudo no domínio helicase da proteína NS3.....	145
Figura 4.36 -	Eletroforese em gel de agarose 0,8% das minipreparações plasmidiais de cada clone pET28a-NS2B <sub>47</sub> NS3 confirmado por sequenciamento.....	146
Figura 4.37 -	Análise do painel de proteínas NS2B <sub>47</sub> NS3 recombinantes do DENV-1 purificadas.....	146
Figura 4.38 -	Análise da eficiência proteolítica das NS2B <sub>47</sub> NS3 do DENV-1.....	148
Figura 4.39 -	Atividade ATPase das proteínas recombinantes NS3 <sub>hel</sub> e NS2B <sub>47</sub> NS3 do DENV-1.....	149
Figura 4.40 -	Quantificação da hidrólise de ATP pela proteína NS2B <sub>47</sub> NS3.....	150

Figura 4.41 -	Atividade hidrolítica de ATP pela proteína recombinante NS2B <sub>47</sub> NS3 do DENV-1 FGA/89 estimulada por dsRNA.....	151
Figura 4.42 -	Análise comparativa da atividade ATPase das variantes das proteínas recombinantes NS2B <sub>47</sub> NS3 do DENV-1.....	152
Figura 4.43 -	Cinética de atividade helicase das variantes da proteína NS2B <sub>47</sub> NS3 do DENV-1 em substrato de dsRNA.....	153
Figura 4.44 -	Cinética de atividade helicase das variantes da proteína NS2B <sub>47</sub> NS3 do DENV-1 em substrato de dsDNA.....	154
Figura 4.45	Análise da purificação das proteínas recombinantes NS2B <sub>47</sub> NS3 <sub>209/480</sub> e NS2B <sub>47</sub> NS3 <sub>200</sub> do DENV-1 por cromatografia de afinidade e troca-iônica.....	155
Figura 4.46	Análise da purificação das proteínas recombinantes NS2B <sub>47</sub> NS3 do DENV-1 por SDS-PAGE, realizada sob condições desnaturantes em gel de poliacrilamida 13%.....	156

## LISTA DE QUADROS

	<b>Página</b>
Quadro 3.1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação por PCR do genoma completo dos DENV-1.....	77
Quadro 3.2 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos contendo as mutações de interesse para clonagem em vetor pACYF/DENV-1.....	80
Quadro 3.3 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para reação de mutagênese sítio dirigida.....	98

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
Tabela 1.1 - Painel das mutações dos DENV neuroadaptados e dos DENV provenientes dos clones infecciosos de cDNA, contendo o subconjunto de mutações selecionadas nas proteínas E e/ou NS3.....	60
Tabela 4.2 - Parâmetros cinéticos de hidrólise pela NS2B <sub>47</sub> NS3 recombinante do hexapeptídeo FRET sintético, baseado no sítio de clivagem natural do complexo da protease do DENV.....	148



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μM	-	Micromolar
4G2	-	anticorpo monoclonal anti-envelope <i>Flavivírus</i> -específico
ADE	-	fenômeno dos anticorpos potencializadores da infecção (do inglês, <i>antibody dependent-enhancement</i> )
ATP	-	adenosina trifosfato
BAC	-	cromossomo artificial de bactéria (do inglês, <i>bacterial artificial chromosome</i> )
BCIP	-	<i>5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate</i>
C	-	proteína de capsídeo
C6/36	-	linhagem celular de glândula salivar de mosquito <i>Aedes albopictus</i>
cDNA	-	DNA complementar
CG	-	complexo de Golgi
CMC	-	Carboximetilcelulose
CPE	-	efeito citopático
CS	-	sequência conservada
DC	-	célula dendrítica (do inglês, <i>dendritic cell</i> )
DCC	-	dengue com complicações
DC-SING	-	molécula não integrina captadora da molécula de adesão intercelular 3 específica de DC (do inglês <i>dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i> )
DEAH	-	sequência de aminoácidos do motivo II das RNA helicases, aspartato-glutamato-alanina-histidina
DENV	-	vírus da dengue
DENV-1-4	-	vírus da dengue sorotipos 1, 2, 3 e 4
DNA	-	ácido desoxirribonucleico
DO	-	densidade ótica
Dpi	-	dias pós inoculação ou infecção
E	-	proteína de envelope do vírus da dengue
ELISA	-	ensaio imunoenzimático
FD	-	febre da dengue

FFU	- unidade formadora de foco (do inglês, <i>focus forming unit</i> )
FFU/mL	- unidade formadora de foco por mililitro de cultura
FHD	- febre hemorrágica da dengue
FITC	- isotiocianato de fluoresceína
GenBank	- base de dados de sequências de livre acesso produzida pelo <i>National Center for Biotechnology Information</i> (NCBI)
H1	- hélice 1
H2	- hélice 2
HCV	- vírus da hepatite C
HDV-RZ	- ribozima do vírus da hepatite delta
i.c	- Intracerebral
i.p	- Intraperitonal
IFN	- Interferon
IgG	- imunoglobulina do tipo G
IgM	imunoglobulina do tipo M
IPTG	- isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo
JEV	- vírus da encefalite japonesa
Kb	- Quilobase
kDa	- Quilodaltons
KUNV	- vírus Kunjin
LC	- célula de Langerhans
MFI	- intensidade média de fluorescência (do inglês, <i>mean of fluorescence intensity</i> )
mg/mL	- miligramas por mililitro
Mock	- controle negativo de infecção
MOI	- multiplicidade de infecção (do inglês, <i>multiplicity of infection</i> )
mRNA	- RNA mensageiro
murGAPDH	- gene de expressão constitutiva gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de <i>Mus musculus</i>
NBT	- <i>nitro blue tetrazolium chloride</i>
NS	- proteína não estrutural
NTPase	- nucleosídeo trifosfatase
OMS	- organização mundial de saúde

ORF	-	quadro de leitura aberto (do inglês, <i>open read frame</i> )
pACYF/DV	-	clone infeccioso quimérico de YF e DENV-1 (cepa 17D/DENV-1 VeMir)
pBACDV1	-	clone infeccioso de DENV-1 (cepa BR/90)
PCR	-	reação em cadeia da polimerase
prM	-	proteína pré-membrana
RdRp	-	RNA polimerase dependente de RNA
RE	-	retículo endoplasmático
RNA	-	ácido ribonucleico
RT/qPCR	-	transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase em tempo real
SCD	-	síndrome do choque da dengue
SDS-PAGE	-	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SFB	-	soro fetal bovino
SNC	-	sistema nervoso central
T1	-	região transmembrana 1
T2	-	região transmembrana 2
TLR	-	receptor do tipo Toll (do inglês, <i>Toll-like receptor</i> )
UPR	-	resposta a proteínas mal enoveladas (do inglês, <i>unfolded protein response</i> )
UTR	-	região não traduzida do genoma (do inglês, <i>untranslated region</i> )
WNV	-	vírus do oeste do Nilo
YFV	-	vírus da febre amarela (do inglês, <i>yellow fever virus</i> )
α	-	Alfa
B	-	Beta

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>24</b>
1.1 Emergência do vírus da dengue.....	24
1.2 A dengue: situação atual.....	26
1.3 O agente etiológico.....	31
1.4 Estrutura e organização do genoma.....	32
1.4.1 Proteínas estruturais.....	34
1.4.2 Proteínas não estruturais.....	37
1.4.3 Ciclo de replicação viral.....	42
1.4.4 Proteína multifuncional NS3.....	46
1.5 A doença e a resposta imunológica frente à infecção pelo DENV.....	51
1.6 Marcadores moleculares de virulência.....	55
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....</b>	<b>62</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
3.1 Soluções, tampões e meios de cultura.....	65
3.2 Cepas virais.....	66
3.3 Células.....	66
3.3.1 Linhagens celulares eucarióticas.....	66
3.3.2 Cultura de células primárias humanas .....	67
3.3.3 Linhagem de células bacterianas de <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ).....	68
3.4 Animais de experimentação.....	68
3.5 Declaração de ética.....	68
3.6 Estudo da virulência dos DENV-1 recombinantes.....	69
3.6.1 Produção dos DENV-1 recombinantes.....	69
3.6.1.1 Obtenção de estoques virais.....	69
3.6.1.2 Titulação viral por imunodeteção por foco em células C6/36.....	70
3.6.1.3 Purificação viral em gradiente de sacarose.....	70
3.6.2 Cinética de infecção dos DENV-1 recombinantes <i>in vivo</i> .....	71
3.6.2.1 Quantificação do RNA viral por RT/qPCR.....	72
3.6.2.1.1 Determinação da equivalência genômica (GE).....	72

3.6.2.1.2	Análise da replicação dos DENV-1 recombinantes nos tecidos de camundongos infectados.....	73
3.6.2.1.3	Análise do padrão da expressão gênica no sistema nervoso central de camundongos infectados com vírus recombinantes e controles por PCR em tempo real.....	73
3.6.3	Cinética de infecção dos DENV-1 recombinantes <i>in vitro</i> .....	74
3.6.3.1	Infecção em linhagens celulares.....	74
3.6.3.1.1	Determinação do número de células infectadas com os DENV-1 recombinantes por citometria de fluxo.....	75
3.6.3.2	Infecção em células primárias humanas.....	75
3.6.3.2.1	Determinação de citocinas .....	76
3.6.3.2.2	Análise da replicação viral e do perfil da expressão de genes da resposta imune por qRT/PCR em células mdDCs.....	76
3.6.3.2.3	Sequenciamento nucleotídico.....	77
3.7	Ensaio de ligação viral a receptores de celulares de superfície.....	78
3.8	Construção de genomas infecciosos para o estudo das mutações nas proteínas E e NS3 do DENV-1.....	79
3.8.1	Clones quiméricos recombinantes de YF/DEN-1.....	79
3.8.1.1	Amplificação dos fragmentos contendo as mutações de interesse na proteína E.....	79
3.8.1.2	Minipreparação do genoma infeccioso pBACDV1.....	80
3.8.1.3	Clonagem e seleção dos clones recombinantes dos pACYF/DEN-1.	81
3.8.1.4	Geração dos vírus quiméricos recombinantes.....	83
3.8.1.4.1	Transcrição e transfecção dos RNAs recombinantes.....	83
3.8.1.5	Deteção de proteínas virais pela técnica de imunofluorescência.....	84
3.8.1.6	Análise comparativa da infecção dos vírus recombinantes quiméricos em células de inseto C6/36.....	84
3.8.2	Construção de replicons subgenômicos do DENV-1.....	85
3.8.2.1	Transcrição e transfecção dos RNAs subgenômicos recombinantes em cultura de células.....	86
3.9	Produção de anticorpos monoclonais.....	87
3.9.1	Obtenção da proteína recombinante NS3 helicase.....	87
3.9.2	Procedimento de imunização.....	89

3.9.3	Processamento das células para fusão.....	90
3.9.4	Triagem dos hibridomas secretores de anticorpos contra a NS3 helicase do DENV.....	91
3.9.5	Testes de estabilidade e clonagem dos hibridomas.....	92
3.10	Clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante quimérica NS2B <sub>47</sub> NS3 do DENV-1.....	93
3.10.1	Amplificação dos fragmentos de DNA através das técnicas de Reação da Transcriptase Reversa (RT) e reação em cadeia da polimerase (PCR).....	93
3.10.2	Clonagem dos fragmentos amplificados por PCR em vetor pET28a.....	95
3.10.3	Teste de expressão em sistema procarioto da proteína NS2B <sub>47</sub> NS3 recombinante.....	95
3.10.4	Geração de mutantes da proteína recombinante NS2B <sub>47</sub> NS3.....	97
3.10.5	Purificação das proteínas heterólogas expressas em sistema procarioto.....	98
3.11	Ensaio de atividade enzimática.....	99
3.11.1	Protease.....	99
3.11.2	ATPase.....	100
3.11.2.1	Preparação do substrato de RNA dupla fita.....	100
3.11.3	Helicase.....	100
3.11.3.1	Preparação do substrato dupla fita.....	100
3.11.3.2	Reação enzimática.....	101
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>102</b>
4.1	Caracterização <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> dos DENV recombinantes.....	102
4.1.1	Avaliação do RNA e progênie viral no sistema nervoso central (SNC) e medula espinhal de camundongos neonatos infectados com os DENV-1 recombinantes.....	103
4.1.2	Cinética de infecção <i>in vitro</i> .....	108
4.1.2.1	Análise comparativa do efeito citopático produzido pelos vírus recombinantes em culturas de células.....	110
4.1.2.2	Ensaio de ligação dos DENV-1 recombinantes com a célula hospedeira.....	111

4.2 Utilização de clones infecciosos quiméricos dos YFV e DENV para o estudo das mutações E <sub>402</sub> e E <sub>405</sub> .....	112
4.2.1 Inserção de mutações na proteína E do clone infeccioso quimérico de YF/DENV-1.....	113
4.2.2 Geração dos vírus quiméricos YF/DEN recombinantes.....	114
4.2.2.1 Preparação do DNA dos clones e transcrição <i>in vitro</i> .....	114
4.2.2.2 Transfecção dos RNAs recombinantes infecciosos quiméricos (YF/DEN) em células de inseto C6/36.....	115
4.2.2.3 Análise comparativa do efeito citopático produzido pelos vírus recombinantes quiméricos em culturas de células de inseto.....	116
<b>4.3</b> Produção de insumos para o estudo das mutações na proteína NS3 do DENV-1.....	118
4.3.1 Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra a proteína NS3 helicase do DENV.....	118
4.3.1.1 Obtenção da proteína recombinante NS3 helicase (NS3 <sub>hel</sub> ) do DENV-1.....	118
4.3.1.2 Imunização de camundongos.....	119
4.3.1.3 Obtenção de hibridomas secretores de anticorpos anti-NS3 <sub>hel</sub> do DENV.....	120
4.3.2 Utilização da tecnologia de replicons subgenômicos de DENV-1.....	124
4.3.2.1 Construção de replicons subgenômicos do DENV-1.....	126
4.3.2.2 Transfecção dos RNAs recombinantes sugenômicos do DENV-1 em cultura de células.....	128
4.4 Caracterização da infecção dos DENV-1 recombinantes em culturas primárias de células humanas.....	130
4.4.1 Caracterização da replicação dos RNAs subgenômicos dos DENV-1 recombinantes em culturas primárias de células humanas.....	139
4.5 Estudos de caracterização funcional da proteína NS3 do DENV-1. ....	141
4.5.1 Obtenção de proteínas recombinantes NS2B <sub>47</sub> NS3 do DENV-1.....	142
4.5.1.1 Clonagem e expressão da proteína NS3 do vírus DENV-1 em sistema procaríoto ( <i>E. coli</i> ).....	142
4.5.1.2 Obtenção de mutantes da proteína quimérica NS2B <sub>47</sub> NS3.....	144
4.5.2 Ensaio de atividade protease: análise funcional da serina protease NS2B <sub>47</sub> NS3 recombinantes do DENV-1.....	147

4.5.3 Ensaio de atividade ATPase.....	149
4.5.4 Ensaio de atividade helicase.....	152
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>158</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>177</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>179</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>180</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>206</b>
A. Artigo publicado.....	207



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Emergência do vírus da dengue

O vírus da dengue (DENV) constitui um dos patógenos humanos mais importantes dentre os vírus classificados como arbovírus. O ciclo de transmissão do DENV na Ásia e na África Ocidental inclui dois ciclos: o enzoótico, entre primatas não-humanos e mosquitos arbóreos do gênero *Aedes*, e o urbano (endêmico/epidêmico), entre mosquitos periurbanos *A. aegypti* e *A. albopictus* e primatas humanos. Nas demais regiões tropicais e subtropicais do mundo se observa apenas o ciclo urbano (VASILAKIS; WEAVER, 2008).

A origem do DENV tem sido objeto de discussão durante décadas. Vasilakis et al., 2011, descrevem em sua revisão que análises filogenéticas entre os DENV de transmissão silvática e urbana sugerem fortemente que os sorotipos endêmicos/epidêmicos do DENV emergiram de forma independente de seus ancestrais, os DENV silvestres, tornando-se evolutivamente e ecologicamente distintos. Embora a transmissão silvática do DENV se mantenha independente nas florestas do oeste da África e sudeste da Ásia, existe claras evidências que os vírus silváticos circulantes sejam hábeis a infectar e causar doença em humanos, com apresentação clínica indistinguível dos vírus endêmicos (ROBIN et al., 1980; CARDOSA, et al., 2009; FRANCO et al., 2011).

A primeira epidemia ocasionada pelo DENV foi evidenciada na África do Sul em Durban nos anos de 1926 e 1927, com mais de 40.000 pessoas acometidas, e foi atribuída ao sorotipo 1 do DENV (DENV-1) em um estudo retrospectivo (KOKERNOT; SMITHBURNK; WEINBRENM, 1956). Durante a IIª Guerra Mundial, uma série de distúrbios ecológicos e sociais no mundo contribuiu para a dispersão do mosquito vetor e do DENV do leste da África para a Ásia, oeste da Índia e, posteriormente, para as Américas. Neste mesmo período, Sabin e Schlesinger (1945) na tentativa de obter uma vacina viva atenuada contra o DENV, através de passagens seriadas em cérebro de camundongos neonatos, acabaram por realizar o primeiro isolamento do vírus, identificando o sorotipo DENV-1 (cepa Hawaii) e, posteriormente, o sorotipo DENV-2 (cepa New Guinea) (SABIN, 1952; HOTTA, 1952). Os sorotipos DENV-3 e DENV-4 foram identificados no ano de 1957, durante

a epidemia de dengue em Manila, Filipinas (HAMMOM et al., 1960). Desde então, o processo de mutações e substituições nucleotídicas no genoma dos DENV tem contribuído para a variabilidade genotípica que se observa atualmente. Análises filogenéticas atuais (NOGUEIRA et al., 2008; WEAVER; VASILAKIS, 2009), baseadas na sequência completa da proteína E agrupam as linhagens dos sorotipos do DENV em diferentes genótipos:

- As cepas de DENV-1 estão agrupadas em cinco genótipos distintos: (i) genótipo I, representa as cepas identificadas no sudeste Asiático, China e África Oriental; (ii) genótipo II, representa as cepas identificadas na Tailândia em 1950 e 1960; (iii) genótipo III, representa as cepas silvestres identificadas na Malásia; (iv) genótipo IV, representa as cepas identificadas nas Ilhas do Pacífico Ocidental e Austrália e (v) o genótipo V representa todas as cepas circulantes nas Américas, no oeste da África e algumas cepas coletadas na Ásia.

- As cepas de DENV-2 também estão agrupadas em 5 genótipos distintos: (i) genótipo asiático I, representa as cepas identificadas na Malásia e na Tailândia, e o genótipo asiático II, representa as cepas do Vietnã, China, Taiwan, Sri Lanka e Filipinas; (ii) genótipo cosmopolita, representa as cepas de vasta distribuição geográfica, incluindo as cepas identificadas na Austrália, na África Oriental e Ocidental, nas Ilhas do Pacífico e no Oceano Índico, no subcontinente indiano e no Oriente Médio; (iii) genótipo americano, representa cepas da América Latina, do Caribe, do subcontinente indiano e das Ilhas do Pacífico, circulantes nas décadas de 50 e 60; (iv) genótipo asiático/americano, representa as cepas identificadas na Tailândia e Vietnã, bem como, as cepas circulantes nas Américas nos últimos 20 anos e (v) o genótipo silvestre que representa cepas identificadas em seres humanos, mosquitos florestais ou animais sentinelas no oeste da África e sudeste da Ásia.

- As cepas de DENV-3 estão agrupadas em quatro genótipos distintos: (i) o genótipo I representa as cepas da Indonésia, Malásia, Filipinas e isolados recentes das ilhas do Pacífico Sul; (ii) genótipo II, representa as cepas da Tailândia, Vietnã e Bangladesh; (iii) genótipo III, representa as cepas do Sri Lanka, Índia, África e Samoa; (iv) genótipo IV que representa as cepas de Porto Rico, América Latina e América Central e o (v) genótipo V, representa as cepas que circularam até a década de 80 na Ásia e foram re-introduzidos na América do Sul após o ano 2000.

- As cepas de DENV-4 estão agrupadas em quatro distintos genótipos: (i) genótipo I, representa as cepas da Tailândia, Filipinas, Sri Lanka, e cepas importadas do sudeste asiático para o Japão; (ii) genótipo II, representa as cepas da Indonésia, Malásia, Tahiti, Caribe e das Américas (iii) genótipo III, representa as cepas circulantes na Tailândia que são distintas de outros isolados tailandeses e o (iv) genótipo IV que representa as cepas silvestres da Malásia.

A pressão seletiva e as altas taxas de erro da polimerase viral ( $10^{-3}$  a  $10^{-5}$ /nucleotídeos/ciclo) contribuem para a variabilidade genética observada entre os DENV, modulando a capacidade infectiva e replicativa desses vírus tanto no mosquito vetor quanto no hospedeiro vertebrado. Aliado a isso, as mudanças climáticas do mundo atual favorecem a dispersão e proliferação do mosquito vetor, aumentando o número de indivíduos vivendo em áreas de risco para infecção pelo DENV. A introdução de casos autóctones de dengue na Flórida/EUA em 2009 (CDC, 2010) e na Europa (LA RUCHE et al, 2012; SCHMIDT-CHANASIT et al., 2010) durante o verão de 2010 evidencia a existência do risco potencial de iniciação de um ciclo de transmissão em áreas *naïve*, através da introdução de cepas de DENV em locais onde o mosquito vetor do gênero *Aedes* se faz presente, podendo estabelecer, dessa forma, o desenvolvimento de novas epidemias.

## 1.2 A dengue: situação atual

A dengue é uma doença infecciosa, não contagiosa, cujo agente etiológico, o DENV, é transmitido ao hospedeiro humano através da picada de mosquitos fêmea do gênero *Aedes*.

Atualmente, a dengue constitui um grave problema de saúde pública de expansão mundial; endêmica em mais de 100 países da África, das Américas Central e do Sul, do Mediterrâneo Oriental, do sudeste da Ásia e do Pacífico Ocidental (CDC, 2012) (Figura 1) coloca em risco de infecção quase um terço da população humana mundial. A distribuição global da doença é um claro reflexo da circulação do principal mosquito vetor do gênero *Aedes* nas regiões tropicais e subtropicais do globo. Todos os quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV-1, 2, 3 e 4) são prevalentes nestas regiões, sendo responsáveis pela infecção de cerca de 80 milhões de indivíduos anualmente com aproximadamente 25 mil mortes notificadas.



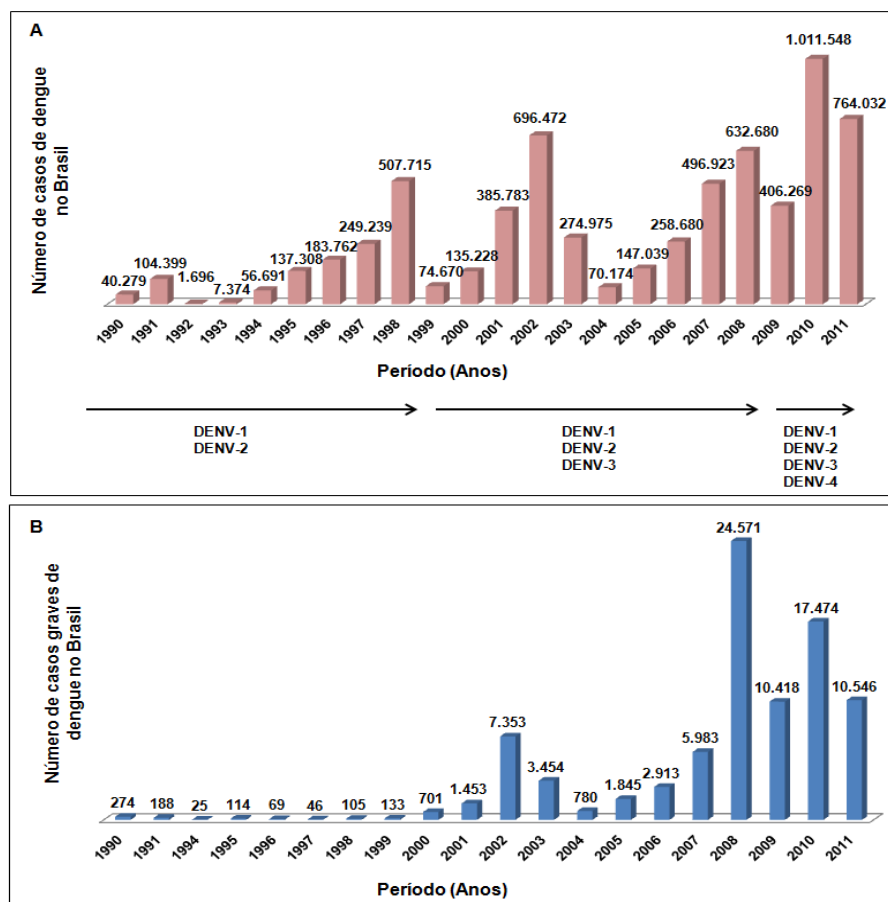
**Figura 1 - Mapa da distribuição global dos casos de dengue.** As regiões em azul representam áreas de risco de transmissão contínua, tal como definido pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (última atualização: outubro de 2012). Marcadores vermelhos indicam os países ou locais com notificação de casos de dengue. A falta de marcadores não significa que nenhuma transmissão esteja ocorrendo nas áreas demarcadas, particularmente em áreas onde o vírus da dengue tem circulação endêmica. Fonte: CDC, 2012 (<http://www.healthmap.org/dengue/index.php>).

As últimas três décadas do século XX foram de fundamental importância na definição da atual situação da dengue nas Américas. Após um período de erradicação, o DENV-1, genótipo do sudeste asiático, foi introduzido nas Américas em 1981 (KOURI et al., 1983; RICO-HESSE, 1990), ocasionando uma grande epidemia em Cuba, associado com significativo aumento na gravidade da doença (GUZMÁN, 2012). Subsequente à epidemia de 1981, período caracterizado pelo surgimento das formas hemorrágicas da doença e co-circulação de diferentes sorotipos (DENV-1, 2 e 4), outras epidemias foram reportadas nas Américas.

No Brasil, a primeira epidemia de dengue foi registrada em 1986, ocasionada pelo DENV-1. A introdução do DENV-2 entre os anos de 1990 e 1991 causou a primeira epidemia de FHD, com 462 casos de FHD, dos quais, oito evoluíram para o óbito (PAHO, 1992). Desde então, o número de casos de dengue vem crescendo de forma alarmante no Brasil. No período de 1990 a 2011, 6.642.936 casos de dengue foram notificados, com mais de 431.194 casos registrados apenas no primeiro semestre de 2012 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; CARNEIRO et al., 2012). Neste

período, a região Sudeste apresentou o maior número de casos (182.895 casos; 42,4%), seguida da região Nordeste (168.935 casos; 39,2%), Centro-Oeste (43.228 casos; 10,0%); Norte (31.927 casos; 7,4%), e Sul (4.209 casos; 1,0%).

Nas últimas décadas tem se observado uma diminuição dos intervalos entre as epidemias, variando de um a três anos, normalmente associado à introdução de um novo sorotipo e aumento do número de casos das formas graves da doença (Figura 1.1).



**Figura 1.1 – Número de casos de dengue reportados no Brasil entre os anos de 1990 e 2011. A.** Casos de dengue confirmados. A circulação dos sorotipos do DENV está indicada. **B.** Casos graves de dengue confirmados. Os casos graves correspondem ao somatório dos casos confirmados com classificação final de febre hemorrágica da dengue (FHD) e dengue com complicações (DCC) (Dados obtidos do Ministério da Saúde, 2012).

A grande incidência de infecção pelo DENV demonstra que medidas de controle devem ser tomadas imediatamente para a solução desse grave problema de saúde pública de importância mundial. Grandes esforços têm sido realizados na tentativa de desenvolver métodos eficazes de profilaxia, imunoprofilaxia e terapias antivirais eficazes no combate a dengue. Baseado nestas premissas, uma série de

vacinas candidatas estão sendo desenvolvidas e, dentre elas, pode-se elencar as vacinas de vírus vivo atenuado, vírus inativado ou não vivo, proteína recombinante, vacinas de DNA e vacinas quiméricas recombinantes provenientes de clones infecciosos de cDNA (GUIRAKHOO et al. 2002; HUANG et al., 2003). No entanto, o desenvolvimento de uma vacina eficaz esbarra em algumas limitações, tais como: (i) a necessidade de uma vacina tetravalente que imunize simultaneamente o indivíduo contra todos os sorotipos do DENV, a fim de reduzir o risco de uma exacerbação da infecção por fenômenos imunológicos, fenômeno também observado em infecções sequenciais com outros sorotipos do DENV (HALSTEAD; NIMMANNITYA; COHEN, 1970); (ii) o fenômeno da interferência viral entre diferentes sorotipos que compõem a mistura da vacina final (HALSTEAD; O'ROURKE, 1977; MALAVIGE et al., 2004; WHITEHEAD et al., 2007); (iii) a recombinação intra-genotípica (HOLMES; WOROBEY; RAMBAUT, 1999) e a (iv) falta de um modelo animal capaz de refletir as formas clínicas graves da doença em humanos (ZOMPI; HARRIS, 2012).

Várias das abordagens citadas acima para o desenvolvimento eficaz de uma vacina contra a dengue têm demonstrado eficácia protetora em modelos de infecção do DENV, mas pouco tem sido mostrado quanto à segurança e a imunogenicidade em estudos de fase clínica inicial. A vacina tetravalente de vírus vivo quimérico atenuado (ChimeriVax, Sanofi Pasteur), proveniente do clone infeccioso de febre amarela (YFV do inglês, *Yellow Fever Virus*) 17D vacinal combinado com as proteínas estruturais dos quatro sorotipos do DENV (denominada de CYD-TDV), apresentou resultados promissores em estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*, induzindo estimulação controlada em células dendríticas humanas (DC) e significativa resposta imunológica em macacos (GUY et al., 2011). Os dados do desafio clínico de fase 2b da vacina CYD-TDV realizado em 4.002 crianças tailandesas foram publicados recentemente (SABCHAREON et al., 2012). Após três doses, a vacina candidata apresentou 70% de eficácia contra os DENV-1, 3 e 4. No entanto, não foi capaz de conferir uma resposta imune protetora contra o DENV-2 circulante na Ásia (dominância do genótipo viral asiático 1), diminuindo a eficácia geral da vacina. Os mecanismos envolvidos precisam ainda ser determinados, mas os autores especulam que a ineficácia da vacina tetravalente poderia ser atribuída ao maior *fitness* viral do DENV-2 circulante em relação ao DENV-2 do genótipo americano/asiático, genótipo selecionado para a confecção da CYD-TDV (cepa

PUO-218). As cepas dos genótipos asiático 1 e americano/asiático apresentam 73 diferenças de aminoácidos localizadas nas proteínas E, NS1, NS3, NS2A, NS4B e NS5 que podem estar implicadas no aumento dos níveis de viremia em humanos (VU et al., 2010).

O avanço nos estudos de caracterização estrutural de proteínas dos flavivírus tem possibilitado a identificação de um número crescente de potenciais alvos para estratégias antivirais, incluindo as proteínas virais de envelope, capsídeo, polimerase, helicase e protease, bem como, proteínas celulares-alvo envolvidas em importantes processos durante o ciclo viral. Além dessas, Xie et al., (2011) demonstraram que a proteína NS4B apesar de não apresentar atividade enzimática também constitui um importante alvo para terapia antiviral. Dentre as etapas do ciclo viral que poderiam sofrer intervenção, podemos destacar a ligação ao receptor (ALEN et al., 2009), internalização da partícula viral na célula hospedeira (LEE et al., 2008), mudanças conformacionais na proteína E, fusão com a membrana do endossomo, capeamento do RNA viral (DONG; ZHANG; SHI, 2008), clivagem da poliproteína viral (CHANPRAPAPH et al., 2005; YIN et al., 2006), replicação (KIAT et al., 2006) e morfogênese viral (COURAGEOT et al., 2000). Além disso, a infecção pelo DENV promove um grande número de respostas nas células e tecido do hospedeiro que exibem um potencial efeito inibitório na proliferação viral (CHU; YANG, 2007). Anticorpos monoclonais (LOK et al., 2008; OLIPHANT et al., 2005) e técnicas envolvendo o uso de replicons subgenômicos do DENV e RNA de interferência (iRNA) (NG et al., 2007) constituem importantes ferramentas para a investigação de alvos capazes de inibir a replicação viral ou a interação de proteínas-chave envolvidas em etapas críticas do ciclo viral, podendo representar uma interessante estratégia na terapêutica da dengue.

No entanto, para o sucesso da implementação futura de terapias antivirais contra o DENV torna-se fundamental o uso de métodos de diagnóstico rápidos e eficazes para determinação da infecção, pois nos estágios iniciais a doença é frequentemente confundida com outras doenças tropicais, o que pode levar ao tratamento inadequado. Acredita-se que o desenvolvimento de uma droga eficaz e segura contra o DENV, se administrada no curso inicial da infecção, não deva apenas reduzir os riscos de desenvolvimento de formas graves, mas também minimizar a possibilidade de potenciais eventos epidêmicos.

Uma alternativa para controle/prevenção da doença consiste na adoção de metodologias eficazes para o combate ao mosquito vetor. No entanto trata-se de uma estratégia pouco factível, visto que o mosquito vetor do gênero *Aedes* está completamente adaptado e prospera eficientemente em ambientes urbanos e periurbanos. Nos próximos anos, se aprovado pelos comitês de biossegurança e ética, um novo tipo de *A. aegypti* transgênico estéril (linhagem OX513A) poderá ser liberado no meio ambiente e utilizado como controle biológico (BARGIELOWSKI et al., 2011). Uma nova abordagem para o controle biológico de doenças transmitidas por mosquitos utilizando a bactéria endossimbiótica *Wolbachia pipientis*, foi recentemente proposta. Moreira et al. (2009) demonstraram que a transfecção de *Wolbachia* em mosquitos *A. aegypti* e *Anopheles* é capaz de inibir a replicação do DENV, do vírus da febre Chikungunya e do parasita da malária de aves *Plasmodium gallinaceum* em seus respectivos hospedeiros. No entanto, o mesmo efeito não foi observado em *A. albopictus*, que naturalmente é infectado por *Wolbachia* (LU; BIAN; PAN, 2012). Dessa forma, estudos adicionais serão necessários para melhor compreender os mecanismos pelo qual a bactéria medeia a interferência viral e disseminação do mosquito vetor, para uma futura utilização de *Wolbachia* como estratégia de controle da transmissão de flavivírus.

Existem ainda diversas lacunas relacionadas à biologia viral e os mecanismos envolvidos na patogênese da doença; um melhor entendimento sobre as interações entre vetor, vírus e hospedeiro humano poderá auxiliar no desenvolvimento de medidas mais efetivas para o monitoramento e controle da dengue.

### 1.3 O agente etiológico

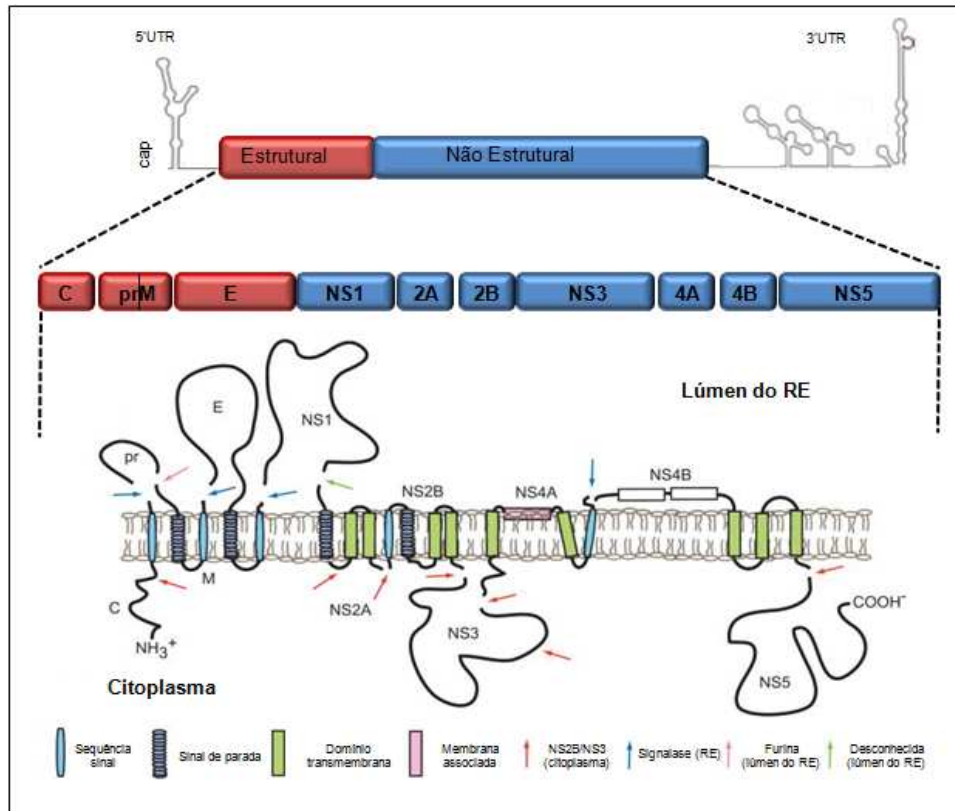
O DENV pertence ao grupo dos arbovírus que inclui obrigatoriamente, vetores artrópodes em seu ciclo de vida. Como a maioria dos arbovírus, o DENV utiliza no seu ciclo de transmissão insetos como vetores e vertebrados como hospedeiros (FLINT et al., 2004). DENV está classificado como um importante membro do gênero *Flavivírus* dentro da família *Flaviviridae*. A família *Flaviviridae*, família de pequenos vírus RNA envelopados, é composta por 58 vírus, alguns de grande importância médica e veterinária, agrupados em três gêneros: *Hepacivirus* (vírus protótipo: vírus da hepatite C (HCV), *Pestivirus* (vírus protótipo: vírus da diarreia viral bovina (BVD) e



*Flavivirus* (vírus protótipo: YFV). Além desses, dois grupos de vírus (GB vírus A e GB vírus B), têm sido reconhecidos como “vírus não atribuídos” da família *Flaviviridae*, devido à similaridade genética e organização genômica (ICTV, 2011).

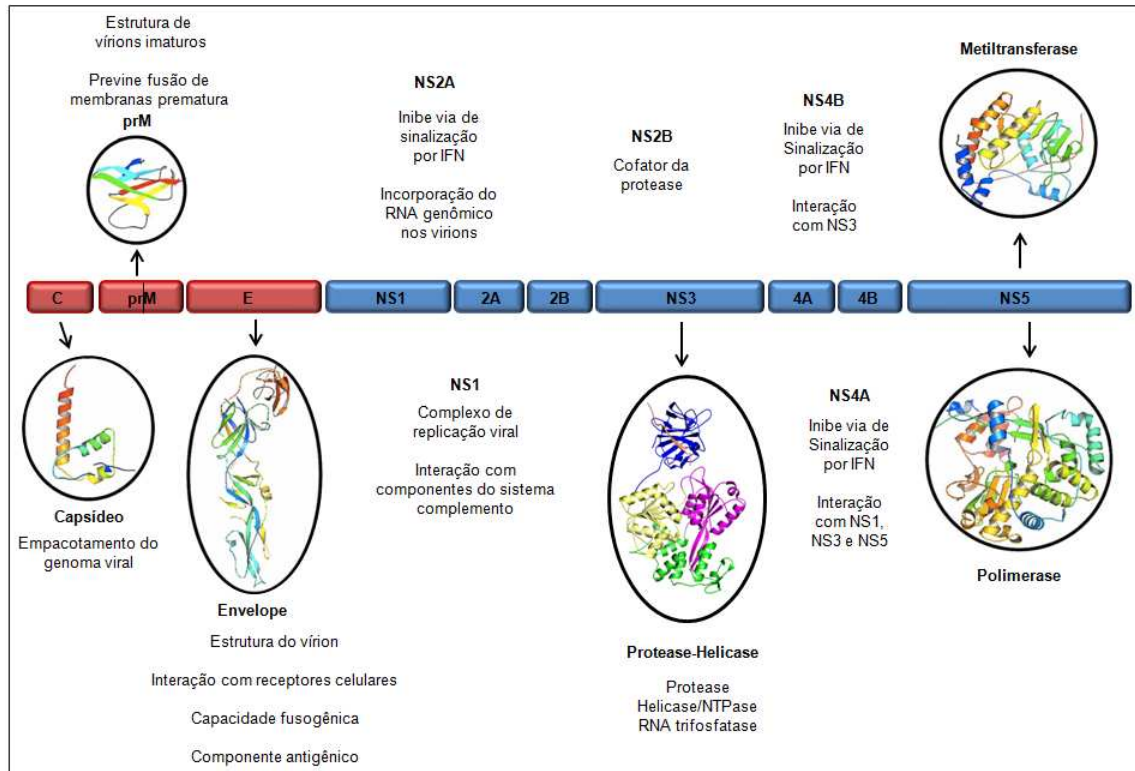
#### **1.4 Estrutura e organização do genoma**

Os vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* apresentam um genoma de organização relativamente simples, composto por uma fita simples de RNA de polaridade positiva de aproximadamente 11 Kb que codifica uma única fase de leitura aberta (ORF do inglês, *open read frame*) e dirige a síntese de uma poliproteína precursora de aproximadamente 3.400 aminoácidos. A poliproteína viral é processada co- e pós-traducionalmente por proteases da célula hospedeira (signalases/cisteína proteinases e furina) e uma protease codificada pelo próprio vírus (serina proteinase) para gerar as proteínas estruturais C (proteína de capsídeo), prM (precursora da proteína M) e E (proteína de envelope) e as proteínas não estruturais (NS) NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5 (Figura 1.2) (LINDENBACH; RICE, 2003). O correto processamento dessas proteínas é essencial para a replicação viral e montagem do vírion infeccioso, que é composto pelas proteínas estruturais C, M e E e por uma única molécula de RNA infeccioso (CHAMBERS et al., 1990; RICE, 1996).



**Figura 1.2 - Organização esquemática do genoma e da poliproteína viral.** O RNA viral de fita positiva (aproximadamente 11 Kb) apresenta duas regiões não traduzidas 5' e 3', envolvidas na replicação e tradução do genoma, sendo que a região 5' apresenta uma estrutura em cap. O RNA viral é traduzido em uma única poliproteína que é processada por proteases viral e da célula hospedeira (indicada pelas setas). Adaptado de Perera e Kuhn (2008).

As proteínas estruturais estão envolvidas principalmente na entrada e montagem da partícula viral e as proteínas NS estão envolvidas na replicação, montagem da partícula viral (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007), rearranjo das membranas internas, recrutamento e subversão de fatores celulares (BOWIE; UNTERHOLZNER, 2008) que contribuem para promover o processo replicativo e a evasão da resposta imunológica (ALCARAZ-ESTRADA; YOCUPICIO-MONROY; DEL ANGEL, 2010). Até o momento apenas a estrutura cristalográfica das proteínas C (MA et al., 2004), prM (LI et al., 2008) E (MODIS et al., 2004), NS3 (LUO et al., 2008) e NS5 (EGLOFF et al., 2002; YAP et al., 2007) dos DENV foram resolvidas (Figura 1.3).



**Figura 1.3 - Proteínas codificadas pelo genoma do DENV.** As caixas vermelhas e azuis representam proteínas estruturais e não estruturais, respectivamente. As proteínas estruturais formam o vírion e a maioria das proteínas não estruturais são requeridas para a replicação e morfogênese viral, outras propriedades conhecidas estão indicadas. As estruturas das proteínas C, prM, E, NS3 e NS5 estão depositadas no banco de dados de proteínas (PDB) sob os seguintes identificadores: 1R6R, 3C5X, 1OKE, 2VBC, 2P1D, 2J7U, respectivamente.

#### 1.4.1 Proteínas estruturais

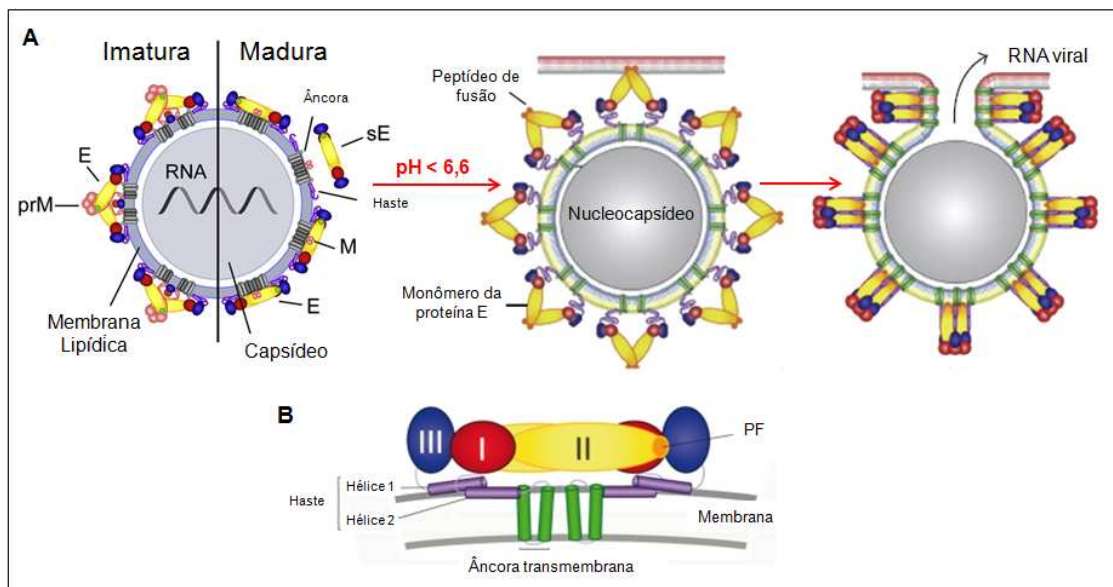
A partícula viral madura apresenta estrutura esférica de aproximadamente 50 nm e é composta pelas proteínas M, por dímeros da proteína E e por um capsídeo ribonucleotídeo icosaédrico associado à membrana lipídica derivada da célula hospedeira. A disposição das proteínas de superfície na partícula viral imatura é distinta daquela observada na partícula viral madura, que é composta por 60 trímeros assimétricos de heterodímeros da prM-E enquanto a partícula viral madura é composta por 90 dímeros da proteína E que estão associados com a proteína M na proporção 1:1 (Figura 1.4) (ZHANG et al., 2003). A formação da proteína M através da clivagem dos 91 resíduos de aminoácidos N-terminal da proteína precursora prM, pela protease tipo furina da célula hospedeira, constitui um evento crucial na fase final de morfogênese do vírion. A eficiência deste evento resulta na organização da estrutura de superfície do vírion e no consequente aumento da infectividade do vírus (ZHANG et al., 2003).

A proteína C, com peso molecular de 12 kDa, apresenta caráter altamente básico devido a presença de 26 resíduos de arginina ou lisina e apenas 3 resíduos carregados negativamente. Múltiplas cópias desta proteína associam-se ao RNA viral para formação do nucleocapsídeo, provavelmente pela interação com resíduos básicos não estruturados concentrados nas extremidades N e C-terminal da proteína. Além desse, a proteína C possui um domínio central composto por 21 resíduos de aminoácidos hidrofóbicos que interagem com a bicamada lipídica derivada da célula hospedeira e são requeridos para a maturação e montagem da partícula viral (MARKOFF; FALGOUT; CHANG, 1997; JONES et al., 2003). As proteínas E e M também encontram-se ancoradas à membrana viral através da interação com os domínios transmembrânicos presentes na porção C-terminal das proteínas.

A glicoproteína E é o principal componente antigênico do virion, conferindo resposta imune protetora por elicitar a produção de anticorpos neutralizantes, além de interagir com os receptores de superfície da célula hospedeira, determinando o tropismo e mediando os processos de adsorção, penetração e fusão da partícula viral com a membrana da célula hospedeira (CHAMBERS et al., 1990). Evidências indicam que a proteína E desempenha um papel na patogenicidade de diversos flavivírus não apenas pela definição do tropismo celular como também por modular a internalização do virion na célula hospedeira (GOLLINS; PORTERFIELD, 1986; REY, 2003; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

O ectodomínio da proteína E apresenta três domínios de estrutura bem definida (I a III) que foram resolvidos por cristalografia de raios-X (REY et al., 1995; MODIS et al., 2004). O domínio III é o principal domínio antigênico da proteína, interage com o receptor da célula hospedeira e participa de todos os eventos que envolvem a proteína E. O domínio II está envolvido na dimerização da proteína e contém em sua extremidade distal um peptídeo de fusão composto por 12 aminoácidos hidrofóbicos altamente conservados (resíduos 98 a 100) (ALLISON et al., 2001). Estes dois domínios estão ligados através do domínio N-terminal I, estruturalmente organizado na porção central da proteína. As mudanças estruturais no complexo E que ocorrem durante o curso da maturação do virion e fusão envolvem a rotação dos três domínios. Os 100 resíduos de aminoácidos da região C-terminal da proteína E (resíduos 395-495) que compõem a região tronco (do

inglês, *stem-region*) estão ausentes na estrutura cristalográfica da proteína, mas presentes em mapas de densidade utilizando crio-microscopia eletrônica (ZHANG et al., 2003; KLEIN, CHOI, HARRISON, 2013). A porção anterior da *stem-region* consiste de duas hélices H1 (resíduos 401-413) e H2 (resíduos 431-449), conectadas por uma sequência de resíduos de aminoácido altamente conservada (CS). A região transmembrana da *stem-region* é constituída por um par de estruturas antiparalelas em *coiled-coils*, T1 (resíduos 450-471) e T2 (resíduos 473-496) (ALLISON et al, 1999). Essa região possibilita a ancoragem da proteína E na bicamada lipídica derivada da célula hospedeira, além de desempenhar um papel crucial na trimerização da proteína E ativada por baixo pH, durante o processo de fusão com a célula hospedeira (Figura 1.4).



**Figura 1.4 – Representação esquemática da partícula dos flavivírus durante o processo de maturação e fusão da partícula viral.** **A.** Esquerda: virion imaturo; direita: virion maduro. sE indica a forma solúvel da proteína E, sem a região denominada de âncora-haste. A redução do pH no endossomo ocasiona uma mudança conformacional na proteína E do víron maduro, expondo o peptídeo de fusão presente no domínio II e ocasionando o rearranjo do dímero da proteína E em monômeros. Em seguida, o peptídeo de fusão insere-se na camada de hidrocarbonetos da membrana da célula hospedeira, promovendo a fusão entre as membranas com conseqüente liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula hospedeira. **B.** Vista lateral de um homodímero da proteína E. Os domínios I, II e III e o peptídeo de fusão (PF) estão representados nas cores vermelho, amarelo, azul e laranja, respectivamente. A haste está representada em roxo, a âncora transmembrana em verde e a membrana viral em cinza. Adaptado de Kiermayr; Stiasny; Heinz (2009), Alen; Schols (2012) e Heinz; Stiasny (2012).

A glicoproteína prM é uma proteína de aproximadamente 18 kDa que facilita o enovelamento das proteína E e regula o seu estado oligomérico para impedir a exposição prematura do peptídeo de fusão durante o transporte da partícula viral

imatura pelo ambiente ácido (~5.8-6.0) da rede do *trans*-Golgi. Recentemente a estrutura atômica da prM fusionada ao ectodomínio da proteína E foi resolvida em pH 5.5 e 7.0 e nenhuma diferença estrutural significativa foi observada entre os diferentes tratamentos, indicando que o pH não afeta a estrutura terciária da proteína (LI et al., 2008). Durante o processo de maturação da partícula viral, a proteína prM é clivada por proteases tipo furina da célula hospedeira, liberando a porção N-terminal da prM (91 resíduos de aminoácidos) e mantendo apenas o ectodomínio C-terminal (resíduos 92 a 130) e a região transmembrana (resíduos 131 a 166) da proteína M no virion. Funções biológicas não têm sido atribuídas à proteína M, no entanto, alguns estudos demonstram que o ectodomínio intraluminal desta proteína apresenta propriedades proapoptóticas em células Neuro 2a e HepG2 (CATTEAU et al. 2003) e é capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes (KUHN et al., 2002; DEJNIRATTISAI et al., 2010).

#### **1.4.2 Proteínas não estruturais**

A primeira proteína NS a ser produzida durante a tradução policistrônica do RNA viral é a proteína NS1. A glicoproteína NS1 de aproximadamente 48 kDa é essencial para a viabilidade viral. Durante a infecção da célula hospedeira, a NS1 é encontrada associada ao retículo endoplasmático (RE), onde desempenha seu papel na replicação do vírus, ou pode ser externalizada para a superfície celular sob a forma hexamérica (FLAMAND et al., 1999), onde pode desencadear vias de sinalização específicas e contribuir para a patogenia da infecção (CHATURVEDI et al., 2005). O papel da proteína NS1 na replicação viral e sua correlação com a gravidade da doença não está completamente elucidada. No entanto, alguns estudos sugerem o envolvimento da NS1 na formação do complexo imune pela ativação do complemento (AVIRUTNAN et al, 2006), na indução da produção de auto-anticorpos que interagem com proteínas de matriz do hospedeiro, induzindo disfunção plaquetária (FALCONAR, 1997; SUN et al., 2007), na citólise de células endoteliais mediada pelo sistema do complemento associado a anticorpos (LIN et al 2003) e no aumento da infecção viral *in vitro* e *in vivo* (ALCON-LEPODER et al., 2005). Além disso, estudos de imunolocalização por criofratura e imunofluorescência confocal em células C6/36 e Vero identificaram a associação da NS1 com dsRNA

(MACKENZIE; JONES; YOUNG, 1996), sugerindo potencial papel na replicação. A inibição do primeiro sítio de glicosilação da NS1 (Asn 130) ou de ambos os sítios (Asn130 e Asn208) é capaz de reduzir a replicação do RNA do DENV e o seu crescimento em cultura de células (TAJIMA; TAKASAKI; KURANE, 2008), bem como, diminuir a neurovirulência do YFV em modelo murino (MUYLEAERT et al., 1996). Altos níveis da proteína NS1 e de anticorpos dirigidos contra a proteína são detectados no plasma de paciente durante a fase de inicial da doença (LIBRATY et al., 2002) e, por esta razão, constituem um bom marcador de diagnóstico precoce (LIMA et al. 2010).

As pequenas proteínas hidrofóbicas dos flavivírus (NS2A, NS4A, NS4B) permanecem ainda pouco caracterizadas. Estudos sugerem que a proteína NS2A (22 kDa) é necessária para a montagem de novas partículas virais. Mutações na proteína NS2A do YFV e Kunjin vírus (KUNV) interferem na montagem e secreção da partícula viral pela célula hospedeira (LIU; CHEN; KHROMYKH, 2003; KUMMERER; RICE, 2002). Além disso, a proteína interage com a região não traduzida do genoma viral (UTR do inglês, *untranslated region*) e serve como ponte para a interação das proteínas NS5 e NS3 (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

A proteína NS4A de aproximadamente 16 kDa é uma proteína associada a membrana do RE composta uma região N-terminal citosólica e quatro hélices transmembrana. Essa proteína co-localiza com o RNA viral e com as proteínas NS1, NS3 e NS5, sugerindo que a NS4A constitui um local de ancoragem para o complexo de replicação (LINDENBACH; THIEL; RICE et al., 2007; WESTAWAY et al., 2003) além de induzir autofagia, protegendo a célula de apoptose e aumentando a replicação viral (MCLEAN et al., 2011).

A NS4B é uma pequena proteína (27 kDa) altamente hidrofóbica com cinco domínios transmembrana. Durante a tradução localiza-se na região perinuclear da célula hospedeira, no entanto, há fortes evidências que a NS4B pode ser translocada para o núcleo das células infectadas (WESTAWAY et al., 1997). Estudos sugerem que a NS4B desempenha importante papel na replicação e patogênese dos flavivírus (PUIG-BASAGOITI et al., 2007; WICKER et al., 2012), interagindo com componentes do complexo de replicação e dsRNA viral (MILLER; SPARACIO; BARTENSCHLAGER, 2006). Umareddy et al. 2006, demonstraram que a associação da NS4B com a NS3 estimula a atividade helicase da NS3 *in vitro*, por

auxiliar na dissociação da NS3 da simples fita de RNA. Neste mesmo trabalho, demonstraram que a interação física entre a NS4B e NS3 do DENV-4 é desfeita pela presença de uma única mutação na posição 101 da NS4B (P101L). Também tem sido relatado o envolvimento desta proteína na inibição da cascata de sinalização a nível nuclear da fosforilação de STAT (MUNÓZ-JORDÁN et al. 2003; MORRISON et al., 2012).

Estudos recentes demonstram que a replicação viral e a expressão de proteínas virais hidrofóbicas, tais como a NS2A, NS4A e NS4B, implicadas na regulação da sinalização da resposta ao estresse, induzido pelo acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE (*unfolded protein response* - UPR), podem inibir a via de sinalização JAK-STAT em resposta ao interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) e beneficiar a replicação (AMBROSE; MACKENZIE, 2011).

A pequena proteína NS2B (14 kDa) é uma proteína integral de membrana que apresenta três domínios hidrofóbicos que flanqueiam uma região hidrofílica conservada, composta por 47 resíduos de aminoácidos (FALGOUT et al., 1991). O peptídeo central hidrofílico se intercala no domínio protease da NS3, formando um complexo estável, necessário para a eficiente atividade catalítica da proteína (ERBEL et al., 2006). Diversas estratégias foram realizadas para demonstrar a atividade da proteína NS2B como cofator da atividade protease da NS3. Mais recentemente, Leung et al. (2001) demonstraram que a sequência de resíduos de aminoácidos entre o cofator, região hidrofílica da NS2B, e a região N-terminal da proteína NS3 poderia ser substituído por um *linker* flexível de Gly4-Ser-Gly4 para expressão funcional do complexo NS2BNS3 em *E. coli*. Em contraste, a expressão da proteína NS3 sem o cofator exibe agregação inespecífica e baixa solubilidade além de apresentar baixa atividade proteolítica *in vitro*. Essa metodologia tem sido utilizada por diversos grupos em uma variedade de estudos bioquímicos, mutagênicos e estruturais para avaliar a especificidade a substratos e determinar o perfil de potenciais inibidores de protease dos flavivírus (LI et al.; 2005; GOUVEA et al., 2007; ASSENBERG et al., 2009; XU et al., 2012).

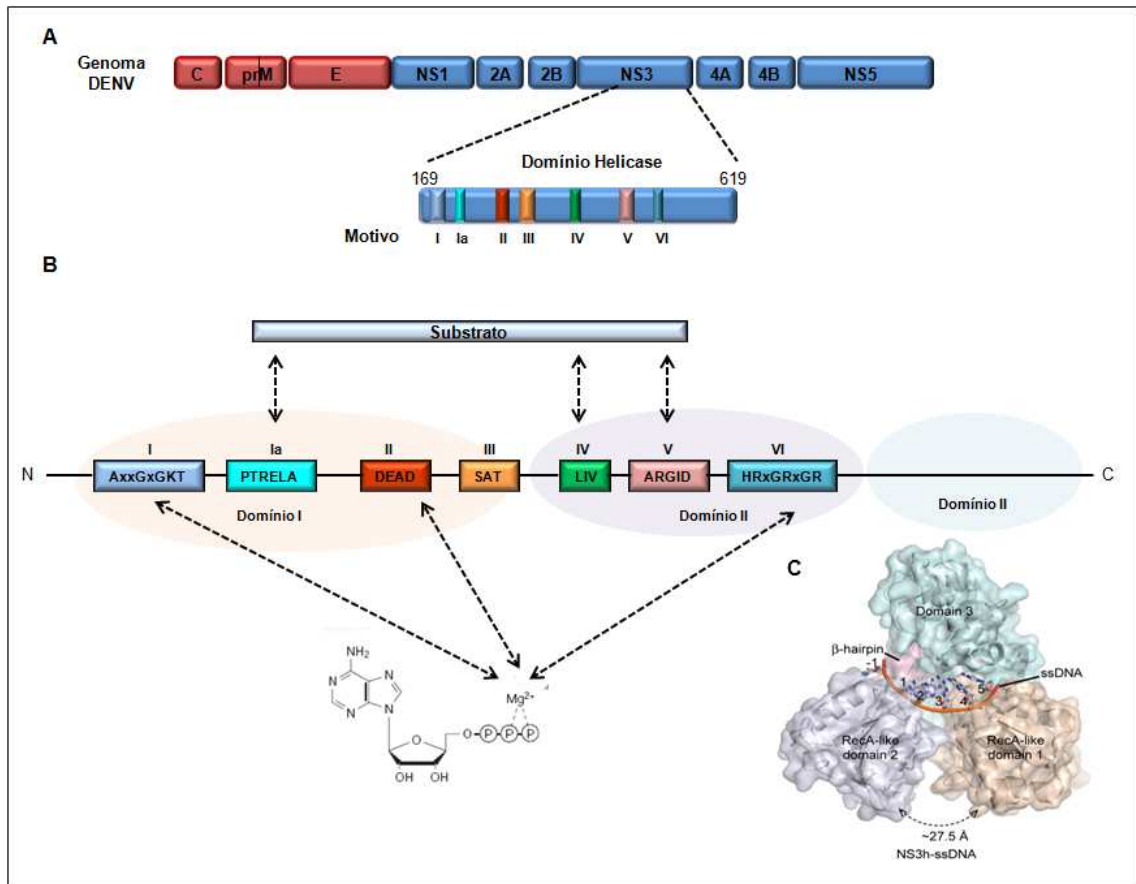
A proteína NS3 (69 kDa) é a segunda maior proteína dos flavivírus e também a segunda mais conservada entre os membros deste gênero e desempenha um papel essencial no processamento da poliproteína e replicação do RNA viral. A NS3 é uma proteína multifuncional composta por um domínio serino protease



quimotripsina-*like* na porção N-terminal, um domínio RNA trifosfatase envolvida com o processo de capeamento do RNA viral e um domínio RNA helicase com atividade nucleosídeo trifosfatase (NTPase), ambos na porção C-terminal da proteína (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). Além das atividades enzimáticas, a proteína NS3 tem sido implicada na formação do envelope viral (YAMSHCHIKOV; COMPANS, 1995) e montagem da partícula viral (LIU; CHEN; KHROMYKH, 2003). Durante a infecção na célula hospedeira, a NS3 encontra-se associada às membranas intracelulares, associação que ocorre provavelmente via interação com a proteína transmembrana NS2B, que atua como co-fator enzimático da protease viral (LEUNG et al., 2001; LUO et al., 2010).

O domínio RNA helicase/NTPase da NS3 (aproximadamente 450 aminoácidos) apresenta significativa homologia com membros da subfamília DExH-box de RNA helicases (assim denominada pela sequência consenso do motivo II, também conhecido como motivo Walker B) da superfamília 2 das helicase (SF2) (CHOW; SEAH; CHAN 1993; KADARÉ; HAENNI, 1997). A proteína apresenta sete motivos conservados (I, Ia, II, III, IV, V e VI) organizados em um arranjo tridimensional no cerne da proteína que contribuem, durante a replicação viral, para a ligação e hidrólise de ATP, bem como, para a ligação e separação da dupla fita de RNA (dsRNA) na direção 3'→5' (Figura 1.5) (XU et al., 2005). As proteínas da família DExH geralmente atuam como translocases dependente de ATP e requerem uma região de simples fita de DNA ou RNA para promover o deslocamento das fitas pareadas e, eventualmente, de proteínas associadas (STEIMER; KLOSTERMEIER, 2012). Ao contrário de outros membros da SF2, a NS3 é composta por três domínios: dois domínios globulares *RecA-like*; domínios 1 (resíduos 181-326) e 2 (resíduos 327-481), característico da família das helicase, e um terceiro domínio  $\alpha$  hélice (resíduos 482-618) (Figura 1.5). O domínio 3, embora não apresente motivos canônicos, medeia importantes interações com o substrato de RNA, proteínas virais e da célula hospedeira. Como referido, o sítio de acesso ao RNA na fenda da proteína está localizado entre a  $\alpha$ -hélice 2 do domínio II, o  $\beta$ -harpin saliente do domínio II e a  $\alpha$ -hélice hélice 6 do domínio III (XU et al, 2005). Embora estudos recentes tenham revelado detalhes sobre mudanças conformacionais da proteína na presença e ausência de substratos e a determinação de alguns potenciais alvos de interação (NOBLE et al, 2012; YIN et al., 2006; DENG et al., 2012), pouco se

conhece sobre os mecanismos fisiológicos envolvidos na replicação e montagem da partícula viral.



**Figura 1.5 - Representação da arquitetura e motivos conservados da proteína NS3 DExH helicase dos flavivírus.** **A.** Organização da poliproteína viral; destaque para os sete motivos conservados do domínio helicase. **B.** Motivos conservados da proteína. Os sete motivos medeiam a ligação e a hidrólise de ATP e ligação ao RNA, necessários para o ciclo de atividade helicase. **C.** Estrutura cristalina do complexo NS3 helicase de HCV e DNA fita simples (GU; RICE, 2010). Em **B** e **C** os domínios I, II e III da proteína estão representados nas cores rosa, roxo e azul, respectivamente. Adaptado de Rocak; Linder (2004).

A região N-terminal da proteína NS3 (entre os resíduos 160 e 185) é compartilhada por duas atividades enzimáticas distintas, a protease e helicase/NTPase (LI, 1999). Conforme mencionado anteriormente, a atividade catalítica de protease da NS3 requer a formação de um complexo não covalente com o segmento hidrofílico central (47 resíduos) do cofator NS2B (FALGOUT et al., 1991). A serino protease viral é responsável por clivagens em *cis* e em *trans* da poliproteína viral nas junções NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, e NS4B/NS5 (GORBALENYA et al., 1989). Clivagens adicionais internas nas proteínas C, NS2A, NS4A e na própria NS3 estão descritas na literatura (VALLE; FALGOUT, 1998). A protease do DENV

apresenta uma tríade catalítica composta pelos aminoácidos His51, Asp75 e Ser135 (CHAMBERS et al., 1990) e tem preferência por substratos contendo aminoácidos básicos (Arg ou Lys) nas posições P1 e P2, seguidos por aminoácidos de cadeia lateral pequena (Gly, Ser, or Ala) na posição P1' (WESTAWAY et al., 2003). A protease cliva no sítio P2P1↓P1'.

A NS3 helicase dos flavivírus também exibe atividade de RNA trifosfatase (RTPase) que catalisa a clivagem do  $\gamma$ - $\beta$  fosfato do RNA 5' trifosforilado, que constitui a primeira das três reações enzimáticas de capeamento do RNA viral. Estudos sugerem que a RTPase requer o motivo Walker B do núcleo catalítico helicase/NTPase para a hidrólise da ligação fosfodiéster (BENARROCH et al., 2004)

A proteína NS5 é uma proteína de 105 kDa com atividade de RNA guanililtransferase, metiltransferase (MTase) e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), requeridas para o capeamento e síntese do genoma viral, respectivamente. A proteína NS5 apresenta resíduos de aminoácidos altamente conservados (320 a 368) implicados na interação com a proteína NS3 e com proteínas importinas e exportinas (JOHANSSON et al., 2001; PRYOR et al., 2007). No entanto, o papel da NS5 no núcleo é ainda desconhecido.

Alguns estudos utilizando metodologias *high-throughput* têm sugerido uma série de possíveis interações entre proteínas da célula hospedeira e as proteínas NS5 e NS3, evidenciando o papel destas proteínas na replicação e maturação viral, na interação com proteínas de tráfico intracelular de vesículas, na evasão da resposta imune e interferência na homeostase celular em benefício da replicação do genoma viral (LE BRETON et al., 2011; AMIT et al., 2009; MORRISON et al., 2012).

### **1.4.3 Ciclo de replicação viral**

No hospedeiro humano o DENV pode infectar produtivamente uma grande variedade de células, tais como monócitos, macrófagos, linfócitos B e T, células dendríticas (DCs), células endoteliais, hepatócitos e células neuronais, além de uma numerosa quantidade de linhagens celulares utilizadas para propagação viral.

As DCs imaturas e as células de Langerhans (LCs), residentes na epiderme, apresentam moléculas de superfície celular que são reconhecidas pela proteína E do DENV, tal como a molécula não integrina captadora da molécula de adesão

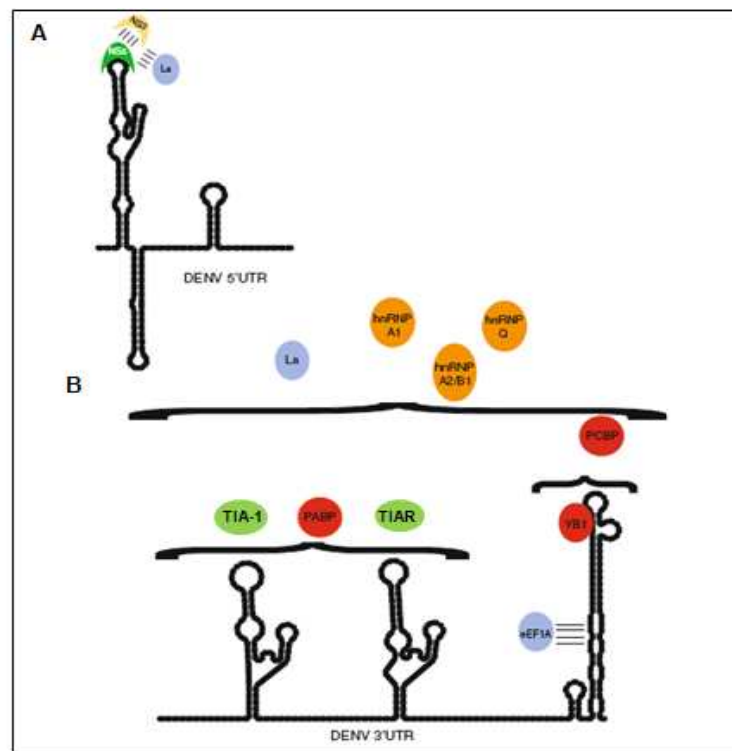
intercelular 3 específica de DC (do inglês *dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*, DC-SING), e constituem alvos potenciais para a infecção inicial no hospedeiro humano (NAVARRO-SANCHEZ et al., 2003; LOZACH et al., 2005). Além desses, outros possíveis receptores em células de mamíferos foram descritos, como heparan sulfato, proteínas de choque térmico 70 (*heat shock protein 70*, HSP70) e 90 (*heat shock protein 90*, HSP90), GRP78/BiP, CD14, receptor de 37/67 kDa de alta afinidade pela laminina, receptor de manose, L-SIGN (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; ALEN; SCHOLS, 2012)

A interação da glicoproteína E do DENV com o receptor da célula hospedeira favorece a internalização da partícula viral por endocitose mediada por receptores. A acidificação dos endossomos induz uma mudança conformacional irreversível na proteína E, resultando na fusão de membranas endossomais e virais, seguida pela libertação do nucleocapsídeo no citoplasma. Logo após ter sido liberado no citoplasma, o nucleocapsídeo é desmontado e o RNA viral é imediatamente traduzido em uma poliproteína de aproximadamente 3.400 aminoácidos.

O genoma infeccioso do DENV carrega em sua extremidade 5' uma estrutura em cap que garante a estabilidade e eficiência da tradução. O processo de tradução ocorre via reconhecimento da estrutura em cap (5' m7GpppG) do RNA viral pelo fator celular eIF4E, o qual recruta os mesmos fatores celulares envolvidos na formação do complexo ribossomal e iniciação da tradução dos mRNA (PARANJAPÉ; HARRIS, 2010). Adicionalmente, a estrutura conservada em *harpin* na região do capsídeo (cHP) direciona a seleção do sítio de iniciação da tradução em células humanas e de mosquito, aumentando a eficiência da iniciação da tradução do RNA viral (CLYDE; HARRIS, 2006).

As reações enzimáticas envolvidas nos processos de replicação e tradução do genoma viral são catalisadas pelas proteínas multifuncionais multidomínios NS3 e NS5 em associação com as outras proteínas virais NS, importantes para o ancoramento do complexo replicativo (CR). Fatores celulares interagem com os elementos do RNA dos flavivírus para regular a tradução e a replicação e, assim, determinar a extensão da infectividade na célula hospedeira. Alguns desses fatores foram recentemente identificados em células de mamíferos e de insetos, tal como o fator de iniciação eucariótica 1A (eIF1A), a proteína de ligação ao trato polipirimidina (PTB), proteína de ligação Y-box 1 (YB-1), as ribonucleoproteínas nucleares

heterogêneas (hnRNP A1, hnRNP A2/B1 and hnRNP Q), o autoantígeno (La), calreticulina e o antígeno intracelular da célula T 1 (TIA-1) e a proteína relacionada (TIAR) (PARANJAPE; HARRIS, 2010; ALCARAZ-ESTRADA; YOCUPICIO-MONROY; DEL ANGEL, 2010). A interação esquemática desses fatores com as estruturas conservadas dos RNAs dos flavivírus e com as proteínas NS3 e NS5 estão representadas na figura 1.6. Embora os fatores mencionados estejam envolvidos em uma série de processos celulares, tais como *splicing*, transcrição, tráfego de RNA e tradução, o papel dessas proteínas no ciclo de vida do vírus não está completamente caracterizado.



**Figura 1.6 - Interação das proteínas virais e da célula hospedeira com as regiões não traduzidas do genoma (do inglês, *untranslated region* - UTRs) dos DENVs.** Os fatores em azul têm papel demonstrado ou postulado na síntese de RNA. Os fatores em vermelho apresentam papel definido ou hipotético na regulação da tradução. Os fatores marcados em verde interagem com a 3'UTR da fita negativa, causando a inibição da tradução (a) Proteínas virais e da célula hospedeira que interagem com a região 5'UTR dos DENVs. A NS5 interage com o *stem-loop A* (SLA) da 5'UTR e com a NS3. La interage com a 5'UTR e com as proteínas NS3 e NS5. (b) Proteínas virais e da célula hospedeira que interagem com a região 3'UTR dos DENVs. YB-1 associa-se com o *loop 3'SL*. eEF1A provavelmente interage com as protuberâncias da região 3' SL. PABP interage com a região a montante do 3'SL. La, hnRNPs A1, A2/B1 e Q ligam-se a regiões não determinadas da 3'UTR dos DENVs. Adaptado de Paranjape; Harris (2010).

A replicação do RNA dos flavivírus é iniciada na região 3' UTR do genoma pelo mecanismo de replicação semiconservativa assimétrica, com a dupla fita intermediária contendo o RNA molde e o RNA genômico nascente (CLEAVES; RYAN; SCHLESINGER, 1981). A síntese do RNA é um ponto crítico para a propagação viral e a dinâmica interação entre elementos *cis*, principalmente as sequências regulatórias localizadas nas regiões 3' e 5' UTR, elementos em *trans*, constituído por fatores virais e da célula hospedeira, e um microambiente vesicular localizado no RE garantem o sucesso da replicação viral. Diferentemente dos outros vírus de RNA de polaridade positiva, a ciclização do genoma dos flavivírus é mediada pelas sequências conservadas de ciclização (CS), SLA e região AUG *upstream* (UAR), localizadas nas regiões 5' e 3' UTRs do genoma viral, sem a necessidade de proteínas acessórias. O uso de sistemas de replicons subgenômicos do DENV e mutações sítio dirigidas nas regiões CS, UAR e SLA demonstram que a ciclização do RNA é importante para a replicação, mas não é requerida para o processo de tradução do genoma viral (LODEIRO; FILOMATORI; GAMARNIK, 2009; ALVAREZ et al., 2005).

A partícula viral é montada nas membranas do RE, quando novas proteínas e o RNA genômico, recentemente sintetizado, são originados no lúmen do RE. No complexo de Golgi (CG), ocorre a N-glicosilação de resíduos de aminoácidos das proteínas E (posições 67 e 153), prM (posições 7, 31 e 52) e NS1 (posições 130 e 207), a clivagem dos peptídeos pr e M, a dissociação do heterotrîmero e a conversão da partícula viral imatura em partícula viral infecciosa madura (RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010). As partículas infecciosas e subvirais resultantes são liberadas da célula hospedeira por exocitose, tornando-se aptas a interagir com uma nova célula hospedeira (MUKHOPADHYAY et al., 2005).

A replicação, a tradução e a montagem da partícula viral ocorrem em associação com as membranas do RE, em microambientes vesiculares. Todos os componentes requeridos para os processos de síntese e montagem da partícula viral são recrutados para estes compartimentos, tornando o processo mais eficiente. A eficiência dos processos de adsorção, desnudamento, replicação, tradução e exocitose é determinante para a infectividade do vírus. Os flavivírus utilizam uma série de mecanismos para facilitar a competência viral, incluindo as estruturas

especializadas nas regiões 3' e 5' UTR e o mecanismo de compartimentalização do CR, que desempenham um papel essencial na tradução/replicação e proteção do RNA viral contra a degradação por RNA exonucleases endógenas.

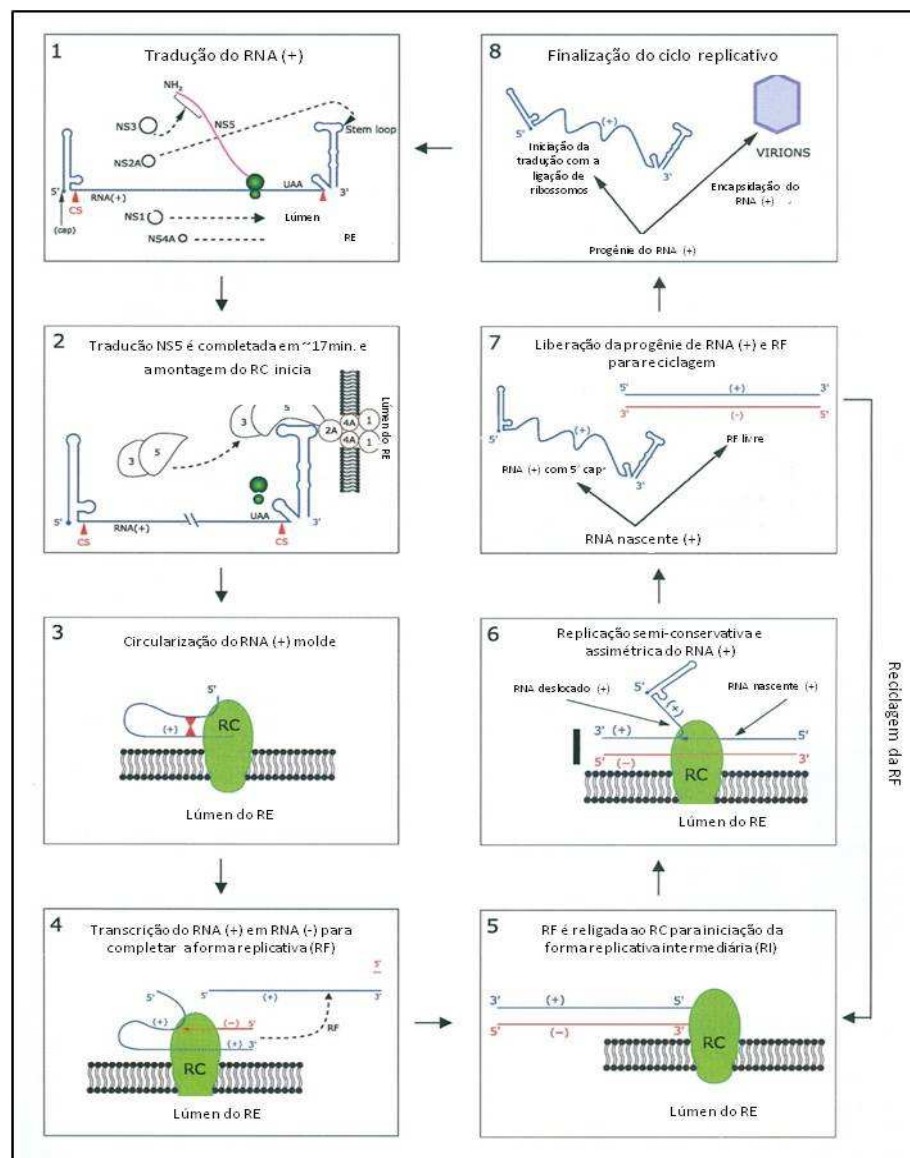
#### 1.4.4 Proteína multifuncional NS3

A síntese da poliproteína dos flavivírus e o processamento desta proteína precursora são completados nas membranas do RE da célula hospedeira. O processo de clivagem da poliproteína viral em 10 proteínas funcionais inclui a combinação de proteases celulares (signalases e furinas) e o complexo heterodimérico codificado pelo vírus (NS2B/NS3). A acurácia deste processo é de fundamental importância para replicação e produção de partículas virais na célula hospedeira.

A NS3 apresenta várias atividades catalíticas em uma única cadeia polipeptídica. O motivo funcional desse arranjo estrutural e a interrelação entre as atividades catalíticas dos domínios individuais de helicase não estão completamente entendidos. Alguns estudos demonstraram que a porção total da proteína NS3 recombinante (619 resíduos de aminoácidos), com ou sem o domínio cofator da NS2B, exibem maior atividade catalítica de RNA helicase *in vitro* (~ 30 vezes maior) quando comparado com o domínio helicase C-terminal truncado da NS3 (441 aminoácidos), indicando que o domínio protease pode influenciar nas atividades enzimáticas de helicase da proteína (WU et al., 2005; LUO et al., 2008). Luo et al., 2008 sugerem que resíduos básicos presentes na superfície do domínio protease da NS3 (NS3<sub>pro</sub>) poderiam modular a atividade de RNA helicase por aumentar a afinidade por nucleotídeos e participar da ligação ao RNA. Os domínios helicase e protease estão conectados por um *linker* flexível de 20 resíduos de aminoácidos localizados entre as posições 160 e 180 da NS3. Essa região apresenta um papel importante na associação entre os dois domínios da proteína (LI et al., 1999). Mutações que alteram a flexibilidade desta região têm sido implicadas com alterações de funcionalidade da proteína (LUO et al., 2010).

A proteína NS3 juntamente com a proteína NS5 apresenta papel crucial no ciclo replicativo viral. Essas proteínas interagem entre si e com outras proteínas virais e da célula hospedeira para formar o complexo replicativo viral (Figura 1.7)

(CHAMBERS; MONATH, 2003). Alguns estudos descrevem que a interação da proteína NS3 com outras proteínas virais pode favorecer as atividades enzimáticas da proteína. Yon et al (2005) demonstraram que a interação NS3/NS5 estimula a atividade NTPase e RTPase da NS3 *in vitro*. A região de interação com o domínio RdRp da proteína NS5 mapeia nos subdomínios 2 e 3 do domínio helicase da proteína NS3 (JOHANSSON et al., 2001). Umareddy et al. (2006) demonstraram que a proteína NS4B é capaz de dissociar a NS3 do RNA simples fita e consequentemente aumentar a atividade helicase *in vitro*. Esses dados suportam a ideia de que o complexo heterodimérico NS3/NS5 e NS3/NS4B é uma unidade funcional envolvida na dissociação da dupla fita de RNA durante a replicação viral.



**Figura 1.7 - Modelo do ciclo replicativo do complexo de replicação dos flavivírus (RC). Passo 1: Durante a tradução in cis das proteínas NS do**



genoma de RNA, assume-se que a NS3 liga-se ao produto N-terminal da NS5 enquanto os outros produtos clivados (NS1, NS2A e NS4A) movem-se para os sítios indicados. **Passo 2:** A montagem do RC inicia na porção 3'UTR através da ligação da NS2A, provavelmente no *stem loop* conservado ao qual também se ligam a NS3 e a NS5. O complexo permanece ligado ao RNA fita positiva e é transportado para o sítio de replicação na membrana do RE pela afinidade dos resíduos hidrofóbicos da NS2A interagirem com a proteína transmembrana NS4B (mostrada na forma de dímero). As porções hidrofílicas da NS4B interagem com o domínio dimérico da NS1 no lúmen do RE. **Passo 3:** Após a formação do RC (NS1, NS3, NS5, NS2A e NS4A) o domínio RdRp da NS5 liga ao RNA molde circularizado via interações com as CS localizadas próximas aos *stem loops* das regiões 5' e 3'UTR. **Passo 4:** O RC começa a transcrever o RNA polaridade(+) positiva em RNA polaridade negativa (-). A RF (forma replicativa) é formado após a finalização da transcrição por pareamento de bases da nova cadeia de RNA (-) e o RNA molde (+). **Passo 5:** O RF liberado se religa ao RC para servir como molde. **Passo 6:** A forma replicativa intermediária (RI) é formada assim que o RC inicia a síntese de RNA (+) pela replicação semiconservativa e assimétrica. O RNA molde move-se pelo RC enquanto o RNA (+) nascente desloca o RNA (+) preexistente. **Passo 7:** O RNA (+) deslocado é o cap (m7GpppN) é adicionado pela atividade enzimática da NS3 (RNA trifosfatase) e NS5 (guanilil transferase e metil transferase), possivelmente enquanto ainda associado ao RC. O RF livre é reciclado através do RC associado as membranas (na infecção tardia ocorre dentro das vesículas induzidas pela infecção viral). **Passo 8:** O RNA capeado é montado para formar o vírion ou ligado ao ribossomo e então todo o ciclo pode ser repetido). Adaptado de Chambers; Monath, 2003.

Apesar da interação entre as proteínas virais NS1, NS2B, NS4B, NS5 com NS3 ser descrita (KAPOOR et al., 1995; WESTAWAY; MACKENZIE; KHROMYKH, 2003; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007), apenas o complexo NS2B/NS3 dos flavivírus foi caracterizado estruturalmente (ERBEL et al, 2006; ASSENBERG et al., 2009). A resolução tridimensional da estrutura da NS3 do DENV-4 a 3.15Å e determinação de seu envelope por espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) sugere que a NS3 é uma molécula estendida com o domínio protease espacialmente orientada ao topo dos domínios I e II do domínio helicase (LUO et al., 2008). A análise estrutural do complexo NS2BNS3 mostra que os resíduos 51 a 57 da NS2B dos flavivírus são importantes para estabilização da estrutura do cerne do domínio protease (ERBEL et al., 2006). Outra região de significativa importância, descrita por estudos de mutagênese sítio dirigida, compreende os resíduos 67 a 80 do co-fator NS2B (NIYOMRATTANAKIT et al., 2004); essa região forma uma estrutura em  $\beta$ -*harpin* que insere-se entre as  $\beta$ 10 e  $\beta$ 14 da NS3pro e desempenha um importante papel na ativação estrutural da protease do DENV (LUO et al., 2008; NOBLE et al., 2012). Além disso, a estrutura tridimensional da NS2BNS3 dos flavivírus complexada a substratos sintéticos de RNA ou DNA possibilitou a identificação do

sítio de ligação aos ácidos nucleicos. O domínio de ligação está situado entre a alfa-hélice 2 do domínio II, o  $\beta$ -harpin que emerge do domínio II e a alfa-hélice do domínio III, localizado a 30 Å do sítio de ligação ao ATP. No entanto, essa interação não é determinada pela sequência de base específica (LUO et al., 2008). Ensaio bioquímico *in vitro* demonstraram que uma região de cadeia simples no substrato de RNA ou cadeia dupla no DNA é requerida para a ótima atividade helicase dos flavivírus (TACKETT et al., 2005) e que mutações no motivo <sup>184</sup>RKRK da NS3 impedem a ligação da proteína com o substrato (YON et al., 2005). Os dados sugerem que a presença do motivo carregado (<sup>184</sup>RKRK) na NS3hel desempenha um papel essencial no reconhecimento da região de fita simples do substrato, antes de mover-se ao longo da cadeia de ácido nucléico e desestabilizar a forquilha de ss/dsRNA ou ss/dsDNA.

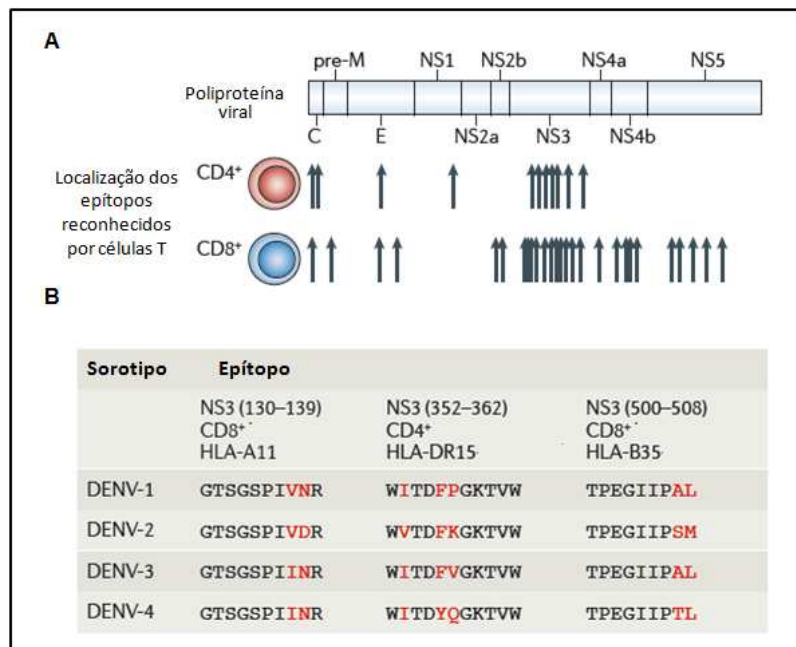
Estudos recentes evidenciaram que as proteínas da família DExH-box além de utilizarem a energia derivada dos nucleotídeos trifosfatados (NTP) para promover a abertura do duplex de RNA podem também utilizar esta energia para dissociar os complexos RNA-proteína, atuando como translocase (DING; PYLE 2012). Esta propriedade foi recentemente demonstrada em membros da família *Flaviviridae* (APPLEBY et al., 2011). Gu e Rice (2010) demonstraram que a desestabilização da fita simples de DNA (ssDNA) e da fita dupla de DNA (dsDNA) é primeiramente mediada pelo movimento da proteína NS3 de HCV, indicando que esta proteína pode atuar como uma ssDNA ou ssRNA translocase.

A *trans* clivagem *in vivo* pelo complexo NS2BNS3 é limitada exclusivamente as proteínas NS localizadas no lado citosólico da membrana do RE (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). Atualmente há uma série de evidências de que o complexo NS2BNS3 dos flavivírus pode catalisar a clivagem de proteínas do hospedeiro que contém a sequência de clivagem clássica, tal como IPS-1 (do inglês, *Interferon-beta promoter stimulator*) (LOO et al., 2006), TRIF (do inglês, *TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- $\beta$* ) (LI et al., 2005) e STING (do inglês, *stimulator of the interferon gene*) (AGUIRRE et al., 2012) e desenvolver um mecanismo de evasão da resposta imunológica.

Interessantemente, estudos recentes têm demonstrado o envolvimento da proteína NS3 dos flavivírus na morfogênese viral, via mecanismos que são independentes da atividade catalítica da proteína (PIJLMAN; KONDRATIEVA;

KHROMYKH, 2006; CARPP; GALLER; BONALDO, 2011). Além disso, as propriedades biológicas da proteína NS3 e a capacidade de elicitar resposta imunológica celular em macacos *rhesus* indianos (MLADINICH et al., 2012) e em primatas humanos infectados com o DENV (DUANGCHINDA et al., 2010) faz desta proteína um bom alvo para terapias antivirais e desenvolvimento de vacinas (WICHAPONG et al., 2010; FRIMAYANTI et al., 2011).

Alguns estudos demonstram que durante a infecção viral em células humanas a resposta das células T, CD4+ e CD8+ é dirigida principalmente ao reconhecimento de epítomos da proteína NS3 do DENV presente na superfície das células infectadas via o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (ROTHMAN, 2011) (Figura 1.8). O mapeamento de epítomos reativos do DENV em células CD4+ e CD8+ sugere que juntamente com a proteína E (368 epítomos), a proteína NS3 (103 epítomos) constitui um dos maiores alvos da resposta imune contra o vírus (VAUGHAN et al., 2010). A caracterização de epítomos de reatividade distinta pode auxiliar no entendimento sobre os mecanismos envolvidos na imunidade protetora ou patológica e também para o desenvolvimento de vacinas.



**Figura 1.8 – Alvos da resposta dos linfócitos T frente a infecção pelo DENV.** **A.** Estrutura esquemática da poliproteína do DENV. A localização dos epítomos definidos que são reconhecidos pelas células T humanas estão indicados pelas setas. **B.** Sequência de três epítomos da proteína NS3 dos DENV-1-4 que são reconhecidos pelas células T. A localização do epítopo, reconhecimento pelas células T CD4+, CD8+ estão indicados. Adaptado de Rothman (2011).

A proteína NS3 localiza-se exclusivamente dentro das células infectadas, mas devido a lise celular ocasionada por efeito citopático viral (CPE) ou lise celular imunomediada pode tornar essas proteínas acessíveis a ligação de receptores das células B. Anticorpos monoclonais neutralizantes contra epítpos específicos da proteína NS3 do DENV-2 tem sido caracterizado e utilizado para imunizar eficientemente camundongos da linhagem BALB/c (TIAN et al., 2013).

### **1.5 A doença e a resposta imunológica frente à infecção pelo DENV**

A infecção por qualquer um dos quatro sorotipos do DENV pode resultar em um espectro de doença que varia desde uma febre indiferenciada à hemorragias potencialmente fatais. Embora a maioria dos casos de infecção pelo DENV seja assintomática ou resulte em formas mais brandas da doença, denominada de febre clássica da dengue (FD), um grande número de pacientes (cerca de 1% dos casos) apresenta manifestações clínicas mais severas que podem resultar na febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD) (ROTHMAN; ENNIS, 1999; KUNO, 2003). A FD é uma doença febril aguda com duração de 3 a 7 dias, geralmente acompanhada por cefaléia e mialgias debilitantes e, muitas vezes, por exantema maculopapular. Interessantemente, essas características deram origem ao nome de "febre quebra-ossos" adotado até a década de 1900 (RIGAU-PÉREZ, 1998), quando a etiologia da dengue foi evidenciada por Ashburn e Craig em 1907. A FHD representa a manifestação clínica grave da infecção pelo DENV. Os sintomas observados no curso inicial da infecção assemelham-se aos da DF, entretanto, a doença caracteriza-se por hemorragias diversas (que incluem petéquias, púrpuras e equimoses), trombocitopenia e extravasamento de plasma, que é atribuído ao aumento da permeabilidade vascular e manifestado por valores elevados de hematócrito, hipoproteinemia ou efusão no interior das cavidades serosas (ROTHMAN, 1999; MALAVIGE et al., 2004).

O extravasamento de plasma observado em pacientes infectados com o DENV é mediado principalmente pela exacerbada produção de citocinas e quimiocinas que causam danos nas células endoteliais. Diversos desses mediadores celulares têm sido associados com a severidade da doença, especialmente em

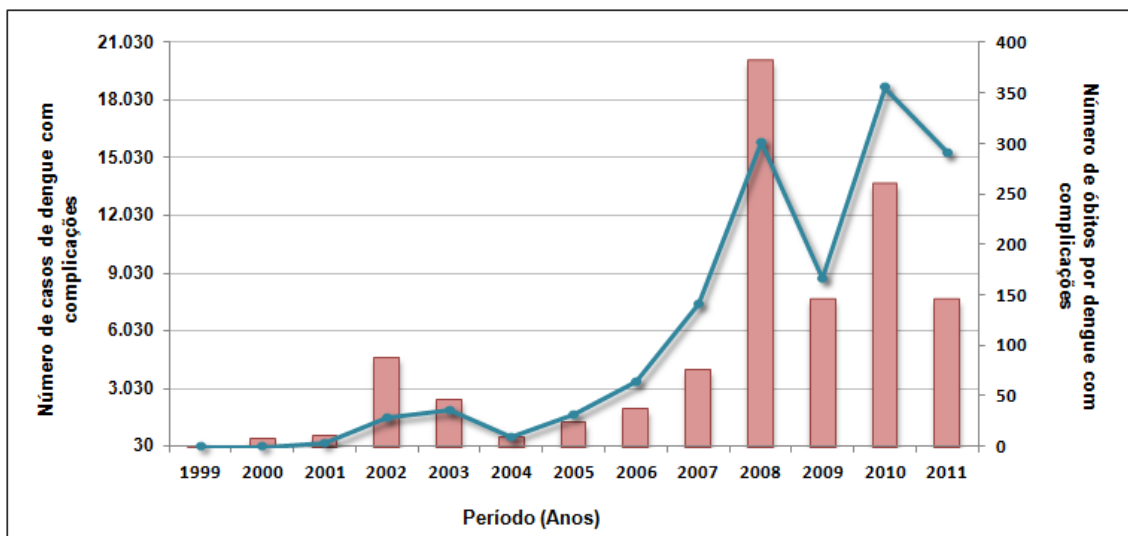
pacientes com FHD/SCD. Citocinas, tal como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), podem desempenhar um papel na patogênese durante o curso da infecção do DENV, causando disfunção das células endoteliais (MANGADA et al., 2002; DE-OLIVEIRA-PINTO et al., 2012) e em DCs derivadas de monócitos humanos (mdDCs) (SILVEIRA et al., 2011). Interferon tipo I e II (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , and IFN- $\gamma$ ) também desempenham um papel crítico na resposta do hospedeiro contra o DENV através da indução de uma série de genes com funções antivirais que podem afetar vários aspectos do ciclo do vírus. No entanto, enquanto algumas respostas à IFN são protetoras, outras podem exercer efeitos na gravidade da doença no hospedeiro humano (LONG et al., 2009). Além disso, uma modulação negativa do IFN tipo I poderia, por exemplo, causar o aumento da viremia associada com a gravidade da doença. De acordo com Chaturvedi et al. (1999), os níveis séricos de TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6 e IFN- $\gamma$  encontram-se elevados nos três primeiros dias da doença, enquanto que os níveis de IL-10, IL-5 e IL-4 tendem a subir mais tardiamente. Bozza et al. (2008) avaliaram o padrão de citocinas presente no plasma de pacientes com diferentes apresentações clínicas de dengue e verificaram que IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-13, IL-7 e GM-CSF eram significativamente mais expressos em pacientes com manifestações severas (FHD/SCC) do que naqueles que apresentavam as formas mais brandas da doença. No entanto, não existe ainda um consenso sobre as citocinas predominantemente produzidas em casos de FD e em casos graves de FHD (MALAVIGE et al., 2004; KING et al., 2000). Um maior número de estudos epidemiológicos envolvendo pacientes com graus distintos de severidade da doença são necessários para que se possa supor uma correlação entre nível de citocinas e quimiocinas com gravidade da infecção e, assim, talvez poder utilizar esses mediadores celulares como biomarcadores.

Em casos leves a moderados, os sinais e sintomas da infecção pelo DENV desaparecem logo após o cessar da febre. No entanto, quando o quadro é mais grave pode haver falência de órgãos e comprometimento do sistema circulatório, podendo progredir rapidamente para o SCD (GUBLER, 1998). Nenhuma das características citadas acima é suficientemente específica para o diagnóstico clínico preciso da dengue. Portanto, o suporte laboratorial é de fundamental importância para a detecção de anticorpos IgM ou do vírus no soro de pacientes durante a fase aguda da doença. Comumente as técnicas de ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked*

*Immunosorbent Assay*), RT-PCR ou isolamento viral são empregadas. Além desses, o kit para detecção de proteína NS1 circulante no soro de pacientes está disponível comercialmente e pode ser utilizado para o diagnóstico precoce de infecção pelo DENV. A proteína NS1 é altamente conservada e o aumento dos níveis de NS1 solúvel no soro de pacientes infectados com o DENV correlaciona-se com os níveis de viremia e gravidade da doença, podendo ser utilizado como preditor de FHD (LIBRATY et al., 2002).

Recentemente a Organização Mundial de Saúde (OMS) reviu o esquema de classificação da doença, adicionando eventos antes considerados raros na infecção pelo DENV, tais como complicações cardíacas, hepáticas e neurológicas, descritas com relativa frequência nos casos de FD e FHD (OEHLER; LE HÉNAFF; GHAWCHE, 2012). O número de casos de dengue com complicações (DCC) tem aumentado significativamente nos últimos anos, especialmente no Brasil (Figura 1.9). Dentre as complicações observadas, as manifestações neurológicas têm apresentado considerável relevância nos casos de infecção pelo DENV (prevalência de 0,5% a 6,2% dos casos de dengue) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012; OEHLER; LE HÉNAFF; GHAWCHE, 2012). As complicações neurológicas ocasionadas pela infecção de qualquer um dos sorotipos do DENV incluem encefalite, encefalomielite disseminada aguda, mielite transversa, neurite e síndrome de Guillain. A fisiopatologia da dengue neurológica pode decorrer tanto da infecção direta do vírus no tecido nervoso quanto da exacerbada resposta imune, estabelecida durante a infecção (CHIEN et al. 2008; DOMINGUES et al. 2008; VARATHARAJ, 2010). Embora o DENV não seja, geralmente, considerado neuroinvasivo, há uma série de evidências que indicam que, tal como outros membros do gênero *Flavivirus* (meningomielo-encefalite, Chikungunya, vírus da encefalite japonesa (JEV, do inglês *japanese encephalitis virus*), vírus do oeste do Nilo (WNV, do inglês *West Nile virus*), o DENV pode causar encefalite por invasão direta no sistema nervoso central (SNC). A identificação de RNA e de antígeno viral no SNC de casos fatais de dengue (MIAGOSTOVICH et al., 1997; SOARES et al., 2010; RAMOS et al., 1998), bem como, a identificação de anticorpos intratecal no líquido cefalorraquidiano (LCR) (MISRA et al., 2006; ARAÚJO et al., 2012) suportam esta ideia. Numerosos fatores têm sido associados com a gravidade da doença, incluindo a cepa do vírus infectante e o estado imunológico do hospedeiro (KYLE; HARRIS, 2008; RICO-

HESSE et al., 1997; MANGADA; IGARASHI, 1998; LEITMEYER et al., 1999, DUARTE DOS SANTOS et al., 2000). Mas apesar dos recentes avanços no conhecimento da biologia molecular do DENV, a contribuição de cada fator envolvido no desenvolvimento das formas graves da doença permanece indeterminada, principalmente pela falta de um modelo animal que reflita a doença de forma similar ao homem.



**Figura 1.9 – Número de casos graves de dengue reportados no Brasil entre os anos de 1999 e 2011.** As barras em rosa indicam o número de casos de dengue com complicações. A linha azul indica o número de óbitos em decorrência de complicações da doença. (Dados obtidos do Ministério da Saúde, 2012).

Primatas não humanos podem sustentar a replicação do DENV e desenvolver uma resposta imune relevante, porém não constituem bons modelos de infecção por não manifestarem sintomas da doença (SCHERER et al., 1978). Durante a última década, grandes avanços têm sido feitos quanto ao desenvolvimento de novas linhagens de camundongos, na tentativa de reproduzir o sistema imunológico humano. Embora os modelos de infecção do DENV *in vivo* apresentem algumas limitações, como o fato da infecção pelo DENV não reproduzir completamente os sinais clínicos observados em humanos, (COLE; WISSEMAN 1969; MCMINN, 1997; YAUCH; SHRESTA 2008), estes modelos de infecção apresentam valor científico, principalmente, por possibilitar o entendimento da complexidade da doença, além de constituir importantes ferramentas para o estudo de desenvolvimento de vacinas e antivirais.

Devido à falta de um modelo animal adequado para se estudar a imunopatologia da dengue, a maioria dos estudos têm sido realizados utilizando amostras de indivíduos naturalmente infectados e culturas primárias de células humanas. Em uma infecção natural, o principal alvo da infecção são os monócitos do sangue e os macrófagos teciduais (SCOTT et al., 1980). No entanto, as DCs mielóides que residem na epiderme e derme são as células do sistema imune inato que inicialmente interagem com o DENV após a picada do mosquito infectado (WU et al., 2000). As DCs possuem um papel crítico na interação entre a resposta imune inata e adaptativa, fagocitando antígenos e apresentando-os para linfócitos, sendo capazes de induzir tolerância ou potentes respostas imunes adaptativas. A capacidade das DCs em montar a resposta imune adaptativa durante a infecção viral é mediada em grande parte pela sua maturação e estado de ativação, tal como determinado pela expressão superficial de moléculas de HLA, as moléculas co-estimuladoras, e produção de citocinas. Esta propriedade faz com que as DCs sejam alvo de interesse para a investigação de fatores produzidos durante a infecção pelo DENV, possibilitando estudos de caracterização genética, indução da resposta imunológica e caracterização de marcadores moleculares que podem ser correlacionados com o risco de desenvolvimento de formas mais graves da doença (LIBRATY et al., 2001; REIS et al., 2007).

## **1.6 Marcadores moleculares de virulência**

A complexidade da patogenia da dengue está atrelada a uma série de fatores que envolvem principalmente o perfil genético, co-morbidades pré-existentes, resposta imunológica do hospedeiro à infecção, hiperendemicidade e fatores virais (WHITEHORN; SIMMONS, 2011). Atualmente, o grande desafio consiste em entender como esses fatores conspiram para ocasionar a variabilidade de características associada à doença da dengue.

Duas teorias principais, as quais não são mutuamente excludentes, são frequentemente citadas para explicar a base da patogênese da FHD/SCD; uma consiste na exacerbação da resposta imune dependente de anticorpos (do inglês, *antibody-dependent enhancement* – ADE) e a outra na virulência intrínseca do vírus. A teoria de ADE preconiza o aumento da gravidade da doença mediada por



anticorpos heterólogos pré-existentes contra o DENV, os quais são capazes de reconhecer o vírus infectante, porém incapazes de neutralizá-lo. Desta forma, a internalização do vírus seria facilitada pelo reconhecimento da porção Fc da imunoglobulina por receptores celulares presentes na membrana biológica de leucócitos, especialmente macrófagos. Esta teoria inicialmente proposta por Halstead em 1970 é confirmada por dados laboratoriais e epidemiológicos (HALSTEAD, 1988). No entanto, o fenômeno de ADE não explica a associação de casos graves da doença e óbitos decorrentes de infecções primárias. A hipótese que determinantes virais desempenham um papel na virulência do DENV foi primeiramente proposta por Barnes e Rosen (1974) durante uma epidemia ocasionada pelo DENV-2 na ilha de Niue, no sul do oceano Pacífico. A epidemia, associada com casos primários de infecção pelo DENV, foi caracterizada por alta incidência de manifestações hemorrágicas da doença e altas taxas de mortalidade. Estudos epidemiológicos e clínicos mais recentes corroboram fortemente o papel de fatores virais associados com a patogênese da dengue (COLOGNA; ARMSTRONG; RICO-HESSE, 2005; TUISKUNEN et al., 2011b).

O DENV está completamente adaptado para se replicar em seres humanos e mantém uma estreita relação com o hospedeiro vertebrado e o mosquito vetor. A pressão seletiva exercida sobre estes vírus de genoma RNA (especialmente polaridade positiva) e as altas taxas de erro da RdRp viral contribuem para aumentar a variabilidade genética e, assim, culminar na seleção de cepas mais virulentas com maior potencial epidêmico ou ainda selecionar cepas naturalmente atenuadas. A expressão fenotípica desses determinantes virais pode impactar na virulência através da modulação das propriedades biológicas do vírus, como tropismo celular (capacidade de ligação do vírus a receptores celulares), eficiência de replicação e a transmissibilidade.

Diversos trabalhos postulam que a presença de uma única substituição de aminoácido no genoma dos flavivírus pode alterar a patogenicidade do vírus *in vivo* e *in vitro*. Grant et al. (2011) demonstraram que a alteração de aminoácido (Phe para Leu) na posição 52 da proteína NS4B é capaz de abolir completamente a patogenicidade do DENV-2 (cepa D2Y98P) em camundongos. Interessantemente, a alteração do aminoácido Leu52Phe na proteína NS4B do DENV-2 (cepa TSV01) é capaz de causar neurovirulência em camundongos AG129, associada ao aumento

da síntese de RNA viral. Liu et al., (2006) evidenciaram que uma única alteração de aminoácido na posição 30 da proteína NS2A (Ala/Pro) do WNV é capaz de reduzir drasticamente o efeito da NS2B na inibição da via de sinalização de IFN- $\alpha$  e  $\beta$ , reduzindo deste modo, a virulência em modelo murino. Rodrigues-Roche et al. (2011) identificaram em um estudo filogenético de evolução das cepas DENV-2 circulantes nas Américas uma mudança na proteína NS1 (Thr164Ser) do DENV-2, correlacionada com o rápido aumento da gravidade da doença. Os autores hipotetizam que esta mutação conservada teria sido adquirida durante a epidemia de FHD no ano de 1997 em Santiago de Cuba e estaria correlacionada com o aumento do *fitness* viral.

Além das proteínas NS, alguns trabalhos descrevem que diferenças na sequência de aminoácidos da proteína E poderia, por exemplo, explicar a baixa patogenicidade da cepa do genótipo americano do DENV-2 (cepa PR152), circulante nas Américas antes dos primeiros relatos de DHF, comparada com as cepas Asiáticas (PIO-312 e D80-100) (PRYOR et al., 2001; COLOGNA; ARMSTRONG; RICO-RESSE, 2005). Leitmeyer et al., (1999) propuseram que o aminoácido 390 na glicoproteína E poderia ser um importante determinante para o desenvolvimento de DHF. Sánchez e Ruiz (1996) demonstraram que alterações nesta posição (Asp390His), identificada em um isolado clínico de DENV-2 (cepa 200787) no México, estava associada com aumento da virulência e tropismo celular em camundongos imunocompetentes. Pryor et al. (2001) utilizaram um clone infeccioso de DENV-2 e identificaram que uma única mutação na posição 390 da proteína E era responsável pelo menor poder infectivo das cepas Americanas (E390, Asp) em macrófagos e DCs humanas quando comparada com as cepas Asiáticas (E390, Asn).

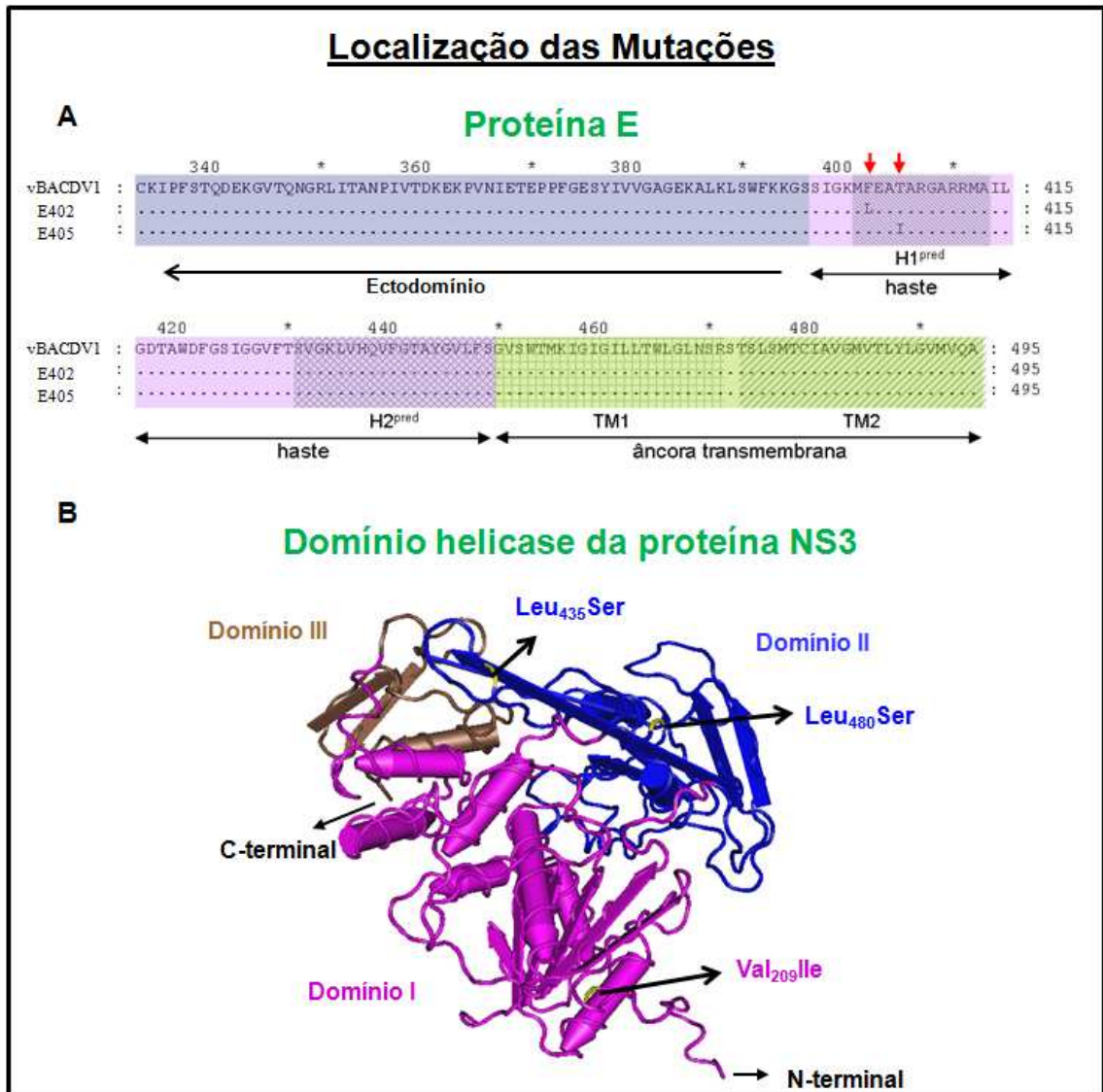
Trabalhos recentes têm utilizado isolados clínicos do DENV para estudos de caracterização biológica *in vitro* e *in vivo* e correlacionar os efeitos observados com a patogenicidade em humanos. Tuiskunen et al. (2011) demonstraram que isolados de DENV-1 provenientes de pacientes com SCD infectam mais eficientemente camundongos BALB/c e apresentam tropismo distinto quando comparado com isolados de DENV-1 provenientes de pacientes com FD ou FHD. A caracterização genômica desses isolados clínicos permitiu a identificação de seis substituições de aminoácidos nas proteínas E, M, NS1, NS3 e NS5, presentes unicamente no isolado

de DENV-1 proveniente de um caso de SCD, que poderiam explicar o caráter neurotrópico do vírus, ruptura da barreira hematoencefálica e habilidade replicativa em células do SNC de camundongos. Nogueira (2008) realizou um estudo de caracterização biológica e genética de diferentes isolados de DENV-3 em contextos epidêmicos distintos provenientes de diferentes regiões do Brasil e Paraguai, dos quais alguns casos foram associados com relatos de encefalite em pacientes com sorologia positiva para dengue. Este trabalho permitiu a identificação de mutações no genoma viral (C, E, NS1, NS2B, NS3, NS4A e NS5), possivelmente associadas com as diferenças fenotípicas *in vitro* e *in vivo* observadas entre os diferentes isolados clínicos.

O DENV tem sido associado a casos esporádicos de encefalite desde a década de 60 (SARKAR et al., 1969) e, mais recentemente, um número crescente de casos de infecção pelo DENV tem sido associado com desordens neurológicas, especialmente no Brasil e na Ásia (SUMARMO et al., 1978; PATEY et al., 1993; MIAGOSTOVICH et al., 1997; SOLOMON et al., 2000; DOMINGUES et al., 2008; JACKSON et al., 2008). No entanto, até o momento nenhum marcador molecular de virulência foi atribuído diretamente a este evento em humanos. Dessa forma, com o objetivo de estudar a neuropatologia da dengue, Desprès et al. (1998) desenvolveram um modelo para selecionar variantes do DENV-1 altamente neurovirulentas (FGA/NA d1d e FGA/NA a5c), por meio de seis passagens sucessivas da cepa FGA/89 (isolado clínico de DF na Guiana Francesa em 1989) em cérebro de camundongos suíços neonatos e em células de inseto AP61 (*Aedes pseudocutellaris*). Os determinantes genéticos implicados na aquisição de um fenótipo de neurovirulência foram mapeados na proteína E e no domínio helicase da proteína NS3 (DUARTE DOS SANTOS et al., 2000). Posteriormente, com o intuito de confirmar o papel dessas mutações na aquisição de um fenótipo neurovirulento em camundongos nós realizamos experimentos similares para adaptar o vírus FGA/89 através de passagem seriada em cérebro de camundongos suíços neonatos, excluindo a etapa de infecção em cultura celular. Após a terceira passagem, identificamos o aparecimento de mutações que se mantiveram até a sexta passagem do vírus no SNC de camundongos, dando origem a cepa neurovirulenta FGA/NA P6. Interessantemente, a nova variante neuroadaptada apresentou substituições de aminoácidos que, embora não idênticas às aquelas

previamente identificadas nas variantes FGA/NA d1d e FGA/NA a5c, mapeavam nos mesmos domínios das proteínas E e NS3 (Tabela 1.1 e Figura 1.10) e eram potencialmente responsáveis pela aquisição de um fenótipo neurovirulento em camundongos neonatos.

As mutações na proteína E (E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub>) localizam fora do ectodomínio da proteína e encontram-se na primeira estrutura  $\alpha$ -hélice (H1<sup>pred</sup>) que antecede a região transmembrana da porção C-terminal da E. Como mencionado anteriormente, esta região parece estar envolvida na formação do homotrímero da proteína E durante o processo de entrada do vírus na célula hospedeira, na interação com a proteína prM e outros domínios da proteína E, bem como, na formação de partículas virais e retenção intracelular (LIN et al., 2011). As mutações nas posições NS3<sub>209</sub>, NS3<sub>435</sub> e NS3<sub>480</sub> mapeiam nos domínios I e II do domínio helicase da proteína NS3 (NS3<sub>hel</sub>) (XU et al., 2005). A porção C-terminal desta proteína (resíduos de aminoácidos 169-619) codifica para um domínio multifuncional de helicase/NTPase/RTPase e executa diversas atividades catalíticas afins, tais como hidrólise de (poli)nucleotídeos e de nucleotídeos trifosfatados (NTP), envolvidas na separação das cadeias de RNA nascentes e desenovelamento de estruturas secundárias na região 3'UTR, auxiliando na iniciação da replicação do RNA viral na célula hospedeira. Além disso, a NS3 5' RNA trifosfatase está envolvida, juntamente com a proteína NS5, no processo de capeamento do RNA viral (MATUSAN et al., 2001).



**Figura 1.10 – Localização das mutações nas proteínas E e NS3 no contexto do genoma do DENV. (A)** Representação do alinhamento da sequência de aminoácidos da região C-terminal da proteína E do vBACDV1 (aminoácidos 333 a 495), mostrando as regiões preditas H1<sup>pred</sup> e H2<sup>pred</sup> da haste e os domínios TM1 e TM2 da âncora transmembrana. As setas vermelhas indicam a posição das mutações em estudo. **(B)** Representação diagramática do domínio helicase da proteína NS3 do DENV. A modelagem molecular foi baseada na estrutura cristalográfica de alta resolução do domínio helicase da proteína NS3 do vírus DENV-2 (XU et al., 2005). As mutações nas posições NS3<sub>209</sub>, NS3<sub>480</sub> e NS3<sub>435</sub> estão identificadas na cor amarela. As cores rosa, azul e marrom representam os domínios I, II e III, respectivamente.

**Tabela 1.1 - Painel das mutações dos DENV neuroadaptados e dos DENV provenientes dos clones infecciosos de cDNA, contendo o subconjunto de mutações selecionadas nas proteínas E e/ou NS3.**

Posição do aminoácido na proteína	FGA/89	FGA/NA d1d	FGA/NA P6	vBAC DV1	vBAC E402	vBAC E405	vBAC NS3 <sub>209</sub>	vBAC NS3 <sub>435</sub>	vBAC NS3 <sub>480</sub>	vBAC E405NS3 <sub>435</sub>	vBAC E402NS3 <sub>209</sub>	vBAC E402NS3 <sub>480</sub>	vBAC E402NS3 <sub>209</sub> NS3 <sub>480</sub>
E 402	Phe	Phe	Leu	Phe	Leu	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu
E 405	Thr	Ile	Thr	Thr	Thr	Ile	Thr	Thr	Thr	Ile	Thr	Thr	Thr
NS3 209	Val	Val	Ile	Val	Val	Val	Ile	Val	Val	Val	Ile	Val	Ile
NS3 435	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	Leu
NS3 480	Leu	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Leu	Ser	Ser

As mutações em estudo conferem ao DENV-1 maior habilidade replicativa e maior produção de progênie viral no SNC de camundongos, com consequente aumento da resposta imunológica, danos no SNC e mortalidade dos animais (BORDIGNON, STROTTMANN et al., 2007; BORBA et al., 2012). Bordignon et al. (2008) avaliaram o perfil da expressão gênica no tecido nervoso de camundongos suíços infectados com o vírus parental FGA/89 e a variante neurovirulenta FGA/NA a5c e verificaram a modulação na expressão de 148 genes envolvidos na via de sinalização por IFN, processamento e apresentação de antígenos, ativação do complemento e via tipo-ubiquitinação. Esses resultados sugerem que a magnitude da modulação da expressão gênica frente à infecção pelo DENV está diretamente relacionada com os fatores virais e pode culminar no desenvolvimento de doença neurológica em modelo murino. No presente trabalho, nós combinamos as técnicas de genética reversa, ensaios moleculares e bioquímicos para avaliar o papel das mutações pontuais nas proteínas E e NS3 do DENV-1, selecionadas nos dois estudos independentes de neuroadaptação do DENV-1 FGA/89 (DESPRÉS et al. 1998; BORDIGNON, STROTTMANN et al., 2007), na modulação do *fitness* viral *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*.

Muito se tem avançado na caracterização molecular dos genomas virais de dengue, porém, os dados de correlação genoma X gravidade da doença são insuficientes para se relacionar determinadas substituições de aminoácidos presentes em diferentes cepas do DENV com o fenótipo viral e ou aspectos clínicos. Considerando as lacunas relacionadas a alguns aspectos da patogênese da dengue, estudos sobre a interação flavivírus-hospedeiro deverão contribuir para a identificação de biomarcadores de virulência assim como a modulação de genes do hospedeiro em resposta a infecção.

## 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Atualmente, o DENV é considerado o patógeno viral humano transmitido por mosquitos mais importante em termos de distribuição geográfica e incidência de infecção em humanos, sendo responsável pelas mais altas taxas de morbidade e mortalidade entre os membros do gênero *Flavivirus*. Embora a dengue constitua um dos principais problemas de saúde pública no mundo, o combate a essa doença depende apenas do controle do mosquito vetor e da disponibilidade de serviços de diagnóstico nas áreas de transmissão, já que não existem drogas antivirais disponíveis e nem uma vacina licenciada segura e efetiva contra a infecção pelo vírus da dengue.

Diversas cepas virais dos sorotipos 1, 2, 3 e 4 estão circulando de forma disseminada e hiperendêmica nas Américas, o que aumenta o risco do desenvolvimento de formas mais graves da doença, seja pelo risco de infecções sucessivas seja pelo potencial surgimento de cepas mais virulentas. As novas apresentações clínicas da dengue com envolvimento neurológico e visceral, recentemente classificadas como DCC, além da FHD/SCD, trazem novos questionamentos sobre a patogênese da infecção e representam novos desafios para o entendimento dessa complexa patologia. Apesar do crescente número de indivíduos infectados e o grande número de mortes notificadas a cada ano em decorrência da infecção pelo DENV, o entendimento das bases moleculares envolvidas nessa grave patologia são ainda pouco compreendidos.

A falta de um modelo animal que reflita as formas graves da doença humana é um obstáculo para se estudar alguns aspectos da patogênese da dengue. Embora com limitações, o modelo murino apresenta-se como uma alternativa para o estudo de determinantes virais implicados na patofisiologia da dengue e para o entendimento da dinâmica interação entre vírus e hospedeiro. Além disso, as células dendríticas derivadas de monócitos humanos (mdDCs) tem se apresentado como um interessante modelo para a elucidação de alguns mecanismos importantes no processo de infecção pelo DENV, uma vez que no hospedeiro humano, após a picada do mosquito vetor do gênero *Aedes*, estas células constituem um dos primeiros alvos de infecção pelo DENV-1.

A caracterização de determinantes genéticos de neurovirulência em camundongos tem sido investigada em nosso laboratório há alguns anos. Recentemente, as mutações identificadas nas proteínas E e NS3 das variantes neuroadaptadas FGA/NA P6 e FGA/NA d1d foram inseridas em um clone infeccioso de DENV-1 para definir o envolvimento de cada uma destas substituições de aminoácidos na aquisição do fenótipo de neurovirulência (BORBA; STROTTMANN, et al., 2012). A caracterização desses determinantes genéticos poderia elucidar mecanismos envolvidos na patogênese da dengue, contribuir para o entendimento das interações entre vírus e hospedeiro e, eventualmente, permitir a identificação de alvos potenciais para o delineamento futuro de estratégias antivirais. Deste modo, o objetivo geral deste trabalho foi definir o papel de cada uma das substituições de aminoácidos identificadas em importantes domínios das proteínas E e NS3 do DENV-1 na modulação do *fitness* viral *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Realizar a caracterização biológica dos vírus recombinantes provenientes dos clones infecciosos de DENV-1, contendo as mutações de interesse, *in vivo*, utilizando-se camundongos *Swiss* recém-nascidos, *in vitro*, utilizando-se linhagens celulares e *ex vivo*, em células dendríticas derivadas de monócitos humanos (mdDC);
- Analisar a modulação da expressão de alguns genes do hospedeiro em resposta a infecção pelos DENV-1 recombinantes;
- Gerar e caracterizar replicons subgenômicos do DENV-1 a partir dos clones infecciosos pBACDV1, pBACDV1-NS3<sub>209</sub>, pBACDV1-NS3<sub>435</sub> e pBACDV1-NS3<sub>480</sub>;
- Avaliar a habilidade replicativa dos replicons subgenômicos do DENV-1 em cultura de células;
- Gerar e caracterizar os clones quiméricos infecciosos do YFV/DENV-1, contendo as mutações de interesse nas posições E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub>.
- Realizar a caracterização biológica *in vitro* dos vírus quiméricos recombinantes contendo as mutações de interesse nas posições E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub>.
- Expressar o domínio helicase da proteína NS3 do DENV-1 cepa FGA/89 e a proteína NS3 fusionada ao co-fator NS2B dos DENV-1 FGA/89, FGA/NA d1d e FGA/NA P6 em sistema procarioto;
- Gerar e caracterizar mutantes da proteína NS2BNS3.



- Avaliar e comparar a atividade funcional de protease, ATPase e helicase das proteínas recombinantes.
- Produzir e caracterizar hibridomas secretores de anticorpos monoclonais (mAbs) específicos contra a proteína NS3 helicase do vírus DEN-1.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Soluções, tampões e meios de cultura

- **PBS:** 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;
- **STE:** 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8,0);
- **TBE:** 89 mM Tris-base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA (pH 8,0);
- **TBS:** 100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl (pH 8,0);
- **Azul de coomassie:** 0.1% azul de coomassie R-250, 45% metanol, 10% ácido acético;
- **Solução de descoloração de géis corados com azul de coomassie:** 4% metanol, 7.5% ácido acético;
- **Solução de eletroforese SDS-PAGE 1X:** 25 mM Tris-base, 192 mM Glicina, 0,1% SDS 10%;
- **Solução de Ponceau S 1%:** 0.5% Ponceau S, 1% ácido acético;
- **Solução Transferência de western blotting:** 25 mM Tris-base, 192 mM Glicina, 20% Metanol;
- **Solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico:** 25 volumes de fenol (pH 7.0, saturado com 10mM Tris-base), 24 volumes de clorofórmio, 1 volume de álcool isoamílico;
- **Solução de clorofórmio:álcool isoamílico:** 24 volumes de clorofórmio, 1 volume de álcool isoamílico;
- **Solução 2,5mM dNTPs:** mistura de 2,5 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dATP, dCTP, dGTP e dTTP);
- **Tampão de amostra para DNA 10X:** 25% ficoll (tipo 400), 0,25% azul de bromofenol, 0.25% xileno cianol FF;
- **Tampão de amostra para géis de proteínas 4X:** 40 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS 10%, 2.5% β-mercaptoetanol, 6% Glicerol, 0.005% azul de bromofenol;
- **Tampão da fosfatase alcalina (AP-BUFFER):** 100 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 9,5);
- **Tampão carbonato:** 19,1 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 40,8 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 9,6);
- **Meio SOC:** 2% bactotripton, 0,5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glicose;

- **Meio LB** (Meio de cultura “*Luria-Bertani Broth*” para *E. coli*): 10 g/L bactotripton, 5 g/L extrato de levedura, 5 g/L NaCl;
- **Meio LB sólido**: 10 g/L bactotripton, 5 g/L extrato de levedura, 5 g/L NaCl, 15 g/L ágar;
- **Meio TB (*Terrific broth*)**: 11,8 g/L bactotripton, 23,6 g/L extrato de levedura, 9,4 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 2,2 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;
- **Meio TB sólido**: 11,8 g/L bactotripton, 23,6 g/L extrato de levedura, 9,4 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,2 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 15 g/L ágar;
- **Tampão de lise/sonicação**: 50 mM Tris-HCl e 300 mM NaCl;
- **Tampão de lavagem**: 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl e 10 mM Imidazol;
- **Tampão de eluição I**: 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl e 150 mM Imidazol;
- **Tampão de eluição II**: 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl e 300 mM Imidazol.

### 3.2 Cepas virais

DEN1 FGA/89 (número de acesso no *GenBank* AF226687)

FGA/NA d1d (número de acesso no *GenBank* AF226686)

FGA/NA P6 (número de acesso no *GenBank* EF122231)

DEN1 BR/90 (número de acesso no *GenBank* AF226685)

DEN2 Jamaica (número de acesso no *GenBank* M20558)

DEN3 BR/02-290 (número de acesso no *GenBank* EF629369)

DEN4 ThD4-0087-77 (número de acesso no *GenBank* AY618991)

### 3.3 Células

#### 3.3.1 Linhagens celulares eucarióticas

Células de linhagem C6/36 de mosquito *Aedes albopictus* foram propagadas a 28°C em meio Leibovitz’s L15 suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 25 µg/mL de gentamicina e 0.26% de triptose.

Células de neuroblastoma murino (Neuro 2a) foram propagadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em *Dulbecco’s Modified Eagle Medium* (DMEM) (GIBCO)

suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 1x solução de aminoácido não-essencial (GIBCO) e 25 µg/mL de gentamicina (GIBCO).

Células de hepatoma humano (Huh7.5) foram propagadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F12) (GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 25 µg/mL de gentamicina (GIBCO).

As células mielômicas da linhagem Ag8xP3653 foram propagadas em meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP - BR) suplementado com 20% de soro fetal bovino, 1 mM de piruvato de sódio, 2 mM de L-glutamina, estreptomicina, 25 µg/mL de gentamicina, 50 UI/µg/mL penicilina/estreptomicina, 1,25 µg/mL de anfotericina B (GIBCO, Grand Island, NY. USA), em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.3.2 Cultura de células primárias humanas**

Células dendríticas derivadas de monócitos humanos (mdDCs) foram geradas a partir de sangue periférico de voluntários saudáveis, de acordo com o protocolo descrito por Silveira et al. (2011). Primeiramente, as células mononucleares foram separadas por centrifugação em gradiente de densidade com o meio de separação de linfócitos (Lonza, Walkersville, MD). Em seguida, a população de células CD14 positivas foi purificada por imuno-classificação magnética (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), utilizando beads metálicas revestidas com anticorpos contra CD14. As células CD14 positivas foram cultivadas durante 6 a 7 dias em meio RPMI 1640 contendo 100 ng/ml de interleucina-4 (IL-4) e 50 ng/ml fator estimulador de colônias de granulócitos/monócitos (GM-CSF; PeproTech, Rocky Hill, NJ), 10% de soro fetal bovino (FBS), 100 UI/ml de penicilina, estreptomicina 100 ug/ml, e 2mM L-glutamina (GIBCO-BRL, Grand Island, NY), realizando troca de meio após o 3° ou 4° dia de cultivo. Após 6 ou 7 dias, a cultura foi avaliada por citometria de fluxo (FACS Calibur, Benton Dickson, BD), utilizando como critério de pureza o valor de 80% em relação ao CD1a, CD11c, CD11b, CD209, e HLA-DR e menos do que 5% em relação ao CD14, conforme descrito por Silveira et al. (2011).

### 3.3.3 Linhagem de células bacterianas de *Escherichia coli* (*E. coli*)

- **XL1-Blue** (Stratagene) – genótipo: endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIqΔ(lacZ)M15] hsdR17(rK<sup>-</sup> mK<sup>+</sup>).
- **TOP10** (Invitrogen) – genótipo: F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG λ.
- **DH5α** (Invitrogen) – genótipo: F<sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK<sup>-</sup> mK<sup>+</sup>), λ<sup>-</sup>
- **Rosetta 2(DE3)** (Novagen) – genótipo: F<sup>-</sup>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3) pRARE2 (Cam<sup>R</sup>).
- **Rosetta-gami 2 (DE3)** (Novagen) - genótipo: (ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F'[lac<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> pro]gor522::Tn10 trxB pRARE2 (Cam<sup>R</sup>, Str<sup>R</sup>, Tet<sup>R</sup>).

### 3.4 Animais de experimentação

Camundongos da linhagem suíço (*Mus musculus*). Todo o manejo dos animais infectados com o DENV-1 foi realizado em câmara de segurança nível 2. Durante o período de realização dos experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas isoladas com filtros de ar, comida e água *ad libitum* e ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os procedimentos que provocavam dor foram realizados sob efeito de anestésicos. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical ou em câmara de CO<sub>2</sub>.

### 3.5 Declaração de ética

O procedimento para coleta e obtenção de mdDCs humana foi precedido pelo consentimento informado do voluntário e obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ (número da aprovação 514/09).

Os procedimentos de manipulação de organismos geneticamente modificados (OGM) estão de acordo com as normas de biossegurança determinadas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio, 2006).

Os experimentos com animais foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal do Paraná (CEP/UFPR 23075.002948/2007-14) e pela comissão de ética no uso de animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/FIOCRUZ LW-51/11) e estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo colégio brasileiro de experimentação animal (COBEA, 2008) e requisitos estabelecidos no guia para o cuidado e uso de animais experimentais (Conselho Canadense sobre Cuidados Animal - CCAC, 1993).

### **3.6 Estudo da virulência dos DENV-1 recombinantes**

#### **3.6.1 Produção dos DENV-1 recombinantes**

##### **3.6.1.1 Obtenção de estoques virais**

A fim de obter um estoque viral de trabalho, os DENV-1 recombinantes de passagem 1 (P1) em células C6/36, gerados por Borba (2010), foram utilizados para infecção em células de linhagem C6/36 em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0.01. O título viral foi determinado pela técnica de imunodeteção por foco em células C6/36, descrito no item 3.6.1.2. O inóculo viral, diluído em meio L15 suplementado sem soro fetal bovino (SFB, foi incubado com cultura de células C6/36 com 60% de confluência em garrafa T150 (TPP) durante 1h a 28°C. Em seguida, o inóculo foi substituído por meio L15 suplementado, contendo 5% de SFB. As infecções foram acompanhadas por 5 a 7 dias. As culturas celulares foram recuperadas por raspagem, transferidas para tubos e centrifugadas a 480 xg, por 10 min., a 4°C em centrífuga Sorvall Super T21. Os sedimentos de células foram separados dos sobrenadantes. O sobrenadante das culturas infectadas com os DENV-1 recombinantes (vBACDV1, vBAC-E<sub>402</sub>, vBAC-E<sub>405</sub>, vBAC-NS<sub>3209</sub>, vBAC-NS<sub>3435</sub>, vBAC-NS<sub>3480</sub>, vBAC-E<sub>402</sub>/NS<sub>3480</sub>, vBAC-E<sub>405</sub>/NS<sub>3435</sub>, e vBAC-E<sub>402</sub>/NS<sub>3209</sub>/NS<sub>3480</sub>) e mock (controle negativo da infecção) foram utilizados para purificação e concentração viral em gradiente de sacarose, descrito no item 3.6.1.3. O sobrenadante das culturas infectadas com os vírus vBACDV1, vBAC-NS<sub>3435</sub> e vBAC-NS<sub>3480</sub> foi estocado -70°C, titulado por imunodeteção de foco em células C6/36 (item 3.6.1.2) e utilizado para os estudos de infecção em mdDCs humanas.

### 3.6.1.2 Titulação viral por imunodeteção por foco em células C6/36

A técnica de titulação viral por imunodeteção por foco foi utilizada para quantificação de partículas virais a partir do sobrenadante de culturas celulares, gradiente de vírus purificado ou sobrenadante do homogeneizado de tecido cerebral de camundongos infectados com os DENV-1 recombinantes. Para tanto, células C6/36 foram semeadas em placas de 24 poços para conter  $1.0 \times 10^5$  células/poço e infectadas com diluições seriadas (1:10 em meio L-15 sem SFB) dos DENV-1. O inóculo (400  $\mu$ L/poço) foi incubado, em duplicata, com as células por 1h em estufa BOD a 27°C e, em seguida, substituído por uma mistura de meio de cultura L-15 completo suplementado com 10% de SFB e carboximetilcelulose (CMC) 3,2%. As culturas de células foram então incubadas em estufa a 27°C por 7 dias. Para a revelação dos focos de infecção, as células foram lavadas com PBS para completa remoção do CMC, fixadas em paraformaldeído 3% por 20 min. à temperatura ambiente, permeabilizadas com triton 0,5% por 4 min. a temperatura ambiente, lavadas com PBS e incubadas com anticorpo monoclonal 4G2 (*Flavivírus* específico), na diluição 1:200 em PBS, por 1h em estufa a 37 °C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (AP) (Sigma), em estufa a 37°C por 30 min. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e reveladas após a adição do substrato insolúvel para AP (BCIP e NBT - Promega) diluídos em tampão para fosfatase alcalina. O título viral foi expresso em unidades formadoras de foco por mL (ffu/mL).

### 3.6.1.3 Purificação viral em gradiente de sacarose

Os DENV-1 recombinantes foram concentrados e purificados a partir do sobrenadante das culturas de células C6/36 infectadas. Os vírus foram precipitados com 7% de polietileno glicol (PEG P.M. 8.000) e 2,3% NaCl sob agitação leve e constante, por 16 horas a 4°C. Após este período, os sedimentos contendo as partículas virais foram obtidos por centrifugação a 10.000 rpm por 30 min. a 4 °C e ressuspensos em 3 mL de tampão TNE (50 mM Tris (pH7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) e adicionados sobre gradientes descontínuos de sacarose 60% e 30%

(preparada no mesmo tampão). O material foi centrifugado em ultracentrífuga (Hitachi) a 39.000 rpm por 2 a 3 horas. Após a ultracentrifugação, as bandas contendo os vírus concentrados eram visualizadas com o auxílio de um anteparo escuro e coletadas com pipetas Pasteur, aliquotadas e armazenados em freezer – 70 °C. A quantificação das partículas virais nos sobrenadantes precipitados e purificados foi avaliada através da técnica de titulação viral por imunodeteção de foco.

### **3.6.2 Cinética de infecção dos DENV-1 recombinantes *in vivo***

Os vírus recombinantes purificados por gradiente de sacarose foram utilizados para inoculação via intracerebral (i.c.) (GOULD; CLEGG, 1985) em camundongos suíços neonatos (até 48 h após o nascimento). A dose viral estabelecida para inoculação com os vírus recombinantes foi de  $10^{2,75}$  ffu diluídos em 40 µL de meio L15/animal (BORBA; STROTTMANN et al., 2012). Além da determinação do número de partículas virais infecciosas presentes no inóculo viral, a equivalência genômica (GE) foi determinada para cada inóculo através da técnica de transcrição reversa e PCR quantitativo em tempo real (RT/qPCR), descrito no item 3.6.2.1.1

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os animais foram acompanhados por 21 dias para verificação de morbidade e mortalidade. Oito dias após infecção (dpi), três animais de cada grupo eram sacrificados por anóxia, utilizando CO<sub>2</sub>, para a coleta do tecido cerebral. Os tecidos cerebrais do *pool* de três animais foram homogeneizados e utilizados para a extração do RNA total (30 mg), utilizando o kit comercial *RNAeasy mini kit* (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi recuperado em 60 µL de tampão de eluição fornecido pelo kit e mantido a –70°C. Além disso, uma porção do homogeneizado foi utilizado para preparação de uma suspensão 10%. Essa suspensão foi utilizada para determinação da progênie viral presente no SNC de camundongo infectados com os DENV-1 recombinantes, por imunodeteção de foco em células C6/36.

Da mesma forma, outros grupos de animais foram inoculados de acordo com os procedimentos descritos acima para realização de uma cinética de infecção com os DENV-1 recombinantes parental vBACDV1 e o vírus triplo mutante vBAC-



E<sub>402</sub>/NS3<sub>209</sub>/NS3<sub>480</sub>, contendo as mutações identificadas na variante neurovirulenta do DENV-1 cepa FGA/NA P6 (E<sub>402</sub>Leu/NS3<sub>209</sub>Ile/NS3<sub>480</sub>Ser). O cérebro de três animais de cada grupo foi coletado e processado individualmente, conforme descrito acima, 6, 8 e 10 dpi para análise da infectividade viral. Além do SNC nós avaliamos a habilidade dos DENV-1 recombinantes replicarem-se em células da medula espinhal dos animais infectados via i.c. Para tanto, a medula espinhal de cada animal foi retirada e utilizada para extração do RNA total, utilizando o kit comercial *RNAeasy mini kit* (QIAGEN).

### 3.6.2.1 Quantificação do RNA viral por RT/qPCR

#### 3.6.2.1.1 Determinação da equivalência genômica (GE)

Para determinação da GE do inóculo viral, uma quantidade conhecida de RNA viral não relacionado (50 ng de RNA do vírus da influenza H1N1) foi misturado aos 140  $\mu$ L do inóculo dos DENV-1 recombinantes, contendo  $10^{2,75}$  ffu, e utilizado para purificação do RNA viral. Em seguida, 250 ng do RNA viral total foram utilizadas para amplificação por RT/qPCR do RNA do DENV-1, utilizando as concentrações recomendadas de *MultiScribe Enzyme plus RNase inhibitor* e *TaqMan Universal RT-PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 400 nM dos oligonucleotídeos específicos para DENV-1 (DENV-1F: 5'-GCTGATGCTGGTGACACCAT- 3' e DENV-1R: 5'-TCGACGAAGTCTCTGTTGCCTAT) e 300 nM da sonda específica para DENV-1 (5'-CCCACGCATCGCATGGCCAT- 3'), de acordo com o protocolo descrito por Poersch et al. (2005). A mesma quantidade de RNA foi utilizada para amplificação do RNA do vírus H1N1 a partir dos oligonucleotídeos e sonda específica para o vírus H1N1, de acordo com o protocolo descrito por Raboni et al., 2011.

As reações de RT/qPCR foram realizadas em sistema de detecção *ABI PRISM 7500* (Applied Biosystem) sob as seguintes condições de temperatura: 1 ciclo de 48°C por 30 min. e 1 ciclo de 95°C por 10 min., seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 seg. e 60°C por 1 min. Os dados da amplificação do RNA do vírus H1N1, obtidos por RT/qPCR, foram utilizados para normalização dos dados de amplificação do RNA do DENV-1.

### **3.6.2.1.2 Análise da replicação dos DENV-1 recombinantes nos tecidos de camundongos infectados**

O RNA viral presente no SNC e medula espinhal de camundongos infectados com os DENV-1 recombinantes e controles foi quantificado em uma reação de RT/qPCR, utilizando o protocolo descrito por Poersch et al. (2005) com oligonucleotídeos e sonda para detecção do RNA do DENV-1 e a concentração recomendada de *MultiScribe Enzyme plus RNase Inhibitor* e *TaqMan Universal RT-PCR Master Mix* (Applied Biosystems).

Os dados da amplificação do RNA viral por RT/qPCR foram normalizados utilizando o gene de expressão constitutiva gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Mus musculus* (*murGAPDH*). Para tanto, 4 µg do RNA extraído dos tecidos de cada camundongo infectado com os DENV-1 recombinantes e controles foi submetido a uma reação de transcrição reversa (cDNA), utilizando o kit *Impron II Reverse Transcriptase* (Promega), seguindo recomendações do fabricante, e 200 µM do oligonucleotídeo iniciador random primer (Invitrogen). A reação foi incubada a 42°C por 1 h. Após o término da reação, as amostras foram diluídas para concentração final de 2 ng/µL com água livre de RNases e utilizado na reação de qPCR contendo 250 nM dos oligonucleotídeos iniciadores específicos de *murGAPDH* (*MurGAPDH-F* 5'- CGACTTCAACAGCAACTCCCCTC- 3' e *MurGAPDH-R* 5'- CACCCTGTTGCTGTAGCCGTATTC- 3' ) e *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems) conforme recomendações do fabricante, e submetidas às seguintes condições de temperatura: 50°C por 2 min., 96°C por 10 min., seguidos de 40 ciclos de 96°C por 15 seg. e 62°C por 30 seg. A curva de dissociação foi utilizada para verificação da especificidade do produto.

### **3.6.2.1.3 Análise do padrão da expressão gênica no sistema nervoso central de camundongos infectados com vírus recombinantes e controles por PCR em tempo real**

Dados anteriores do grupo (BORDIGNON et al., 2008; BORBA, 2010) revelaram o perfil da expressão gênica de vias diferencialmente expressas durante a infecção do SNC de camundongos com cepas neurovirulentas do DENV-1. Com o

intuito de analisar e comparar o perfil da expressão gênica, por RT/qPCR, no tecido cerebral de camundongos individuais infectados com os DENV-1 recombinantes (pBACDV1 e pBAC-E<sub>402</sub>/NS3<sub>209</sub>/NS3<sub>480</sub>) foram escolhidos alguns genes representantes de vias previamente identificadas: IFN- $\beta$  (interferon beta), Usp18 (protease 18 específica de ubiquitina) e Ccl5 (ligante de quimiocina 5 – motivo C-C). Para tanto, o RNA total foi extraído do SNC de cada camundongo utilizando-se o kit comercial *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN). 4  $\mu$ g desse material foi utilizado para converter os mRNA em cDNA, utilizando o kit *Impron II Reverse Transcriptase* (Promega), seguindo recomendações do fabricante, e 10  $\mu$ M do oligonucleotídeo iniciador oligo-dT (Invitrogen). A reação foi incubada por 2 h a 42°C. 10 ng do cDNA resultante foi utilizado para amplificação dos genes por qPCR, utilizando-se o método *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante, e 250 mM de cada par de oligonucleotídeos específicos para cada gene: Usp18 (Usp18-F 5'-CTGCCAACCGAGGAAGAC-3' e Usp18-R 5'-CAATCACGGCAAAGAGTTCATAGT-3'), Ccl5 (Ccl5-F 5'-GTGCCACGTCAAGGAGTATTTCT-3' e Ccl5-R 5'-TGGCGGTTCTTCGAGTGACAA-3') e IFN- $\beta$  (IFN $\beta$  - F 5'-CGCTGCGTTCCTGCTGTG-3' e IFN $\beta$  - R 5'-GATCTTGAAGTCCGCCCTGTAG-3'), descritos por BORDIGNON et al., (2008). Nesse protocolo foram utilizadas as seguintes condições de temperatura: 50°C por 2 min., 96°C por 10 min., seguidos de 40 ciclos de 96°C por 15 seg. e 60°C por 30 seg. e extensão a 72°C por 1 min., em um *ABI PRISM 7500 Detection System* (Applied Biosystem). Curvas de dissociação foram utilizadas para verificar a especificidade do produto. O gene GAPDH murino (*murGAPDH*) foi utilizado para normalizar os resultados de cada um dos genes testados.

### 3.6.3 Cinética de infecção dos DENV-1 recombinantes *in vitro*

#### 3.6.3.1 Infecção em linhagens celulares

As células Huh7.5 (4x10<sup>5</sup> células/poço) e C6/36 (2x10<sup>5</sup> células/poço) foram infectadas com o mock e os vírus recombinantes (vBACDV1, vBAC-E<sub>402</sub>, vBAC-E<sub>405</sub>, vBAC-NS3<sub>209</sub>, vBAC-NS3<sub>435</sub>, vBAC-NS3<sub>480</sub>, vBAC-405/NS3<sub>435</sub>, vBAC-E<sub>402</sub>/NS3<sub>209</sub>,

vBAC-E<sub>402</sub>/NS3<sub>480</sub> e vBAC-E<sub>402</sub>/NS3<sub>209</sub>/NS3<sub>480</sub>). Uma MOI de 5 foi utilizada para infecção em Huh7.5 durante 1 h a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e uma MOI de 1 foi utilizada para infectar células C6/36 pela incubação por 1 h a 28°C. Após este período o inóculo viral das células Huh7.5 e C6/36 foi substituído por meio DMEM/F12 e L15 suplementados, respectivamente. As células foram recolhidas 24, 48 e 72 hpi e analisadas por citometria de fluxo (item 3.6.5.1.1) em FACS Canto II system (Becton & Dickinson, San Jose, CA - BD).

### **3.6.3.1.1 Determinação do número de células infectadas com os DENV-1 recombinantes por citometria de fluxo**

O número de células positivas para a infecção pelos DENV-1 recombinantes foi determinado pela técnica de citometria de fluxo. Após o período determinado de cada condição de infecção, as células foram lavadas em PBS e os receptores de região Fc presentes na superfície celular bloqueados pela incubação em tampão de bloqueio (5% de SFB e 1% de soro humano tipo AB (Lonza) por 20 min. à TA. Em seguida, as células foram fixadas e permeabilizadas com *Cytofix/Cytoperm* (BD) por 20 min. à TA. Após este período as células foram centrifugadas a 500xg por 1 min. e incubadas com anticorpos monoclonais 4G2 (*Flavivirus* específico) por 30 min. a 37°C. As células foram lavadas com tampão Perm/Wash (BD), centrifugadas e incubadas por 30 min a 37°C com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com ficoeritrina (PE) (eBioscience). Posteriormente, as mdDCs foram lavadas duas vezes com tampão Perm/Wash, recuperadas em PBS e analisadas utilizando o equipamento FACS Cantoll (BD).

### **3.6.3.2 Infecção em células primárias humanas**

As células mdDCs humanas de seis doadores voluntários saudáveis, obtidas de acordo com o protocolo descrito no item 3.3.2, foram utilizadas para avaliar a capacidade infectiva dos DENV-1 recombinantes (pBACDV1, pBACDV1-NS3<sub>435</sub> e pBACDV1-NS3<sub>480</sub>). As culturas de células foram infectadas por 2 h com mock ou com os DENV-1 recombinantes em uma MOI de 5. Após a remoção do inóculo, as células foram lavadas com meio RPMI e transferidas para uma placa de 24 poços e

cultivadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As mdDCs e o sobrenadante da cultura celular foram recuperados em 2, 8, 24 e 48 hpi. As células foram utilizadas tanto para extração do RNA total utilizando o *RNeasy* mini kit (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante, e determinação do RNA viral e mRNA de genes de resposta imune por RT/qPCR quanto para determinação do número de mdDCs infectadas por citometria de fluxo, conforme descrito no item 3.6.3.1.1. O sobrenadante de cada cultura celular, mantido a -70°C, foi utilizado para quantificação dos títulos virais pelo ensaio de imunodeteção por foco em células C6/36 (item 3.6.1.2) e quantificação de citocinas por *Cytometric Bead Array* (CBA) (BD) por ensaio imunoenzimático em formato ELISA (pbl).

### **3.6.3.2.1 Determinação de citocinas**

Para quantificação do IFN- $\beta$  no sobrenadante das culturas de mdDCs infectadas com mock e com os DENV-1 recombinantes utilizamos o kit de ELISA *sandwich VeriKine Human IFN- $\beta$*  (pbl), seguindo as instruções do fabricante. A absorbância a 450 nm foi determinada em espectrofotômetro *Synergy H1 hibrid Reader* (BioTek) após a reação enzimática e adição do substrato, seguida pela adição de tampão de parada. A densidade ótica (DO) das amostras e da curva padrão foi utilizada para determinar o título de IFN- $\beta$  nas amostras.

A técnica de CBA foi utilizada para quantificação de IFN alfa (IFN- $\alpha$ ) no sobrenadante das culturas de mdDCs de acordo com as instruções do fabricante. A técnica baseia-se na ligação imunológica entre a proteína solúvel e anticorpos específicos contra a proteína, ligados a esferas fluorescentes. Desta forma, o sobrenadante foi incubado à temperatura ambiente (TA) por 3 h, lavadas e recuperadas em tampão específico e analisadas pela técnica de citometria de fluxo em FACS Canto (BD). Os dados foram analisados utilizando-se o programa FlowJo 7.2.5 (Tree Star, Ashland, OR).

### **3.6.3.2.2 Análise da replicação viral e do padrão da expressão de genes da resposta imune por RT/qPCR em células mdDCs**

O RNA das 24 culturas de mdDCs infectadas com o mock e com os DENV-1 recombinantes em cada tempo da cinética (2, 8, 24 e 48 h) foi extraído utilizando-se

o kit *QIAamp viral RNA mini kit* (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante e eluído com 60 µL de água livre de nuclease fornecida no kit. A taxa de replicação viral foi determinada por RT/qPCR. Os RNAs (4 ug) foram convertidos em cDNA, utilizando-se o kit *Impron II reverse trasnscriptase* (Promega) e 200 µM do oligonucleotídeo iniciador random primer (Invitrogen) sob incubação a 42°C por 1 h. Duzentos ng de cDNA foram utilizados para amplificação por qPCR utilizando 4 µM de oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada um dos genes alvo TLR3 (CNTLRF- 5'GTGCCGTCTATTGCCACACACTT3' e CNTLRR- 5'TGGTGGAGGATGCACACAGCAT3'), TLR7 (CNTLR7F- 5'TGGCACCTCTCATGCTCTGCTC3' e CNTLR7R- 5'ACCATCTAGCCCCAAGGAGTTTGG3'), IFN-β (CNIFNbF – 5'CATCAACTATAAGCAGCTCCA3') e IFN-α (CNIFNAp\_huF- 5'TGCAGGAGGTGAGGGTGGGA3' e CNIFNAp\_huR- 5'CTCCCAGGCACAAGGGCTGT 3') ou para amplificação do gene da proteína NS3 viral (CN10-F 5'ACCCGGCACATCTGGATC3' e NS3pro-R 5'GTTTCTTTTCTTAAACACCTC 3') e *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems) conforme instruções do fabricante. Para a amplificação do material genético do vírus as seguintes condições de temperatura foram utilizadas: 50°C por 2 min., 96°C por 10 min., seguidos de 40 ciclos de 96°C por 15 seg. e 60°C por 30 seg., em um sistema de detecção *ABI PRISM 7500 Detection System* (Applied Biosystem). Os genes alvos de resposta imune foram amplificados sob as seguintes temperaturas: 50°C por 2 min., 96°C por 10 min., seguidos de 40 ciclos de 96°C por 15 seg., 58°C por 30 seg. e 72 °C por 1 min. Curvas de dissociação foram utilizadas para verificar a especificidade do produto. O gene de expressão constitutiva 18S (18S-F 5' CACGGCCGGTACAGTGAAAC 3' e 18S-R 5' CCCGTCGGCATGTATTAGCT 3') foi incluído nas análises para normalização dos dados (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

### 3.6.3.2.3 Sequenciamento nucleotídico

Para determinar a sequência nucleotídica completa dos DENV-1 recombinantes 48 hpi em mdDCs, o RNA viral, extraído do sedimento celular com o kit *QIAamp viral RNA mini kit* (Qiagen), foi convertido em cópia complementar de DNA (cDNA) utilizando o kit *Improm II Reverse Transcriptase* (Promega) e o

oligonucleotídeo iniciador random primer (100 pmol/μL – Invitrogen), seguindo as especificações do kit. Os cDNAs foram utilizados como molde para amplificação por PCR de seis fragmentos que cobriam o genoma inteiro do vírus, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para DENV-1 (Quadro 3.1) e o kit comercial *long range PCR* (Qiagen), seguindo instruções do fabricante. As reações foram submetidas ao seguinte ciclo de temperatura: 93°C por 5 min., 40 ciclos de 93°C por 30 seg., 52°C por 30 seg. e 68°C por 4 min. Alíquotas de 10% da reação de PCR foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 0,5 μg/mL de brometo de etídio. Para a purificação, os amplicons foram excisados de géis de agarose e purificados utilizando o kit comercial *QIAquick gel extraction kit* (QIAGEN), seguindo instruções do fabricante e recuperados em 30 a 60 μL de tampão EB fornecido no kit.

PCR	Nomenclatura Oligonucleotídeo	Sequência nucleotídica 5'-3'	Orientação (Polaridade)	Região genômica	Tamanho do fragmento
1	D1 USA DomB-	GCGGCCGCTAATACGACTCACTATAGAGTTGTTAGTCTACGTGG	Positiva	1.111 – 1.124	2.121pb
		TGCGGTACCGCTGCTTCTTTCTTGAACCA	Negativa	2.129 – 2.157	
2	D1 DomB+ CN13	ACGGGATCCGTGATGTGCACAGGCTCATTT	Positiva	2.129 - 2157	1954 pb
		GAAGAACCTCTCTGGATG	Negativa	3.763 – 3.780	
3	CN2 CN20	GCGTATCAATAATGATTG	Positiva	3.516 – 3.533	2.227 pb
		GTGACAACATAGTCCCAGTC	Negativa	2.126 – 2.157	
4	+28mer CN21	CCGCTCGAGATATCTTCCAGCCATAGTCCGTGAGGC	Positiva	2.129 – 2.160	1.758 pb
		CGGCGGCTACATGGCCAATCCC	Negativa	6.865 - 6884	
5	CN38 D8	GACGCTAAGAGCCCAGAATGCTCTGG	Positiva	6.427 – 6.452	2.546 pb
		TGCCITTTCCAACTCTCC	Negativa	8.957 – 8.974	
6	D15 CN16	GCAAAAACGAGGCACAGCA	Positiva	8.666 – 8.683	1.351 pb
		CCCTATTCCACACTG	Negativa	10.002 – 10.016	
7	CN33 D10	GGAGAGACCTGAGACTAGCGGC	Positiva	9.875 – 9897	860 pb
		CCGCTCGAGGCTCTTCGAGAACCTGTTGATTCAACAGC	Negativa	10.715 – 10.735	

**Quadro 3.1 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação por PCR do genoma completo dos DENV-1.**

Os fragmentos e os oligonucleotídeos iniciadores específicos foram enviados para sequenciamento na empresa Macrogen (Seul, Coréia do Sul). As sequências nucleotídicas foram analisadas através do pacote de programas e do software CLUSTALW do programa Bioedit (Invitrogen).

### 3.7 Ensaio de ligação viral a receptors celulares de superfície

Para determinar o papel das mutações nas posições E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub> dos DENV-1 na modulação da habilidade de ligação a células hospedeira nós realizamos ensaios de *binding* em células Neuro 2a. Primeiramente, os vírus presentes no sobrenadante das culturas de células C6/36 infectadas com os DENV-1

recombinantes vBACDV1, vBAC-E<sub>402</sub>, vBAC-E<sub>405</sub> foram concentrados em filtros Amicon contendo membrana seletiva de 100K e utilizados para os ensaios de ligação a célula hospedeira. Para os ensaios,  $2 \times 10^5$  células Neuro 2a foram cultivadas em câmaras de vidro do tipo *LabTek* (Nunc) e cultivadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Após este período, as células lavadas com PBS gelado e incubadas com os DENV-1 recombinantes a uma MOI de 100 em meio Opti-Men, durante 1h a 4°C. As células eram então lavadas três vezes com PBS gelado para remoção dos vírus não adsorvidos e então lisadas para extração do RNA total utilizando o kit QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. O número de partículas virais ligadas as células Neuro 2a foi determinado por RT/qPCR em três experimentos independentes, conforme descrito no item 3.6.2.1.2.

### **3.8 Construção de genomas infecciosos para o estudo das mutações nas proteínas E e NS3 do DENV-1**

#### **3.8.1 Clones quiméricos recombinantes de YF/DEN-1**

##### **3.8.1.1 Amplificação dos fragmentos contendo as mutações de interesse na proteína E**

A amplificação das mutações em estudo, localizadas nas proteínas de envelope (Tabela 1.1, item 1.5), foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR - do inglês, *polymerase chain reaction*) de fusão, utilizando como molde o genoma viral do clone infeccioso pACYF/DEN-1. A amplificação dos fragmentos consistiu em duas reações: na primeira reação eram amplificados dois fragmentos (fragm A e fragm B) para cada mutação, e na segunda, também chamada PCR de fusão, era feita a fusão dos dois fragmentos (fragm fusão) por complementariedade das sequências dos oligonucleotídeos iniciadores de polaridade negativa do fragm A e positiva do fragm B, que continham a mutação (Quadro 3.2). Os oligonucleotídeos iniciadores complementares de polaridade negativa do fragm A e positiva do fragm B foram desenhados para conter, além da mutação de interesse, uma mutação silenciosa que modificava a sequência de um sítio de enzima de restrição, o que



facilitava a triagem de possíveis clones nas etapas posteriores. Os oligonucleotídeos para substituição do códon referente a posição E<sub>405</sub> foram desenhados para conter a sequência da enzima BstBI. A mutação E<sub>402</sub> já está localizada na sequência do sítio da enzima BstBI, também podendo, portanto, ser utilizado na triagem dos clones. As reações de PCR foram realizadas utilizando o kit comercial *Long range* (Qiagen), seguindo instruções do fabricante. A amplificação dos fragm A e B foi submetida aos seguintes ciclos: 95°C por 3 min., 35 ciclos de 95°C por 15 seg., 52°C por 30 seg. e 68°C por 2 min. e 30 seg., enquanto a amplificação do PCR de fusão foi submetida a 95°C por 3 min., 35 ciclos de 95°C por 15 seg., 55°C por 30 seg. e 68°C por 3 min. e 30 seg. Alíquotas de 10% das reações de PCR foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio.

Mutação	Nomenclatura Oligonucleotídeo	Sequência nucleotídica 5'-3'	Orientação (Polaridade)	Região genômica	Tamanho do fragmento	Tamanho do fragmento de fusão
E 402	EcoNsi	ATGCATTGAAGCTA	Positiva	1.111 – 1.124		
	E402MREV	CCTCGGGCGGTTGCTTCGA <sub>g</sub> CATTTTCCC	Negativa mutada	2.129 – 2.157	1.039pb	3.092pb
	E402MFORW	GGGAAAATG <sub>c</sub> TCGAAGCAACCGCCCGAGG	Positiva mutada	2.129 - 2157	2.081pb	
	YF15	TGCCAGCACTCCCACTAGACC	Negativa			
E 405	EcoNsi	ATGCATTGAAGCTA	Positiva			
	E405MREV	CCTCGGGCGG <sub>a</sub> TTGCTT <sub>Ca</sub> AACATTTCCCTAT	Negativa mutada	2.126 – 2.157	1.039pb	3.092pb
	E405MFORW	GGGAAAATGTT <sub>t</sub> GAAGCA <sub>i</sub> CGCCCGAGGAGC	Positiva mutada	2.129 – 2.160	2.081pb	
	YF15	TGCCAGCACTCCCACTAGACC	Negativa			

**Quadro 3.2 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos contendo as mutações de interesse para clonagem em vetor pACYF/DENV-1.** O nucleotídeo destacado em letra minúscula refere-se ao sítio mutado na posição de interesse.

### 3.8.1.2 Minipreparação do genoma infeccioso pBACDV1

O genoma infeccioso quimérico pACYF/DEN-1 (MATEU et al., 2007) foi construído em um cromossomo artificial de bacteriófago PI, vetor de baixa cópia, e contém os genes da região prM-E do DENV-1 cepa VeMir95 (isolado venezuelano do genótipo V – número de acesso no *GenBank* AF425635) no genoma do vírus da febre amarela (YFV - do inglês, *yellow fever virus*) 17D (número de acesso no *GenBank* K02749), a sequência do promotor da SP6 RNA polimerase (SP6 prom) e o sítio de restrição XhoI, imediatamente após o término do genoma viral. O vetor possui marcador de seleção para o antibiótico ampicilina

Para a purificação do DNA plasmidial, bactérias DH5α transformadas com o genoma infeccioso pACYF/DEN-1 eram crescidas em 20 mL de meio *Terrific Broth*

(TB) líquido suplementado com 20 µg/mL de ampicilina e cultivados a 30°C por 16 h sob agitação constante. As culturas crescidas em meio líquido eram sedimentadas por uma breve centrifugação para minipreparação dos plasmídeos com o kit *Wizard Plus SV Minipreps kit* (Promega), de acordo com protocolo descrito pelo fabricante. Os DNAs eram recuperados em 50 µL de água livre de nucleases fornecida no kit.

### **3.8.1.3 Clonagem e seleção dos clones recombinantes dos pACYF/DEN-1**

O genoma infeccioso pACYF/DEN-1 e os fragmentos de PCR purificados foram tratados com as enzimas de restrição *NarI* 10 U/µL (Promega) e *NsiI* 10 U/µL (Biolabs), de acordo com os tampões e condições descritas pelo fabricante das enzimas. A substituição dos fragmentos liberados do genoma infeccioso pACYF/DEN-1 foi realizada pela ligação dos respectivos fragmentos mutados, seguindo o protocolo da enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs ou USB), para um volume final de reação de 15 µL. As reações foram incubadas a 16°C por 16 h. As quantidades de DNA necessárias para as reações de ligação entre o vetor pACYF/DEN-1 e os insertos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose e quantificados utilizando espectrofotômetro (Nanovue – GE). A proporção de 3:1 (inserto:vetor) foi utilizada, partindo de 50 ng de vetor. Após o período de incubação, as reações de ligações foram purificadas pela técnica de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. Dessa forma, para um volume final de 50 µL adicionou-se 12 µL 1M NaCl, 1 µL SDS10%, 2 µL 0.5M EDTA e 1 µL de glicogênio de ostra (10 mg/mL) em cada tubo. As amostras foram extraídas com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). A fração aquosa, contendo os ácidos nucleicos foi precipitada com 3 volumes de etanol absoluto, a –20°C por 16 h. Após este período, o material foi centrifugado a 16.000xg por 20 min. a 4°C, lavado com etanol 70% e centrifugado novamente por 10 min. O DNA foi recuperado em 5µL de água ultrapura e utilizado para transformar bactérias eletrocompetentes DH5α (Invitrogen).

Para a transformação bacteriana com o DNA recombinante, as células bacterianas foram descongeladas em banho de gelo (1 tubo com 100µL para cada transformação) e todo o volume das ligações foi adicionado diretamente nos tubos contendo as bactérias competentes. A mistura foi então submetida à eletroporação a

2,5 Kv, 25  $\mu$ F e 200  $\Omega$ . Em seguida, 900  $\mu$ L de meio SOC foram adicionados e os tubos incubados por 1 h a 37°C sob agitação constante para a recuperação das células transformadas. Após este período, alíquotas de 50  $\mu$ L e 100  $\mu$ L das bactérias transformadas foram semeadas em placas contendo meio TB sólido suplementado com 20 $\mu$ g/mL de ampicilina e incubadas a 30°C por 16 h. As possíveis colônias recombinantes foram transferidas para uma nova placa numerada contendo o mesmo meio descrito acima, para a identificação de cada eventual clone e incubadas a 30°C por 16 h.

Os clones recombinantes foram triados pela técnica de PCR de colônia. Cada colônia era passada da placa mãe, com auxílio de um palito de dente estéril, para um tubo eppendorf (identificado com o número correspondente). Em seguida, 10  $\mu$ L de água ultrapura era adicionada a cada tubo e esse incubado a 98°C por 5 min. Os tubos eram então centrifugados a 16.000xg por 30 seg. e o sobrenadante (1  $\mu$ L) utilizado como molde para a reação de PCR, utilizando o kit Taq DNA Polimerase (5 U/ $\mu$ L, Invitrogen). Os oligonucleotídeos D1DomB de polaridade positiva (5'-ACGGGATCCGTGATGTGCACAGGCTCATTT-3') e YF13 de polaridade negativa (5'-CTCTTCAACTGATGTTCCAAT-3') foram utilizados para amplificação das regiões mutadas. As reações foram submetidas a um ciclo a 94°C por 3 min. e a 35 ciclos a 94°C por 30 seg., 52°C por 30 seg. e 72°C por 1 min. Alíquotas das amostras de DNA amplificadas (1:10) foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 0.5  $\mu$ g/mL de brometo de etídio.

Os clones que apresentaram amplificação positiva por PCR foram inoculadas em 20 mL de meio TB líquido suplementado com 20  $\mu$ g/mL de ampicilina e crescidos a 30°C por 16 horas sob agitação constante. As culturas foram utilizadas para purificação do DNA plasmidial, como já descrito anteriormente no item 3.8.1.2. A sequência nucleotídica dos clones recombinantes foram confirmadas por sequenciamento pela empresa Macrogen (Seul, Coréia do Sul), utilizando os oligonucleotídeos D1DomB de polaridade positiva (sequência referida acima) e D1 DomB de polaridade negativa (5'-TGCGGTACCGCTGCTTCCTTTCTTGAACCA-3').

### 3.8.1.4 Geração dos vírus quiméricos recombinantes

#### 3.8.1.4.1 Transcrição e transfecção dos RNAs recombinantes

Os DNAs plasmidiais recombinantes foram linearizadas pela digestão com a enzima de restrição XhoI 20 U/ $\mu$ L (Biolabs), de acordo com os tampões e condições descritas pelo fabricante das enzimas. A reação foi incubada a 37°C por 16 h. A purificação da digestão foi feita pela técnica de extração de ácidos nucleicos por fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, conforme descrito no item 3.8.1.3, utilizando-se reagentes livres de nucleases. O DNA foi recuperado em 5  $\mu$ L de água livre de nucleases e utilizado como molde para a reação de transcrição *in vitro*, utilizando o kit comercial *SP6/T7 transcription* (Roche). A reação foi composta por 2,5  $\mu$ L do DNA linearizado e purificado, 1  $\mu$ L de tampão de reação 10x, 1  $\mu$ L de ATP 75mM, 1  $\mu$ L de CTP 75mM, 1  $\mu$ L de UTP 75mM, 0,5  $\mu$ L de GTP 75mM, 1  $\mu$ L de 40mM *RNA cap structure analog* m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G (Biolabs), 1  $\mu$ L de SP6 RNA polimerase e água livre de nucleases para um volume final de 10  $\mu$ L. Após a incubação a 37°C por 3 h, alíquotas de 5% da reação de transcrição foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 0,5  $\mu$ g/mL de brometo de etídio, livres de nucleases.

O RNA viral recombinante foi utilizado para transfectar células C6/36 (1  $\mu$ g de RNA para  $1.10^5$  células), semeadas no dia anterior em placas de cultivo celular de 24 poços, utilizando-se o método de transfecção por lipossomos. Para transfecção das células, primeiramente a mistura de 2,5  $\mu$ g de lipofectina (Invitrogen) e meio Opti-MEM (Gibco/Invitrogen) na proporção de 1:8 foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. A seguir a essa mistura foi adicionado meio Opti-MEM (proporção de 1:1) contendo o RNA viral transcrito *in vitro* ou meio sem RNA (mock) e a esta mais meio Opti-MEM (proporção 1:6) foi adicionado. As células foram lavadas uma vez com 1 mL de Opti-MEM. O meio das células era então removido e substituído pela mistura contendo lipofectina, RNA e meio e as células incubadas a 28°C por 3 h. Após este período o meio foi removido e substituído por meio L-15 (Gibco/Invitrogen) suplementado. As placas foram novamente incubadas a 28°C e em diferentes pontos pós-transfecção (48, 72, 96 e 120 h) os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados a -70°C para posterior ação viral (item 3.6.2). O tapete

celular foi fixado com uma mistura de metanol acetona (1:1) e mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o seu processamento para imunofluorescência.

### **3.8.1.5 Detecção de proteínas virais pela técnica de imunofluorescência**

Para análise da transfecção dos vírus quiméricos recombinantes por imunofluorescência, as células C6/36 que haviam sido fixadas após a cinética de transfecção, foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 45 min. com anticorpos policlonais anti-YFV (diluídos 1:100 em PBS), os quais foram produzidos em nosso laboratório, para a verificação da expressão de proteínas virais. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas por mais 45 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich) diluído 1:200, contendo 0,3% (v/v) de 10 mg/mL azul de Evans. As células foram lavadas cinco vezes com PBS e após estarem secas foi adicionada solução de PBS/glicerol 10%. As imagens das imunofluorescências foram captadas com um microscópio Nikon Eclipse TE300 (Nikon, Tokyo, Japão) acoplado a uma câmera CoolSNAP<sup>TM</sup>Pro<sub>cf</sub> (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA). A visualização e edição das imagens foi realizada com auxílio do software Image-Pro PLUS v.4.5.1.29 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA).

### **3.8.1.6 Análise comparativa da infecção dos vírus recombinantes quiméricos em células de inseto C6/36**

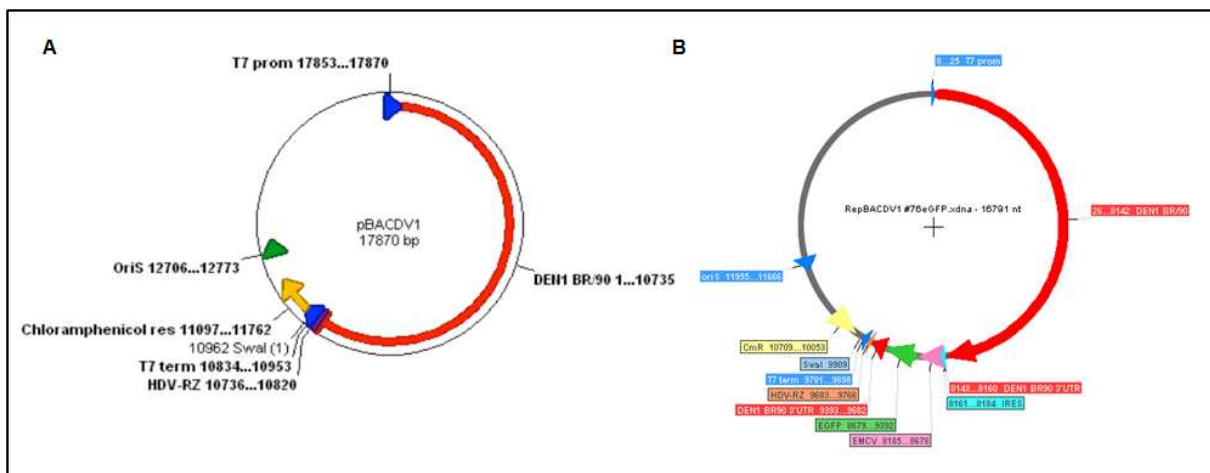
Os vírus recombinantes quiméricos YF/DEN-1, YF/DEN-1-E<sub>402</sub> e YF/DEN-1-E<sub>405</sub> e foram recuperados do sobrenadante da cultura celular de células C6/36 transfectadas com os RNAs recombinantes quiméricos, titulados em células C6/36 e utilizados para análise do efeito citopático (CPE) em cultura celular ( $5 \times 10^5$  células C6/36) em uma MOI de 0,01. O mock foi igualmente processado. Para tanto, os vírus foram diluídos em meio L15 sem soro e utilizados para infecção em células C6/36 durante 1 h a  $28^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, o inóculo viral era substituído por meio L15 suplementado e as infecções acompanhadas por até 7 dpi. Durante este período as células eram visualizadas diariamente em microscópio óptico invertido (Nikon Eclipse TE300) para observação e identificação do aparecimento de eCPE. Após 7 dpi os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para posterior

titulação, conforme descrito no item 3.6.1.2 O tapete celular foi fixado em solução metanol acetona (proporção 1:1) e mantidos a -20°C até o seu processamento para imunofluorescência.

### 3.8.2 Construção de replicons subgenômicos do DENV-1

Os replicons subgenômicos do DENV-1 foram gerados a partir dos clones infecciosos pBACDV-1 (Figura 3.1) contendo as mutações de interesse na proteína NS3 (BORBA et al., 2012). Para tanto, a porção 5' do genoma dos clones infecciosos de DENV-1 foram substituídas pelo fragmento amplificado por PCR a partir do replicon subgenômico de DENV-1 #76eGFP (Figura 3.1). Após a amplificação por PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores D1USA (GCGGCCGCTAATACGACTCACTACGACTCACTATAGAGTTG) e D18 (5' CCTTGGGCCAAAATTCC 3') o fragmento resultante de 592 pb foi digerido com as endonucleases de restrição NotI e MluI e clonado em pBACDV-1, pBACDV1-NS3<sub>209</sub>, pBACDV1-NS3<sub>435</sub> e pBACDV1-NS3<sub>480</sub>, previamente digeridos com as mesmas endonucleases de restrição, a enzima T4 DNA ligase (Biolabs), seguindo as recomendações do fabricante. Para a reação de ligação utilizou-se a relação de 3:1 (inserto:vetor), a partir de 50 ng de plasmídeo previamente digerido. As reações de ligação foram utilizadas para transformar células bacterianas da cepa TOP10. Dessa forma, o volume total da ligação foi misturado com as células quimicamente competentes da linhagem TOP10 (Invitrogen) de *E. coli* e incubado em banho de gelo por 30 min. Em seguida, as bactérias foram transformadas com o DNA recombinante através do choque térmico a 42°C por 40 seg. e recuperadas pela adição de 600 µL de meio SOC e incubação a 37°C, sob agitação constante por 1 h. Após este período, alíquotas de 100 µL e 200 µL das bactérias transformadas foram semeadas em placas contendo meio TB sólido suplementado com 15 µg/mL de cloranfenicol e incubadas a 30°C por 16 h. Os clones foram triados por PCR de colônia, conforme descrito no item 3.8.1.3, e o sucesso da estratégia de clonagem foi avaliado pelo sequenciamento nucleotídico realizado pela empresa MacroGen (Seul, Coréia do Sul). O DNA plasmidial de cada clone infeccioso foi utilizado como molde para a amplificação por PCR de fragmentos que compreendiam o genoma completo do RNA subgenômico do vírus, utilizando o kit comercial *long range PCR*

(Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante, e oligonucleotídeos específicos descritos no item 3.6.5.2.3, exceto pelo produto de PCR 1 que foi amplificado com a utilização dos primers D1+ (5' GCGGCCGCTAATACGACTCACTATAGAGTTGTTAGTCTACGTGG 3') e CN13- (5' GAAGAACCTCTCTGGATG 3'). As reações foram submetidas ao seguinte ciclo de temperatura: 93°C por 5 min., 40 ciclos de 93°C por 30 seg., 52°C por 30 seg. e 68°C por 4 min. A identidade desses fragmentos foi determinada por sequenciamento nucleotídico pela empresa Macrogen (Seul, Coréia do Sul), utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos (Quadro 3.2 item 3.6.5.2.3).



**Figura 3.1 – Representação esquemática dos clones de DENV-1. A.** mapa do genoma infeccioso pBACDV1. **B.** mapa do replicons subgenômico do DENV-1 contendo o gene repórter GFP (RepBACDV1 #76eGFP).

### 3.8.2.1 Transcrição e transfecção dos RNAs subgenômicos recombinantes em cultura de células

Os DNAs plasmidiais recombinantes foram linearizadas pela digestão com a enzima de restrição Swa I 10 U/ $\mu$ L (Biolabs), de acordo com os tampões e condições descritas pelo fabricante das enzimas. A reação foi incubada a 25°C por 16 h. A purificação da digestão foi feita pela técnica de extração de ácidos nucleicos por fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, conforme descrito no item 3.8.1.3, utilizando-se reagentes livres de nucleases. O DNA foi recuperado em 5  $\mu$ L de água livre de nucleases e 0,8  $\mu$ g do DNA linearizado foi utilizado como molde para a reação de transcrição *in vitro*, utilizando o kit comercial MEGAscript® T7 High Yield Transcription Kit (Ambion) e 40mM RNA cap structure analog m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G (Biolabs). Após a

incubação da reação a 37°C por 3 h, esta foi tratada com 2 U de DNase turbo (Ambion) por 15 min. a 37°C. Em seguida, o RNA transcrito foi purificado com o *RNeasy mini kit* (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante, visualizado em gel de agarose e quantificado em fluorímetro Qubit (Invitrogen), utilizando o kit *Quant-it RNA assay* (Invitrogen).

Os RNAs foram utilizados para transfectar células C6/36 pelo método de lipofectina, conforme descrito no item 3.8.1.4.1, ou por eletroporação utilizando a tecnologia nucleofactor (Lonza) e o kit *Amaza cell line nucleofactor kit L* (Lonza), de acordo com as recomendações do fabricante. As mdDCs foram transfectadas com os RNAs recombinantes subgenômicos ou com o mock utilizando o kit otimizado para transfecção de DCs *Amaza human dendritic cell nucleofactor* (Lonza) e o protocolo U-002, de acordo com as recomendações. Após as transfecções as células foram cultivadas conforme descrição nos itens 3.3.1.

As mdDCs e o sobrenadante da cultura celular foram recuperados em 8, 24 e 48 hpi. As células foram utilizadas tanto para obtenção do RNA total, utilizando o *RNAeasy mini kit* (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante, quanto para análise da ativação celular e quantificação da porcentagem de células infectadas, por citometria de fluxo.

### **3.9 Produção de anticorpos monoclonais**

#### **3.9.1 Obtenção da proteína recombinante NS3 helicase do DENV-1**

O RNA do DENV-1 cepa FGA89 extraído a partir de células C6/36 infectadas, utilizando o kit para extração viral (Qiagen), foi utilizado como molde para amplificação por RT-PCR da seqüência correspondente ao domínio helicase da proteína NS3 (NS3<sub>hel</sub>), aminoácidos 169-619, utilizando oligonucleotídeos específicos, contendo os sítios de clivagem das enzimas de restrição BamHI e HindIII (D1NS3hBam5' CGGGATCCAAAGCATCACAAAGAAGGGCCCCTACCA e D1NS3hHind3' GGGGAAAGCTTTCTTCTTCCTGCTGCAA<sup>ACTC</sup> – a seqüência sublinhada corresponde ao sítio de clivagem da enzima de restrição BamHI e HindIII, respectivamente. As reações foram realizadas utilizando-se o kit *long range PCR* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante e submetidas a um ciclo



de temperatura de: 94°C por 2 min; 35 ciclos de 94° C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 68°C por 1 min. e 30 seg. Os amplicons resultantes foram purificados com o kit *high pure PCR* (Roche), ressuspensos em 50 µL de água ultrapura e digeridos com as enzimas de restrição BamHI (20 U/µL - New England Biolabs) e Hind III (20 U/µL Biolabs), de acordo com as especificações do fabricante. Os produtos foram purificados com o kit *RNAeasy mini Kit* (QIAGEN) e clonados no plasmídeo pET28 (Novagen), previamente digerido com as mesmas endonucleases de restrição, utilizando a enzima T4 DNA ligase (Biolabs ou USB), seguindo as recomendações do fabricante. Para a reação de ligação utilizou-se a relação de 3:1 (inserto:vetor), a partir de 50 ng de plasmídeo previamente digerido. O produto da reação de ligação foi transformado em bactérias da linhagem TOP10 cálcio competente (Invitrogen), conforme descrito no item 3.8.2. Os potenciais clones recombinantes foram triados por PCR de colônia (item 3.8.1.3), utilizando os oligonucleotídeos específicos citados acima. O DNA plasmidial dos possíveis clones recombinantes foi avaliado pela técnica de sequenciamento nucleotídico pela empresa Macrogen, utilizando os oligonucleotídeos do vetor T7 *promoter* e T7 *terminator*.

As proteínas recombinantes foram expressas em bactérias *E. coli* cepa Rossetta 2 (DE3) (Novagen) ou cepa Rosetta-gami 2 (DE3) (Novagen). A partir de uma cultura saturada de *E. coli* Rossetta (DE3)-pET28aNS3hel FGA/89 uma diluição 1:50 em 1 L de volume final de meio LB suplementado com os antibióticos correspondentes, sulfato de canamicina (25 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL) até uma DO<sub>600nm</sub> de 0.6. As condições de indução para a expressão da proteína recombinante na cepa Rossetta 2 (DE3) consistiu em incubar a cultura com 0,4 mM de IPTG (Promega) a 18°C por 16 h, já a condição para a expressão da proteína recombinante na cepa Rosetta-gami 2 (DE3) consistiu em incubar a cultura com 0,4 mM de IPTG (Promega) a 30°C por 5 h.

Após o período de indução, as células foram centrifugadas a 10.000xg e o sedimento celular ressuspenso em solução de lise (50 mM TrisHCl, pH 7.5, 0,3 M NaCl). As células foram lisadas por dois ciclos de congelamento (-70°C) e descongelamento seguido de sonicação (3 x 20 seg. com pausa de 30 seg.). O lisado foi clarificado por centrifugação de 30 min, 12.000xg a 4°C. O sobrenadante foi purificado por afinidade da cauda de histidinas, co-expressa com a proteína recombinante (6xHis), ao metal catiônico divalente (Ni<sup>2+</sup>) (Qiagen). Após incubação

de 20 min. a 4°C, a resina foi lavada 2X com tampão de lavagem (50 mM TrisHCl, pH 7.5, 0,3 M NaCl, 10 mM imidazol) e as proteínas eluídas utilizando tampões de eluição A (50 mM TrisHCl, pH 7.5, 0,3 M NaCl, 150 mM) e B (50 mM TrisHCl, pH 7.5, 0,3 M NaCl, 150 mM, 300 mM imidazol). As proteínas foram estocadas a -20° até sua utilização. A concentração das proteínas recombinantes foi calculada com base na sua absorbância registrada em fluorímetro Qubit (Invitrogen), utilizando o kit Qubit™ *Protein Assay* (Invitrogen), e seu coeficiente de extinção molar ( $E = 68,330 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### 3.9.2 Procedimento de imunização

Para a geração de anticorpos monoclonais específicos contra a proteína NS3<sub>hel</sub> do DENV, o antígeno recombinante NS3<sub>hel</sub> do DENV-1, cuja produção está descrita no item 3.8.2, foi utilizado para a imunização de quatro camundongos isogênicos da linhagem Balb/c, com aproximadamente 6 semanas de idade. Os animais foram imunizados com 5 doses do antígeno recombinante administradas por diferentes vias de inoculação: intraperitonal (I.P.), subcutânea (S.C.) e intravenosa (I.V.). O intervalo entre as imunizações foi de 7 dias. A primeira imunização consistiu na inoculação via I.P. de 50 ug/dose/animal da proteína NS3 helicase misturada com adjuvante incompleto de Freund na proporção de 1:1. Sete dias após a primeira inoculação, uma nova dose de 50 ug/animal do antígeno recombinante misturado ao adjuvante alugel (1:1) foi administrada via S.C. Posteriormente, duas inoculações adicionais foram realizadas seguindo o mesmo protocolo descrito. A última imunização foi determinada pela inoculação de 20 ng de proteína via I.V., na ausência de adjuvante.

Torna-se importante ressaltar que antes das imunizações, o soro dos animais (pré-imunização) foi avaliado em ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e western blotting para verificar a ausência de anticorpos inespecíficos no reconhecimento da proteína NS3 do DENV. Da mesma forma, três dias após a última imunização, amostras de sangue total foram coletadas via caudal e centrifugadas por 5 min. a 3000 rpm para obtenção dos soros (pós-imunização) e avaliação da soroconversão dos animais através de ensaios imunoenzimáticos.

### 3.9.3 Processamento das células para fusão

Após a confirmação da soroconversão dos animais, os mesmos foram anestesiados via I.P. com solução de anestésico e sedativo cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina (Vetaset) na concentração de 100 mg/kg<sup>-1</sup> de ketamina, 1mg/kg<sup>-1</sup> de xilazina, administrado em um volume de 0,1 mL/10 g de peso animal. Após sinais visíveis de anestesia constatados por reflexo óculo motor e reação ao pinçamento das patas posteriores realizou-se o procedimento de punção cardíaca para a retirada do soro pós-imune (aproximadamente 1 mL/animal). Após esse procedimento, e ainda sob o efeito da solução anestésico-sedativa, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e o baço retirado, de forma asséptica, através de incisão cirúrgica. O baço de cada animal foi macerado com o auxílio de lâminas estéreis de ponta fosca em placa de petri contendo cerca de 10 mL de meio RPMI 1640 sem SFB (Gibco). A suspensão de células resultante foi filtrada em ponteiras preenchidas com filtro de nylon. O material filtrado foi transferido para tubo cônico contendo 30 mL de meio RPMI sem soro e centrifugado a 1.500 rpm por 10 min. a 4°C. As células foram ressuspensas em 5 mL de solução de lise de hemácias (168 mM de cloreto de amônio gelado) e incubadas por 5 min. em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se 45 mL de meio RPMI 1640 sem SFB e centrifugou-se a 1.500 rpm por 10 min. a 4°C. Esse procedimento foi realizado duas vezes para assegurar a retirada do cloreto de amônio da suspensão de linfócitos. A contagem celular foi realizada em câmara de *NeuBauer*.

Os linfócitos murinos e as células mielômicas da linhagem Ag8xP3653, previamente crescidas em garrafas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (Nunc, Roskilde, Denmark) contendo meio RPMI suplementado, foram misturados na proporção de 5 células de mieloma para 1 esplenócito. As células foram centrifugadas por 10 min. a 1.500 rpm a 4°C e os sedimentos celulares recuperados lentamente com a adição do agente fusogênico PEG (50% v/v em meio RPMI sem SFB:polietilenoglicol) por exatos 6 min., conforme descrito por Earley e Osterling (1985). Em seguida, as células foram centrifugadas para retirada do PEG, recuperadas em meio RPMI suplementado e plaqueadas em placas de 96 orifícios de fundo chato (Nunc) na concentração de 2.5 x 10<sup>5</sup> células/orifício. As células híbridas foram mantidas por 24 h em meio RPMI suplementado, conforme descrito no item 3.3.1. Após esse período, a seleção das

células híbridas foi realizada pela adição da droga seletiva HAT (0,1 mM hipoxantina, 0,0004 mM aminopterina e 0,016 mM timidina) (Sigma, St. Louis, MO, USA) ao meio RPMI suplementado. A troca de meio contendo HAT foi realizada a cada 48 h durante 12 dias. Após esse período, o meio foi substituído por meio RPMI suplementado com HT (0,1 mM hipoxantina e 0,016 mM timidina) (Sigma) e esse procedimento realizado por mais 4 dias, até a retirada completa da droga utilizada para a seleção dos clones. Finalmente, a triagem dos hibridomas foi realizada no momento em que a cultura celular atingiu cerca de 80% de confluência.

#### **3.9.4 Triagem dos hibridomas secretores de anticorpos contra a NS3 helicase do DENV**

A triagem dos hibridomas secretores de anticorpos contra a proteína NS3 helicase foi realizada através das técnicas de ELISA e imunofluorescência indireta (IFI).

Para a triagem utilizando a técnica de ELISA, placas de 96 poços de fundo chato (Nunc) foram sensibilizadas com 0,02 ug do antígeno recombinante NS3 helicase em tampão carbonato por 16 h a 4°C. Após o período de incubação, as placas foram lavadas 6 vezes com 200 uL de PBS contendo 0,05% Tween e armazenadas a -20°C até o momento da utilização. O teste foi realizado pela incubação de 100 µL do sobrenadante da cultura de células híbridas com os antígenos recombinantes NS3 helicase adsorvidos nas placas de 96 poços a 37°C por 30 min. Como controles negativos da reação foi utilizado meio RPMI, o mesmo utilizado para manutenção dos hibridomas, e tampão de diluição de amostras (PBS, 0.05% Tween 20 com 5% de leite em pó desnatado (Molico - Nestlé). Como controle positivo da reação foi utilizado soro de animais imunizados com a proteína NS3 helicase diluído em tampão de diluição de amostras (1:250). Após 6 lavagens, as placas foram incubadas a 37°C por 30 min. com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com a enzima HRP (*horse radish peroxidase*), diluído em tampão de amostra. As placas foram então lavadas 6 vezes e, em seguida, adicionado 100 µL do substrato da enzima (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o cromógeno Tetrametilbenzidina (TMB – KPL, Gaithersburg, MD, USA) para a revelação da reação. Após um período de 10 min. à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida com a adição de

100µL de ácido sulfúrico (2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A densidade ótica de cada poço foi determinada em filtro de absorbância de 450 nm em leitor automático. Densidades óticas acima de 0,300 foram assumidas como positivas.

Os hibridomas secretores de anticorpos positivos pela técnica de ELISA foram confirmados pela técnica de IFI em culturas de células C6/36 infectadas com o DENV-1 cepa FGA/89. Para tanto,  $1.0 \times 10^5$  células C6/36/orifício foram plaqueadas em placas de 96 orifícios de fundo chato (Nunc) contendo meio L15 suplementado, conforme descrito no item 3.3.1, e infectadas com o vírus FGA/89 a uma MOI de 1 durante 72 h a 28°C. Após a incubação, as células foram lavadas com tampão PBS e fixadas/permeabilizadas com 100 µL de uma solução 1:1 de metanol:acetona (Merck) gelada. As placas foram mantidas a -20°C até o momento da sua utilização.

Para o teste de IFI, 100 µL do sobrenadante proveniente da cultura celular híbrida foi incubado por 30 min. a 37°C com células C6/36 fixadas não infectadas (mock) e infectadas com o DENV. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS à temperatura ambiente e incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugado com FITC (Sigma) por 30 min. a 37°C. Finalmente, as células foram lavadas com PBS e 50 µL de PBS 10% glicerol foi adicionado sobre as células para observação em microscópio óptico de fluorescência (Eclipse E600, Nikon).

### **3.9.5 Testes de estabilidade e clonagem dos hibridomas**

Os hibridomas que apresentaram reação positiva nas técnicas de triagens descritas acima foram submetidos a dois ciclos sucessivos de congelamento e crescimento celular, para avaliação da estabilidade clonal. Aproximadamente  $1.0 \times 10^6$  células foram congeladas em uma ampola contendo 500 µL de meio de congelamento (7.5% de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma) e 92.5% de SFB). As células foram submetidas ao congelamento lento (20°C/2 h seguido pelo congelamento a -70°C/2 h) e estocadas em Ni<sup>2+</sup> líquido. As células foram descongeladas rapidamente a 37°C e imediatamente centrifugadas a 2.500 rpm por 5 min. O sedimento celular foi ressuspenso em meio RPMI suplementado e cultivado em placas de cultivo celular de 6 poços (Nunc). Após um período breve de crescimento celular, as células foram retriadas e os poços positivos sub-clonados

por diluição limitante em placas de 96 poços. A diluição limitante é importante passo requerido para a obtenção de anticorpos monoclonais, reduzindo, assim, o risco de poli-especificidade e o crescimento de células não secretoras, em detrimento dos hibridomas secretores de anticorpos (YOKOYAMA et al., 2006). Para tanto, 100 µL da suspensão de células híbridas (cerca de 50 células) foi adicionado na primeira coluna de uma placa de 96 orifícios e 50 µL da suspensão celular foi distribuída seriadamente (diluição 1:2 em meio RPMI suplementado) até a última coluna da placa. As placas foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> por 2 h a 37°C para permitir adesão das células à placa e, em seguida, observadas em microscópio ótico invertido para identificação dos poços contendo apenas uma única célula. Após sete dias de cultivo, o sobrenadante das culturas de células híbridas expandidas foi triado para a secreção de anticorpos contra a proteína NS3 helicase do DENV e utilizados para a isotipagem, visando confirmar a natureza clonal dos hibridomas. A isotipagem foi realizada utilizando o kit SBA *Clonotyping*<sup>TM</sup> HRP System (Southern Biotech), baseado em ensaio em formato do tipo ELISA, seguindo o protocolo do fabricante. Após a confirmação da natureza clonal de alguns hibridomas, os mAb gerados foram testado contra os quatro sorotipos do DENV através da técnica de IFI, descrita acima.

### **3.10 Clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante quimérica NS2B<sub>47</sub>NS3 do DENV-1**

#### **3.10.1 Amplificação dos fragmentos de DNA através das técnicas de Reação da Transcriptase Reversa (RT) e reação em cadeia da polimerase (PCR)**

O RNA do DENV-1 foi extraído a partir de células de inseto C6/36 infetadas com as cepas de baixa passagem (P2) do DENV-1 FGA/89 parental e suas variantes neuroadaptadas FGA/NA d1d (435Mut) e FGA/NA P6 (209/480Mut), utilizando o kit comercial para extração viral (Qiagen). O RNA viral obtido foi convertido em cDNA através de amplificação enzimática utilizando-se o kit *Improm II reverse transcriptase* (Promega) e 250 uM oligonucleotídeos iniciadores randômicos (*Random primer* - Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A síntese do cDNA foi realizada a 42°C por 1 h.

Para clonagem da proteína NS3 inteira fusionada ao co-fator NS2B do DENV-1 (NS2BNS3) utilizamos uma estratégia similar a descrita por LEUNG et al. (2001). A estratégia consistiu em amplificar e fusionar através de um *linker* de quatro glicinas, uma serina e outras quatro glicinas os fragmentos correspondente aos 619 resíduos de aminoácidos que compõem a proteína NS3 e 47 resíduos de aminoácidos do domínio hidrofílico central da proteína NS2B (NS2B<sub>47</sub>), o qual atua como co-fator enzimático do domínio protease da NS3. Para tanto, o fragmento correspondente aos resíduos de aminoácidos 1 ao 619 da proteína NS3 foram amplificados a partir do cDNA viral usando os oligonucleotídeos NS3FLink de polaridade positiva 5'GGGGGCGGAGGTAGTGGTGGAGGCGGGTCAGGAGTGTATGGGACACACCC 3' (a sequência que codifica para o *linker* de Gly4-Ser-Gly4 está identificada em itálico) e NS3FLStop de polaridade negativa 5'GGGGAAGCTTTTATCTTCTTCCTGCTGCAAACCTC3' (a sequência sublinhada corresponde ao sítio de clivagem da enzima de restrição HindIII e em itálico a sequência codificadora de um *stop codon*). O fragmento hidrofílico correspondente aos resíduos de aminoácidos 49 ao 95 da proteína NS2B foram amplificados a partir do cDNA viral utilizando-se os oligonucleotídeos 2BCo de polaridade positiva 5'CGGGATCCGCGGATTTATCACTGGAGAAAGCGGC 3' (a sequência sublinhada corresponde ao sítio de clivagem da enzima de restrição BamHI) e 2BCOgly de polaridade negativa 5'CCCGCCTCCACCACTACCTCCGCCCCGAGTGTGTCATCCCTCTCTTCATC 3' (em itálico a sequência que codifica para o *linker* de Gly4-Ser-Gly4), utilizando o kit long range PCR (Qiagen). Os amplicons resultantes, correspondentes às regiões genômicas determinadas, foram purificados com kit *High Pure PCR* (Roche), seguindo o protocolo do fabricante, ressuspensos em 50 µL de água ultrapura. Esses amplicons foram submetidos a uma segunda amplificação para obtenção de um fragmento de PCR fusionado (NS2B<sub>47</sub>NS3) através da complementariedade das sequências criada pelos oligonucleotídeos iniciadores de polaridade positiva (NS3FLink) do fragmento da NS3 e negativa do fragmento da NS2B (2BCOgly). Os fragmentos gerados foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, excisados do gel e purificados com o *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante, ressuspensos em 50 µL de água ultrapura e quantificados em espectrofotômetro (NanoVue – GE Healthcare).

### 3.10.2 Clonagem dos fragmentos amplificados por PCR em vetor pET28a

Os amplicons obtidos por PCR de fusão (NS2B<sub>47</sub>NS3), bem como o vetor pET-28a foram digeridos com as enzimas de restrição BamHI 20 U/μL (Biolabs) e Hind III 20 U/μL (Biolabs), de acordo as condições prescritas pelo fabricante, e em seguida, purificados com o *QIAquick gel extraction kit* (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante, ressuspensos em 50 μL de água ultrapura e quantificados em espectrofotômetro (NanoVue – GE Healthcare). Os fragmentos foram clonados utilizando a enzima T4 DNA ligase (Biolabs), seguindo as recomendações do fabricante. Para a reação de ligação utilizou-se a relação de 3:1 (inserto:vetor), a partir de 50 ng de plasmídeo previamente digerido. As reações foram incubadas a 16°C por 16 h. Posteriormente, o volume total da ligação foi misturado com as células quimicamente competentes de *E. coli* da linhagem TOP10 cálcio competente (Invitrogen), conforme descrito no item 3.8.2 e semeadas em placas contendo meio LB sólido suplementado com 25 μg/mL de kanamicina e incubadas a 30°C por 16 h. As Bactérias *E. coli* Top10 recombinantes foram triadas por PCR de colônia para identificação de clones positivos. Os possíveis clones foram sequenciados pela empresa sul-coreana Macrogen, utilizando os oligonucleotídeos T7 *promoter* e *terminator*, cuja sequência encontra-se presente no vetor pET-28a, e oligonucleotídeos específicos do genoma do DENV-1 (CN14 5' GGAAATGACATTGCCAACTG 3' e CN10 5' ACCCGGCACATCTGGATC 3') para a confirmação da correta inserção do fragmento de interesse no vetor e verificação de eventuais mutações indesejadas.

### 3.10.3 Teste de expressão da proteína recombinante NS2B<sub>47</sub>NS3 do DENV-1 em sistema procarioto

O DNA plasmidial do clone recombinantes NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>209/480Mut</sub> (FGA/NAP6) foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* de linhagem BL21pLys (Novagen), Rosetta 2 (DE3) (Novagen) e Rosetta-gami 2 (DE3) (Novagen) cálcio competentes, conforme protocolo descrito no item 3.8.2. Os clones positivos foram estocados em glicerol 25% v/v, num volume total de 1 mL, a -70°C.



As bactérias da linhagem BL21pLys e Rosetta 2 (DE3) carregam plasmídeos que conferem resistência ao antibiótico cloranfenicol (34 ug/mL) e a bactéria da linhagem Rosetta-gami 2 (DE3) carrega plasmídeos que conferem resistência aos antibióticos cloranfenicol (34 ug/mL), estreptomicina (50 ug/mL) e tetraciclina (12,5 ug/mL) além da resistência a canamicina (25 ug/mL), conferida pelo vetor pET28a.

A partir de estoques em glicerol das bactérias BL21pLys, Rosetta 2 (DE3) e Rosetta-gami 2 (DE3) contendo os plasmídeos recombinantes, um pré-inóculo em 2 mL de meio líquido, contendo os antibióticos correspondentes, foi incubado a 30°C por 16 h, sob agitação constante. No dia seguinte, a partir da cultura saturada de *E. coli*, contendo os plasmídeos recombinantes, uma diluição de 1:10 em volume final de 20 mL de meio LB suplementado com os antibióticos correspondentes foi incubada à 30°C, sob agitação constante, até a obtenção de uma OD<sub>600</sub> de 0,6. Em seguida, a expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de 0,4 mM de IPTG e uma cinética de expressão foi realizada sob diferentes condições de temperatura e tempo de indução. O controle negativo (não induzido) cresceu sob as mesmas condições, mas sem a presença de IPTG. Para testes de solubilidade o sedimento celular foi ressuspense em 400 uL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7,5 e 300 mM NaCl), seguido por dois ciclos de congelamento e descongelamento em banho de gelo seco e etanol e lise celular por ultrassom (3 pulsos de 20 seg., potência 6) (Ultrasonic Homogeneizer 4710 Series – Cole Parmer). O lisado celular foi centrifugado a 10.000xg por 20 min. a 4°C e, em seguida, o sobrenadante (fração solúvel) e o sedimento (fração insolúvel) foram analisados por eletroforese em gel SDS-PAGE 13%. Para tanto, 25 µL de tampão de amostra 4X para SDS/PAGE foram adicionados aos 75 µL do sedimento celular ressuspense em PBS e aos 75 µL do sobrenadante do lisado bacteriano. As amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 min., aplicadas (15 µL) em gel SDS/PAGE 13% e visualizadas pela coloração direta com *comassie blue* ou *gel code blue stain* (Pierce). A identidade das proteínas recombinantes foi analisada pela técnica de *western blotting*, utilizando anticorpos policlonais anti-histidina (Sigma) ou anticorpos monoclonais anti-NS3 helicase do DENV, obtidos neste trabalho.

### 3.10.4 Geração de mutantes da proteína recombinante NS2B<sub>47</sub>NS3

A fim de avaliar o papel das mutações individuais Val<sub>209</sub>Ile e Leu<sub>480</sub>Ser nas atividades enzimáticas da proteína NS3 e excluir possíveis contaminações com proteínas bacterianas que pudessem, eventualmente, interferir nos ensaios de atividade helicase, ATPase e protease, os resíduos de aminoácidos nas posições NS3<sub>209</sub> e NS3<sub>480</sub> e os motivos Walker A (posição NS3<sub>200</sub>) do domínio helicase da proteína quimérica NS2B<sub>47</sub>NS3, bem como, o resíduo na posição NS3<sub>135</sub> (aminoácido que participa da tríade catalítica do domínio catalítico de protease) foram modificados em uma reação de mutagênese sítio dirigida utilizando o Kit *Quik-Change Site Directed* (Stratagene), utilizando oligonucleotídeos mutagênicos específicos (Quadro 3.3). Para as reações mutagênicas de PCR, o DNA plasmidial contendo o gene que codifica para a proteína quimérica NS2B<sub>47</sub>NS3 do vírus FGA/89 e FGA/NA P6 (contém as mutações Val<sub>NS3-209</sub>Ile e Leu<sub>480</sub>Ser) foi utilizado como molde para a síntese de novos DNAs plasmidiais, contendo as mutações de interesse. Para reação, foram utilizados 5 µL de 10x tampão de reação comercial, 50 ng do DNA plasmidial, 125 ng de cada oligonucleotídeo, 1 µL da mistura de dNTPs (Stratagene), 1 µL da enzima *Pfu turbo* DNA polimerase (2.5 U/µL, Stratagene) e água ultra-pura para um volume final de 50 µL. A reação foi submetida a um ciclo de temperatura que consistiu em: 95°C por 30 seg., seguidos de 16 ciclos a 95°C por 30 seg., 55°C por 1 min. e a 68°C por 7 min. Em seguida, o volume total da reação foi submetido ao tratamento com 1 µL da endonuclease DpnI (20 U/µL, New England Biolabs) e incubada a 37°C por 1 h. A DpnI tem especificidade por DNA metilado, que ocorre em DNA extraído de algumas linhagens de *E. coli*. Assim, a DpnI é utilizada para digerir o DNA molde, selecionando o DNA recentemente sintetizado contendo a mutação de interesse. Após o tratamento com a enzima, 5 µL da reação foram usados para transformar a linhagem bacteriana quimicamente competente XL1-blue (Stratagene), conforme descrito no item 3.8.2. Os prováveis clones foram selecionados por PCR de colônia, conforme descrito no item 3.8.1.3 e confirmados através de sequenciamento nucleotídico. Os plasmídeos contendo as mutações de interesse situadas na proteína quimérica NS2B<sub>47</sub>NS3 (Ser<sub>135</sub>Ala, Lys<sub>200</sub>Ala, Val<sub>209</sub>Ile, Leu<sub>480</sub>Ser), foram transformados em *E. coli* cepa Rosetta-gami 2 (DE3) (Novagen) e

utilizados para a expressão e purificação da proteína recombinante, conforme descrito no item 3.10.3.

Mutação	Nomenclatura Oligonucleotídeo	Sequência nucleotídica 5'-3'	Orientação (Polaridade)
NS3 <sub>135</sub>	CNS3135MutF	CTAGATTTTAAACCCGGCACAGCTGGATCTCCCATTGTG	Positiva Mutada
	CNS3135MutR	CACAATGGGAGATCCAGCTGTGCCGGGTTTAAATCTAG	Negativa Mutada
NS3 <sub>200</sub>	CNS3MutF	GCATCCAGGATCAGGAGCTACAAGAAGATATCTTCC	Positiva Mutada
	CNS3MutR	GGAAGATATCTTCTGTAGCTCCTGATCCTGGATGC	Negativa Mutada
NS3 <sub>209</sub>	CNS3209MutF	CGTCGCTATCTGCCGGCCATTATCCGTGAAGC	Positiva Mutada
	CNS3209MutR	GCTTCACGGATAATGGCCGGCAGATAGCGACG	Negativa Mutada
NS3 <sub>480</sub>	CNS3480MutF	GGGTCAGCCGTCAAA CAATGATGAAGACCATGC	Positiva Mutada
	CNS3480MutR	GCATGGTCTTCATCATTGTTGACGGCTGACCC	Negativa Mutada

**Quadro 3.3 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para reação de mutagênese sítio dirigida.** A sequência destacada refere-se ao códon mutado na posição de interesse.

Após a determinação do melhor método para a expressão das proteínas recombinantes na forma solúvel, as células quimicamente competentes *E. coli* cepa Rosetta-gami 2 (DE3) transformadas com o plasmídeo pET28a contendo a sequência que codifica para a proteína quimérica NS2B<sub>47</sub>NS3 do DENV-1 cepa FGA/89 e seus respectivos mutantes NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>135Mut</sub>, NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>200Mut</sub>, NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>209Mut</sub>, NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>435Mut</sub>, NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>480Mut</sub> e NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>209/480Mut</sub> foram utilizadas para expressão induzida das proteínas heterólogas em volumes de cultura proporcionalmente maiores (2.000 mL).

### 3.10.5 Purificação das proteínas heterólogas expressas em sistema procaríoto

As proteínas recombinantes presentes na fração solúvel do lisado celular foram purificadas em por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-IDA (ácido iminodiacético) agarose (GE), utilizando o sistema de FPLC Äkta (GE). A purificação em coluna de níquel tornou-se possível pela presença de hexa-Histidina (6xHis) co-expressa na região N-terminal das proteínas recombinantes utilizadas neste estudo. Para tanto, o sobrenadante do lisado celular, obtido através do método descrito no item 3.9.1, foi filtrado a 0.22 µm e purificado por passagem através de coluna de Ni-NTA agarose, pré-equilibrada com 5 volumes de tampão de lise (50 mM Tris-HCL pH 7,5, 300 mM NaCl e 20 mM de imidazol), seguida por lavagem com 6% de tampão B (50 mM Tris-HCL pH 8,0, 300 mM NaCl e 500 mM de imidazol). A proteína foi eluída com 40% de tampão B, aproximadamente 100 mM de imidazol. Todos os tampões

foram filtrados e desgaseificados antes da utilização. A proteína foi eluída em um fluxo de 0,5 mL/min. em frações de 0,5 mL. O cromatograma foi determinado pela medição da absorvância de UV a 280nm.

### **3.11 Ensaios de atividade enzimática**

#### **3.11.1 Protease**

Os ensaios funcionais de atividade protease foram realizados em colaboração com o grupo do Dr. Luiz Juliano Neto da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os substratos peptídicos correspondentes ao sítio de clivagem nativo da poliproteína do DENV-2 e um peptídeo contendo três resíduos de aminoácidos básicos em sequência foram previamente sintetizados (GOUVEA et al., 2006) (Quadro 3.5) com supressão intramolecular de fluorescência (FRET) e utilizados neste estudo. Os peptídeos contendo N-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamina (EDDnp) ligado ao resíduo de aminoácido glutamina foram dissolvidos em DMSO e as concentrações determinadas pelas leituras das absorvâncias em 365 nm em espectrofotômetro modelo U-3210 (Hitachi, Japão). O valor de absorvância foi convertido à concentração molar empregando o coeficiente de extinção molar do grupo Dnp ( $E=17.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

A hidrólise de concentrações crescentes de substrato fluorogênico foi monitorada após a incubação da enzima por 5 minutos a 37°C em tampão 20 mM Tris, 10 mM NaCl e 20% glicerol (pH 9,0), utilizando espectrofluorímetro HITACHI F-2500 ajustado com fendas de excitação e emissão 10 e 20 e comprimentos de onda para 320 nm e 420 nm. As constantes cinéticas foram determinadas a partir das velocidades iniciais de hidrólise (<5% da hidrólise total), utilizando a equação descrita por Michaelis & Mentem com o auxílio do programa GraFit (Erithacus Software, Horley, Surrey, U.K.). O efeito de filtro interno foi corrigido usando uma equação empírica de acordo com Araujo et al. (2000). Os parâmetros de hidrólise  $K_m$ ,  $K_{cat}$   $K_{cat}/K_m$  de três determinações independentes foram realizados.

### 3.11.2 ATPase

A atividade ATPase das proteínas recombinantes NS3<sub>hel</sub> e NS2B<sub>47</sub>NS3 do vírus FGA/89 e as variantes da proteína NS2B<sub>47</sub>NS3 foi avaliada através do método colorimétrico de liberação de fosfato inorgânico (Pi), utilizando o kit de atividade ATPase (Innova Biosciences). As proteínas purificadas foram incubadas em placa de 96 poços e o teste realizado de acordo com as descrições do fabricante. Diferentes concentrações de ATP e diferentes condições de tempo foram utilizadas para a determinação das condições ótimas da reação. Todas as reações foram incubadas a 28°C e a absorbância determinada a 650 nm. A curva padrão de Pi foi utilizada para determinar a quantidade de Pi liberado durante as reações de ATPase.

#### 3.11.2.1 Preparação do substrato de RNA dupla fita

Para a obtenção dos substratos dupla fita, 10 pmol do oligonucleotídeo RNA R3' (5'AGCACCGUAAAGACGC3') foi misturado em uma relação molar de 1:1 com o oligonucleotídeo complementar (5'GCGUCUUUACGGUGCUUAAAACA AAACAAAACAAAACAAA3'), em condições de alta salinidade (0,5 M NaCl) e aquecidos a 70°C por 10 min. Em seguida, os substratos foram re-naturados lentamente em temperatura ambiente. Os ácidos nucleicos foram purificados em coluna Sephadex G25 (GE Healthcare).

### 3.11.3 Helicase

#### 3.11.3.1 Preparação dos substrato de DNA e RNA dupla fita

Para a obtenção dos substratos dupla fita, 10 pmol do oligonucleotídeo DNA d18mer (5'GTTATGTACCTACTAAAC3') ou RNA R3' (5'AGCACCGUAAAGACGC3') foram marcados radioativamente com T4 polinucleotídeo kinase (USB) e ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P) ATP (3000 Ci/mmol) e incubados por 30 minutos a 37°. Os oligonucleotídeos marcados foram misturados em uma relação molar de 1:3 com os oligonucleotídeos complementares não marcados DNA d66mer

(5'AGGATGTATGTTTAGTAGGTACATAACTATCTATTGATACAGACCTAAAACAAA  
 AAATTTTCCGAG3') e RNA RF  
 (5'GCGUCUUUACGGUGCUUAAAACAAAACAAAACAAAACAAA3'),  
 respectivamente, em condições de alta salinidade (0,5 M NaCl) e aquecidos a 95°C  
 (DNA) ou 70°C (RNA) por 10 min. Em seguida, os substratos foram re-naturados  
 lentamente em temperatura ambiente. O ATP não incorporado foi removido com  
 Sephadex G25 (GE Healthcare). O ATP radioativo incorporado foi determinado em  
 contador de cintilação líquida.

### 3.11.3.2 Reação enzimática

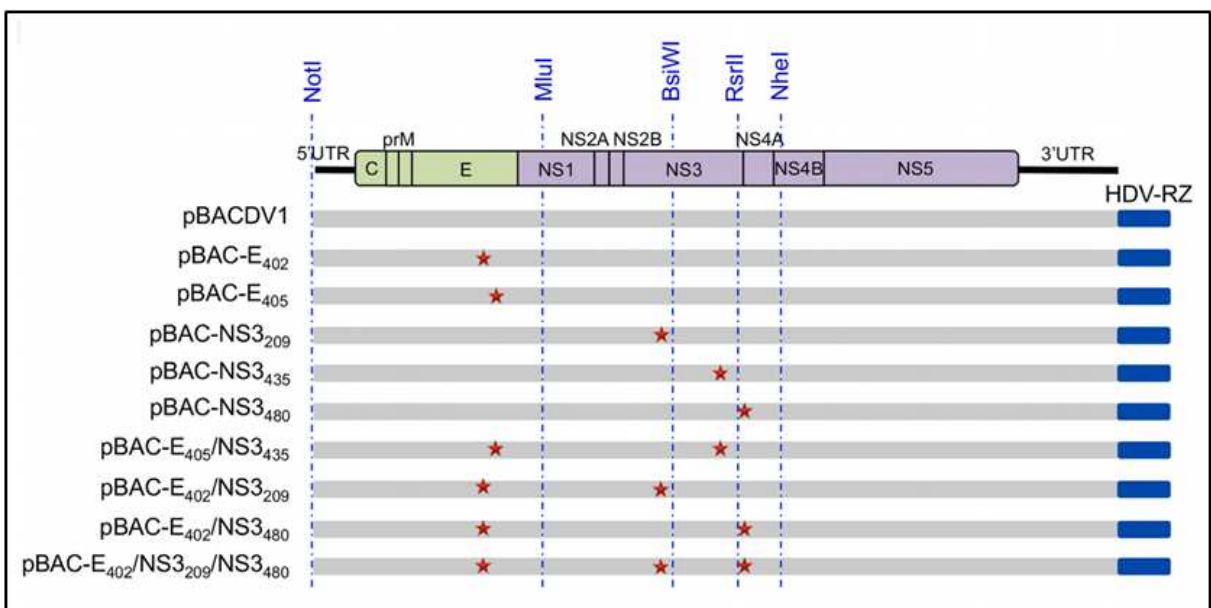
A atividade helicase foi realizada em diferentes concentrações de proteínas  
 NS2B<sub>47</sub>NS3 em 25 mM TrisHCl pH 7,5, 5 mM ATP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glicerol, 0,1  
 mg/ml BSA e 25 nM de substrato dupla fita (DNA ou RNA) marcado radioativamente.  
 As reações foram incubadas a distintos tempos à 37°C e interrompidas pela adição  
 da solução de terminação (3% Fycoll, 1% SDS, 0,02% BPB, 20 mM EDTA).  
 Alíquotas foram analisadas por eletroforeses em gel de poliacrilamida não  
 desnaturante (PAGE) 12%.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Caracterização *in vivo* e *in vitro* dos DENV recombinantes

Para se estudar o papel das substituições de aminoácidos nas proteínas E e NS3 do DENV-1, os vírus recombinantes contendo as mutações individuais ou em conjunto, provenientes dos clones infecciosos do DENV-1 cepa BR/90 (não adaptado em camundongo) (DUARTE DOS SANTOS et al., 2002) gerados por BORBA (2010) (Figura 4.1), foram utilizados para caracterização biológica tanto *in vivo*, em modelo de neurovirulência murino, *in vitro*, em linhagens celulares humana e de inseto (BORBA, STROTTMANN et al., 2012), e *ex vivo*, em cultura de células primárias humanas derivadas de células da linhagem hematopoética.

Os vírus recombinantes contendo as mutações de interesse (vBACDV1, vBACDV1-E<sub>402</sub>, vBACDV1-E<sub>405</sub>, vBACDV1-NS3<sub>209</sub>, vBACDV1-NS3<sub>435</sub>, vBACDV1-NS3<sub>480</sub>, vBACDV1-NS3<sub>209/480</sub>, vBACDV1- E<sub>405</sub>NS3<sub>435</sub> e vBACDV1- E<sub>402</sub>NS3<sub>209/480</sub>) foram propagados em células de inseto C6/36 para obtenção de estoques virais de trabalho. O estoque viral foi gerado a partir do sobrenadante recolhido da passagem 1 (P1), obtida após a transfecção do RNA viral recombinante em células C6/36. Todas as infecções foram realizadas em MOI de 0,01 e o título viral determinado por imunodeteção de foco.



**Figura 4.1 – Representação esquemática do genoma dos clones infecciosos recombinantes.** As linhas tracejadas indicam os sítios das endonucleases de restrição utilizadas para inserção dos

fragmentos contendo as mutações no pBACDV1. As estrelas vermelhas indicam a localização de cada mutação (BORBA; STROTTMANN et al., 2012).

#### **4.1.1 Avaliação do RNA e progênie viral no sistema nervoso central (SNC) e medula espinhal de camundongos neonatos infectados com os DENV-1 recombinantes**

Primeiramente, para avaliar a habilidade dos DENV-1 recombinantes estabelecer uma infecção produtiva no cérebro de camundongos neonatos, foi realizada uma cinética de infecção dos vBACDV1 e vBAC-E<sub>402</sub>NS<sub>3209</sub>NS<sub>3480</sub> no SNC de camundongos, utilizando a dose viral de  $1,0 \cdot 10^{2,75}$ ffu, previamente estabelecida por Borba (2010). A cada ponto da cinética, o cérebro de três camundongos, de três experimentos independentes, foi recolhido e processado individualmente para quantificação da progênie viral pela técnica de imunodeteção por foco em células C6/36; o restante dos animais foi acompanhado por mais 13 dias para análise das taxas de morbidade e mortalidade. A determinação dos títulos virais demonstrou maior habilidade do vírus triplo mutante produzir partículas virais infecciosas no tecido cerebral de camundongos em comparação ao vírus parental (vBACDV-1), consistente com a frequência de encefalite e mortalidade dos animais infectados com o vBAC-E<sub>402</sub>NS<sub>3209</sub>NS<sub>3480</sub> (BORBA; STROTTMANN et al., 2012).

A modulação de genes do hospedeiro em resposta a infecção com os DENV-1 recombinantes também foi avaliada, uma vez que a evolução para as formas graves da dengue no hospedeiro humano é dependente de dois aspectos principais: a virulência do microorganismo e a resposta do hospedeiro contra o agente infeccioso e o equilíbrio entre estes dois aspectos define o surgimento ou não da doença. Dados anteriores do grupo (BORDIGNON et al., 2008) revelaram que genes relacionados a resposta imune inata eram diferencialmente expressos durante a infecção do SNC de camundongos com cepas neurovirulentas. Baseado nestes resultados, três genes representativos das vias de ubiquitinação de proteínas (Usp18 – *ubiquitin specific protease 18*), quimiocinas (Ccl5 – *ligante de quimiocina 5 – motivo C-C*) e interferon beta (IFN- $\beta$ ) foram selecionados para avaliar o padrão da expressão gênica no SNC de camundongos infectados com os DENV-1 recombinantes vBACDV1 e vBAC-E<sub>402</sub>NS<sub>3209</sub>NS<sub>3480</sub>. Conforme demonstrado na figura 4.2, a carga viral dos DENV-1 recombinantes no SNC de camundongos



correlaciona-se com os níveis de expressão dos três genes representativos da resposta imune inata (USP18, CCL5 e IFN- $\beta$ ) e taxa de mortalidade dos animais. Estes resultados corroboram os achados anteriores de Bordignon et al. (2008), demonstrando que variantes neurovirulentas do DENV-1 modulam positivamente genes da resposta imune inata em relação ao vírus parental não patogênico. A exacerbação da resposta imune correlaciona-se com as altas taxas de replicação viral e mortalidade dos animais infectados com o vírus contendo as mutações E<sub>402</sub>, NS3<sub>209</sub> e NS3<sub>480</sub>.

Em um estudo prévio, demonstramos que o pico de replicação viral no SNC de camundongos infectados via i.c. com o DENV-1 FGA/89 e suas variantes neuroadaptadas (FGA/NA P6 e FGA/NA a5c) ocorria 9 dpi (BORDIGNON, STROTTMANN et al., 2007). Com base nesses resultados e de acordo com os dados da cinética de infecção dos DENV-1 vBACDV1 e vBAC-E<sub>402</sub>NS3<sub>209</sub>NS3<sub>480</sub>, todo o estudo de caracterização biológica *in vivo* dos DENV-1 recombinantes foi realizado a partir do *pool* de cérebros de camundongos 8 dpi, período que antecede o aparecimento dos sinais de doença e morte dos animais.

Inicialmente, demonstramos que os DENV-1 recombinantes contendo as mutações E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub> não diferiam do vírus parental vBACDV1 quanto a virulência em camundongos neonatos. Em contraste, os vírus contendo apenas as mutações NS3<sub>480</sub> e NS3<sub>435</sub> eram capazes de causar doença neurológica nos animais. E os vírus contendo a combinação dessas mutações (E<sub>402</sub>/NS3<sub>480</sub>, E<sub>405</sub>/NS3<sub>435</sub> ou E<sub>402</sub>/NS3<sub>209</sub>/NS3<sub>480</sub>) eram mais neurovirulentos que os vírus contendo apenas as mutações na proteína NS3 (NS3<sub>435</sub> e NS3<sub>480</sub>) (BORBA; STROTTMANN et al., 2012). Dessa forma, a fim de correlacionar o fenótipo observado com a habilidade dos DENV-1 recombinantes produzirem partículas virais infecciosas e RNA viral no SNC de camundongos neonatos, a dose de  $1.0 \times 10^{2,75}$  ffu dos DENV-1 recombinantes foi administrada via i.c. em grupos de animais 48 h após o nascimento. Visando a normalização da dose de inoculação foi determinado o equivalente de genomas virais (GE) em relação ao ffu/mL para todos os DENV recombinantes (Figura 4.3).

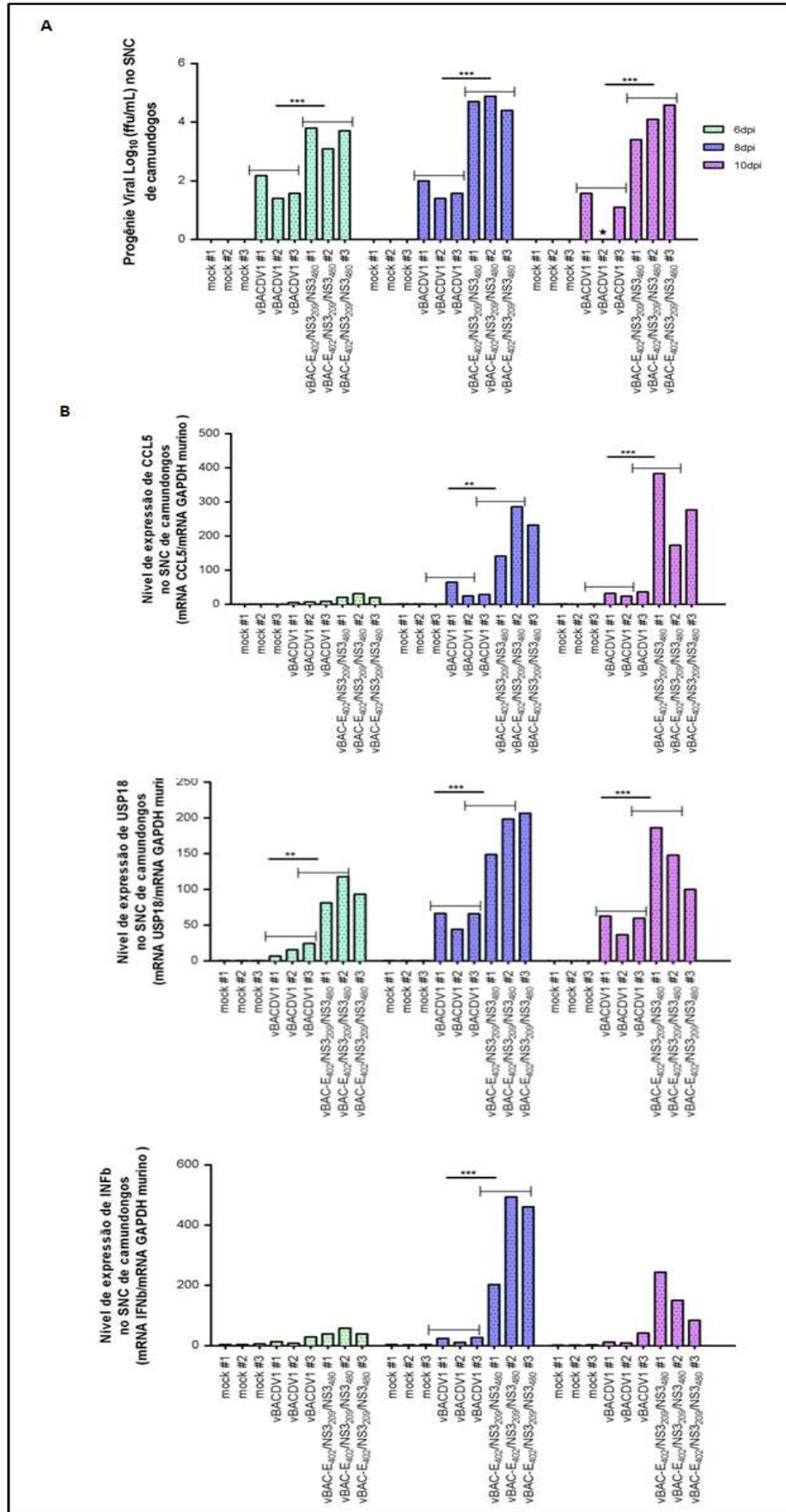
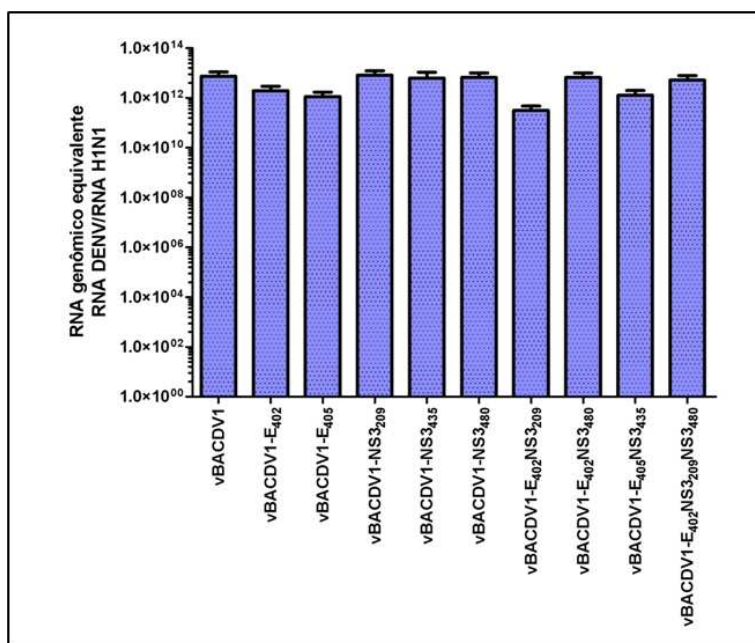


Figura 4.2 - Cinética de infecção no SNC de camundongos individuais infectados com mock e com os DENV-1 recombinantes vBACDV1 e

**vBAC-E<sub>402</sub>/NS<sub>3209</sub>/NS<sub>3480</sub>.** (A) Quantificação da progênie viral na suspensão 10% do SNC de camundongos individuais por imunodeteccção de foco em células C6/36. (B) Quantificação dos níveis de expressão gênica de genes da resposta imune inata no SNC de camundongos individuais por RT/qPCR. Os dados obtidos por RT/qPCR foram normalizados pelos níveis de expressão do gene GAPDH murino. #1, #2 e #3 representam cada animal individual coletado nos tempos determinados (6, 8, e 10 dpi).

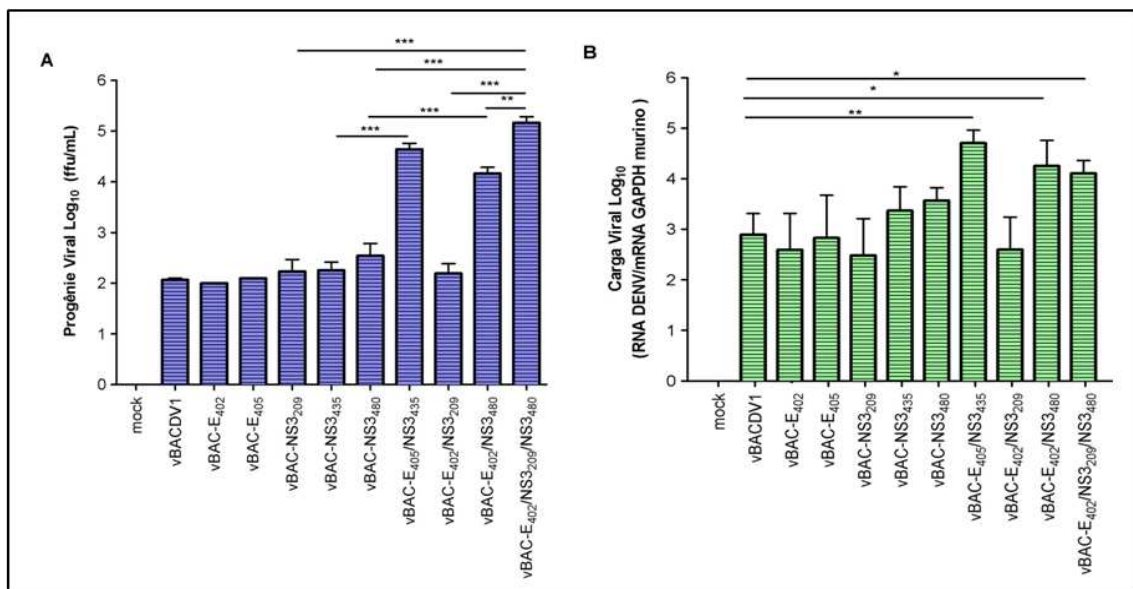


**Figura 4.3 - Determinação da taxa de RNA genômico equivalente (GE) a dose de 562 ffu/C6/36 dos DENV-1 recombinantes.** Os dados obtidos por RT/qPCR foram normalizados de acordo com os níveis de RNA controle não relacionado (RNA de vírus influenza H1N1). Nenhuma diferença estatística foi observada entre os RNAs GE de três análises independentes utilizando-se o teste *One-Way ANOVA*, seguido pela correção de Bonferroni.

Após inoculação dos DENV-1 recombinantes e mock via i.c., os grupos de animais infectados foram observados por um período de 21 dias para análises de morbidade e mortalidade (dados não mostrados – vide BORBA, STROTTMANN et al., 2012 – Figura 4, Anexo 1). Oito dias após a inoculação, o cérebro de três camundongos, de três experimentos independentes, foi recolhido após eutanásia dos animais e utilizado para quantificação da progênie viral pela técnica de imunodeteccção por foco em células C6/36 e quantificação do RNA viral por RT/qPCR.

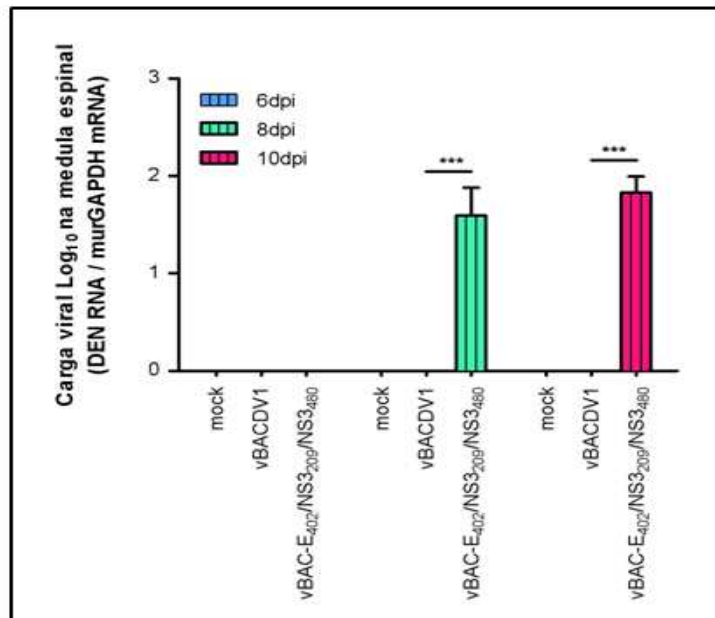
A determinação da progênie viral no *pool* de tecido cerebral de três camundongos infectados com o painel dos DENV-1 recombinantes (Figura 4.4) demonstra que os vírus vBAC-E<sub>405</sub>/NS<sub>3435</sub>, vBAC-E<sub>402</sub>/NS<sub>3480</sub> e vBAC-

$E_{402}/NS3_{209}/NS3_{480}$  apresentam maior habilidade infectiva, consistente com o maior título viral, elevada taxa de replicação e sinais de encefalite observados nos animais infectados nestes animais. É importante ressaltar que embora os vírus contendo as mutações  $NS3_{435}$  e  $NS3_{480}$  não difiram quanto à capacidade de produção de partículas virais infecciosas, estes apresentam níveis de RNA viral mais elevados quando comparados com os vírus parental e  $vBAC-E_{402}$ ,  $vBAC-E_{405}$ ,  $vBAC-NS3_{209}$  e  $vBAC-E_{402}/NS3_{209}$ , os quais não causam doença nos animais. Esses resultados evidenciam que as substituições  $LeuNS3_{435}Ser$  e  $LeuNS3_{480}Ser$  conferem maior habilidade replicativa ao DENV-1.



Adicionalmente, nós utilizamos as variantes virais que apresentaram os fenótipos mais informativos ( $vBACDV1$  e  $vBAC-E_{402}/NS3_{209}/NS3_{480}$ ) para avaliar a habilidade desses DENV-1 recombinantes disseminarem-se do SNC de camundongos neonatos para outros tecidos celulares, tal como a medula espinhal. A análise dos dados (Figura 4.5) evidencia a presença de RNA viral apenas na medula espinhal dos animais infectados com o vírus triplo mutante. Os níveis de detecção da técnica de RT/qPCR nos permitiu identificar o RNA do vírus  $vBAC-$

E<sub>402</sub>/NS3<sub>209</sub>/NS3<sub>480</sub> 8 e 10 dpi, período em que os sinais de doença e mortalidade dos animais são aparentes.

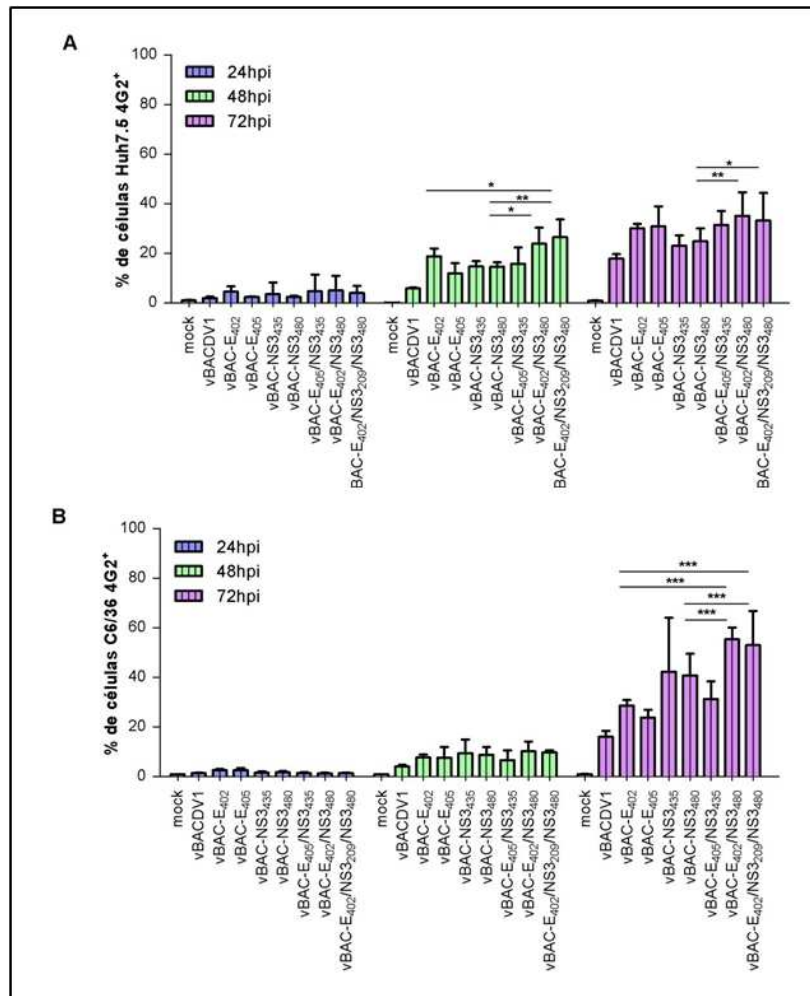


**Figura 4.5 - Detecção de RNA viral na medula espinhal de animais inoculados via i.c. com mock e com os DENV-1 recombinantes vBACDV1 e vBAC-E<sub>402</sub>/NS3<sub>209</sub>/NS3<sub>480</sub>.** Quantificação por RT/qPCR dos níveis de RNA viral na medula espinhal de camundongos individuais durante a cinética de infecção (6, 8 e 10 dpi). Os dados de três experimentos independentes foram normalizados pelos níveis de expressão do gene GAPDH murino e analisados pelo teste *One-Way* ANOVA, seguido pela correção de Bonferroni. \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.1.2 Cinética de infecção *in vitro*

Com o objetivo de avaliar o papel de cada uma das mutações inseridas no clone infeccioso isoladamente ou em combinação na modulação do *fitness* viral *in vitro*, nós realizamos uma cinética de infecção em linhagens celulares humanas (Huh7.5) e de inseto (C6/36) (Figura 4.6). As células Huh7.5, infectadas com uma MOI de 5, e as células C6/36, infectadas com uma MOI de 1, foram analisadas 24, 48 e 72 hpi por citometria de fluxo. O resultado de três experimentos independentes demonstrou que o número de células positivas para a proteína E do vírus era significativamente mais alto nas células Huh7.5 e C6/36 infectadas com os vírus contendo a combinação de mutações nas proteínas E e NS3 (vBAC-E<sub>402</sub>/NS3<sub>480</sub> e

vBAC-E<sub>402</sub>/NS3<sub>209</sub>/NS3<sub>480</sub>) quando comparado com o vírus parental (vBACDV1) ou simples mutantes, demonstrando o sinergismo destas mutações para a modulação do *fitness* viral também *in vitro*.



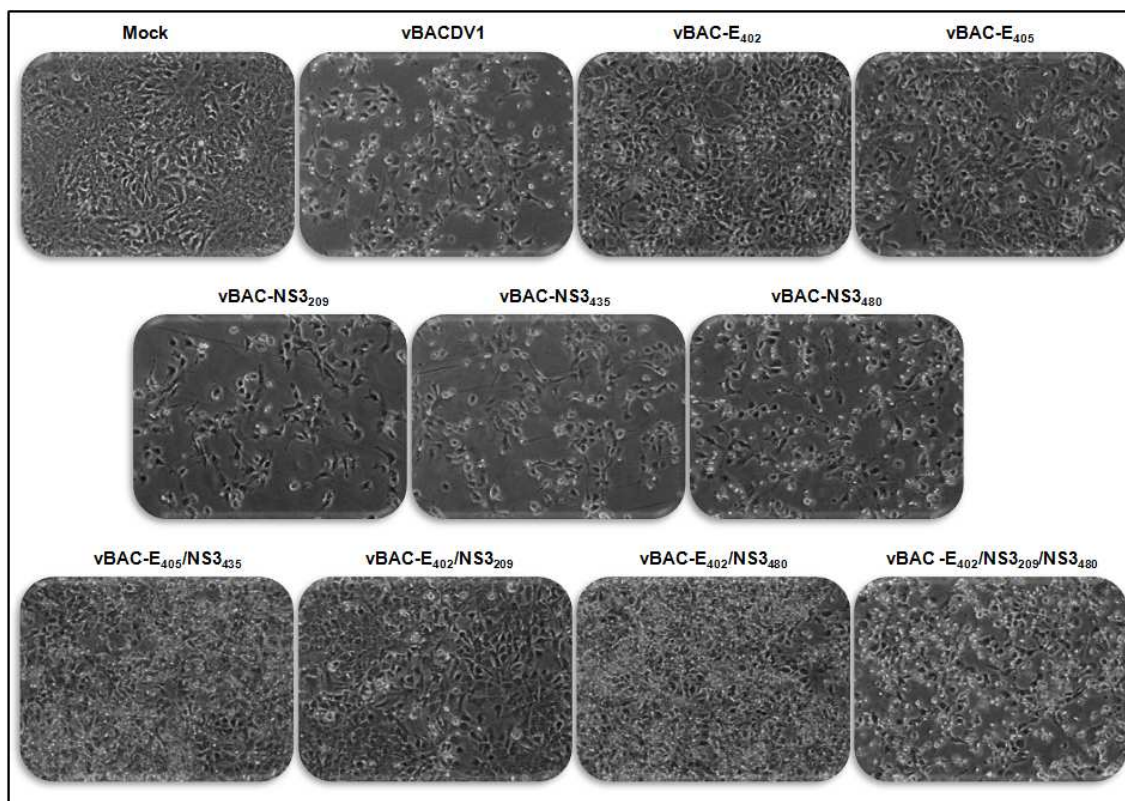
**Figura 4.6 - Cinética de infecção dos DENV-1 em células C6/36 e Huh7.5. (A)** Detecção de antígeno viral em células Huh 7.5 infectadas. **(B)** Detecção de antígeno viral em células C6/36. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais 4G2 que reconhecem a proteína E de flavivírus e anticorpos anti-camundongo conjugado com ficoeritrina (PE - do inglês, *phycoerythrin*) e analisadas em equipamento FACSCalibur (BD). As porcentagens de infecção foram obtidas pela análise dos dados de citometria, provenientes de três experimentos diferentes, utilizando-se o programa FlowJo 2.2.8. As diferenças estatísticas foram obtidas utilizando-se o teste *two-way* ANOVA, seguido pela correção de Bonferroni. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ . A barra de significância representa a diferença estatística observada apenas entre os vírus simples, duplo e triplo mutantes que compartilham as mesmas mutações.

#### 4.1.2.1 **Análise comparativa do efeito citopático produzido pelos vírus recombinantes em culturas de células**

O DENV-1 BR/90 induz naturalmente efeito citopático (CPE) em células de inseto, caracterizado pela formação de sincício (DESPRÈS; FRENKIEL; DEUBEL, 1993). O clone infeccioso de DENV-1 pBACDV1 deriva do genoma viral da cepa BR/90; e os vírus recombinantes provenientes deste clone de cDNA mantêm as mesmas propriedades biológicas que a cepa selvagem em cultura de células (BORBA, 2010). Estudos prévios mostraram que os DENV-1 recombinantes contendo mutações nas posições E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub> apresentavam alteração no fenótipo de fusão em cultura de células de inseto (C6/36). Desta forma, visando analisar a influência das mutações na possível alteração do fenótipo em culturas de células humanas, infecções com todos os DENV-1 recombinantes foram realizadas em paralelo e acompanhadas para a identificação de CPE.

Na figura 4.7 pode-se observar que os vírus vBAC-E<sub>405</sub>, vBAC-E<sub>405</sub>/NS3<sub>435</sub>, vBAC-E<sub>402</sub>, vBAC-E<sub>402</sub>NS3<sub>209</sub> vBAC-E<sub>402</sub>NS3<sub>480</sub> e vBAC-E<sub>402</sub>NS3<sub>209</sub>NS3<sub>480</sub> não produzem CPE, característico do vírus BR/90 (DESPRÈS; FRENKIEL; DEUBEL, 1993), em células Huh7.5 72 hpi. Interessantemente, os DENV-1 FGA/NA P6 e FGA/NA d1d, os quais contém naturalmente as mutações em estudo, não são capazes de produzir CPE em células humanas ou de inseto, apresentando um perfil de infecção visual indistinguível do mock.





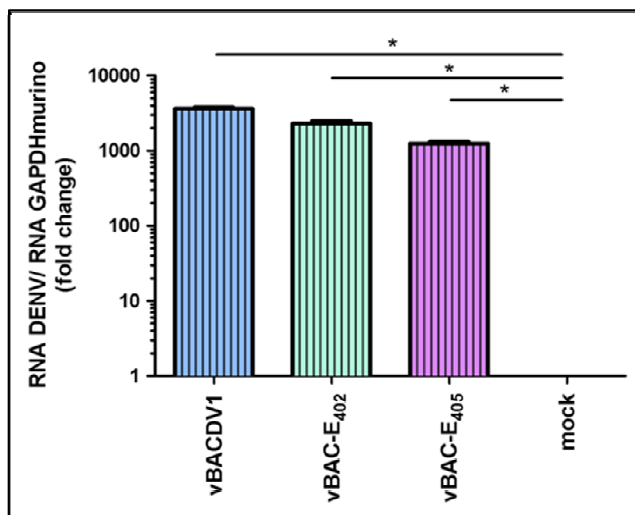
**Figura 4.7 – Análise do CPE induzido pela infecção dos DENV-1 recombinantes em células Huh 7.5 72 hpi.** As células foram infectadas com os DENV-1 recombinantes e mock em uma MOI de 5. As alterações na morfologia celular foram fotografadas 72 hpi em um microscópio óptico NIKON ECLIPSE E600, utilizando-se o software Image-ProR Plus versão 4.5 com aumento de 400x.

#### 4.1.2.2 Ensaios de ligação dos DENV-1 recombinantes com a célula hospedeira

Nós demonstramos previamente por imunohistoquímica que as principais células alvo no SNC de camundongos para a infecção pelos DENV-1 neuroadaptados e recombinantes eram os neurônios corticais e hipocâmpais (BORDIGNON, STROTTMANN et al., 2007; BORBA, 2010; BORBA, STROTTMANN et al., 2012). O fato das mutações E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub> aparecerem de forma sistemática no mesmo domínio da proteína E durante o processo de neuroadaptação do DENV-1, sugere fortemente que esta região apresenta um papel relevante no ciclo replicativo do vírus. Desta forma, para avaliarmos a habilidade dos DENV-1 recombinantes (vBACDV1, vBAC-E<sub>402</sub> e vBAC-E<sub>405</sub>) interagirem com os receptores de células Neuro 2a, nós realizamos ensaios de ligação *in vitro* (Figura 4.8). Nenhuma diferença significativa foi observada na capacidade de ligação aos receptores das células Neuro 2a. De acordo com os resultados e com a sua localização na proteína, as mutações nas



posições E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub> parecem não ter efeito na modulação do processo de adsorção viral ou determinação do tropismo celular.



**Figura 4.8 - Ensaio de ligação dos DENV-1 recombinantes em células Neuro 2a.** Os dados obtidos por RT/qPCR foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn's. Os valores foram expressos pelos valores de média  $\pm$  o desvio padrão de três experimentos independentes. \*  $p < 0.05$ .

#### 4.2 Utilização de clones infecciosos quiméricos dos YFV e DENV para o estudo das mutações E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub>

Os resultados de caracterização biológica *in vitro* dos DENV-1 recombinantes demonstraram o envolvimento das mutações E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub>, localizadas na região  $\alpha$ -hélice H1<sup>pred</sup> da proteína E, na inibição do CPE em cultura de células de inseto (BORBA, 2010) e de mamífero. Com o intuito de confirmar o papel dessas mutações na inibição do CPE, as substituições de aminoácidos PheE<sub>402</sub>/Leu e ThrE<sub>405</sub>/Ile foram inseridas no contexto genético do clone infeccioso quimérico do YFV e DENV-1 (pAC-YF/DEN-1).

O clone infeccioso quimérico pAC-YF/DEN-1, desenvolvido por Mateu et al. (2007), apresenta as proteínas prM e E do DENV-1 (cepa da Venezuela – VeMir95) e as demais proteínas do vírus da febre amarela (cepa 17D). Os flavivírus quiméricos resultantes desta construção são capazes de ocasionar extensivo CPE em células Vero (Mateu et al., 2007) e em células de inseto C6/36. A região prM-E

dos DENV-1 FGA/89 e vBACDV1 (BR/90) e do vPAC-YF/DENV-1 (VeMir95) diferem quanto a composição de aminoácidos (Figura 4.9).

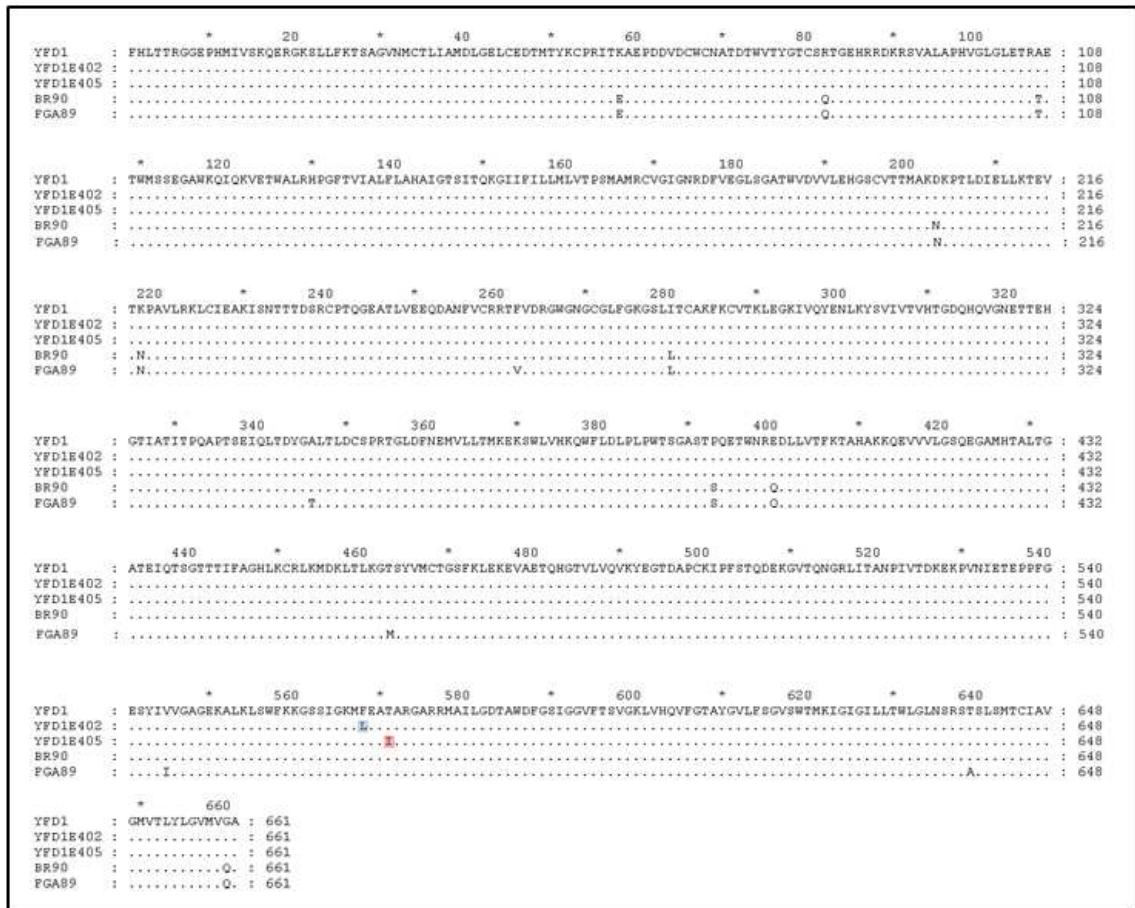
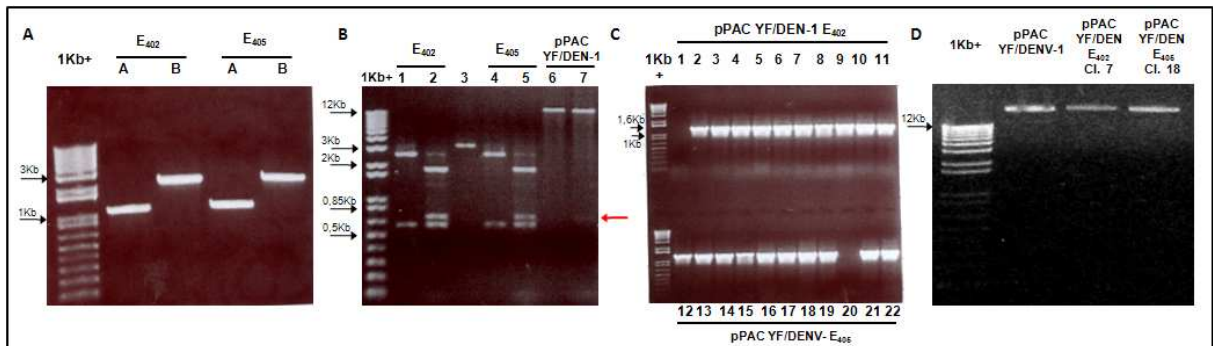


Figura 4.9 – Alinhamento de aminoácidos da região prM-E dos vírus quiméricos de YF/DENV-1 (MATEU et al., 2007) (vPAC-YF/DENV-1, vPAC-YF/DEN-1-E<sub>402</sub> e vPACYF/DEN-1-E<sub>405</sub>) e DENV-1, cepas BR/90 (número de acesso GenBank AF226685) e FGA/89 (número de acesso GenBank AF226687). As mutações em estudo nas posições E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub> estão destacadas nas cores azul e vermelho, respectivamente.

#### 4.2.1 Inserção de mutações na proteína E do clone infeccioso quimérico de YF/DENV-1

A estratégia utilizada para inserção das substituições Phe<sub>E402</sub>/Leu e Thr<sub>E405</sub>/Ile no clone infeccioso pAC-YF/DEN-1, descrita no item 3.8.1.1, foi baseada nas técnicas clássicas de biologia molecular, utilizando PCR de fusão e endonucleases de restrição (Figura 4.10). Por ser imprescindível a ausência de mutações aleatórias, os putativos clones pAC-YF/DENV-E<sub>402</sub> e pPAC-YF/DENV-E<sub>405</sub> (Figura 4.10) foram selecionados para confirmação de sua sequência nucleotídica por sequenciamento de DNA.

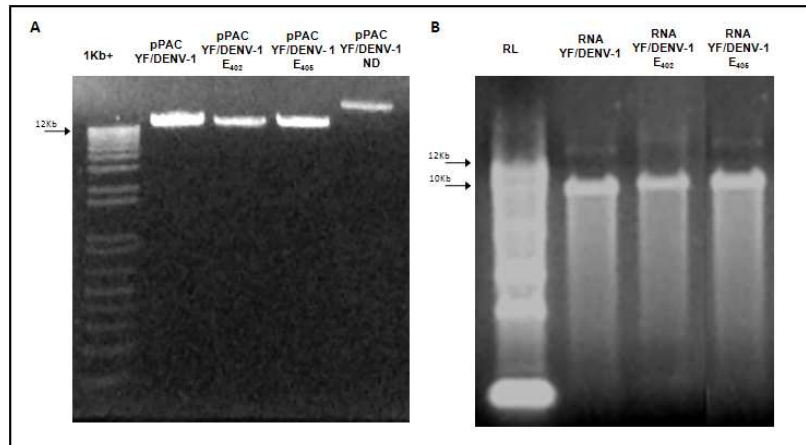


**Figura 4.10 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% das amplificações e clonagem dos fragmentos mutados.** 1Kb+ – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). **(A)** amplificação dos fragmentos A e B contendo as mutações E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub>. **(B)** Fragmentos de fusão (F) e pAC-YF/DENV-1 após a digestão com endonucleases de restrição. **1 e 4** fragmento F após digestão com NSil, **2 e 5** Fragmento F após digestão sequencial com as enzimas NSil e NarI. **3** fragmento F não digerido. **6** pAC-YF/DENV-1 não digerido. **7** pAC-YF/DENV-1 após digestão sequencial com as enzimas NSil e NarI. **(C)** PCR de colônia. A identificação **1 a 22** corresponde ao número de cada colônia testada. **(D)** purificação do DNA plasmidial.

#### 4.2.2 Geração dos vírus quiméricos YF/DEN recombinantes

##### 4.2.2.1 Preparação do DNA dos clones e transcrição *in vitro*

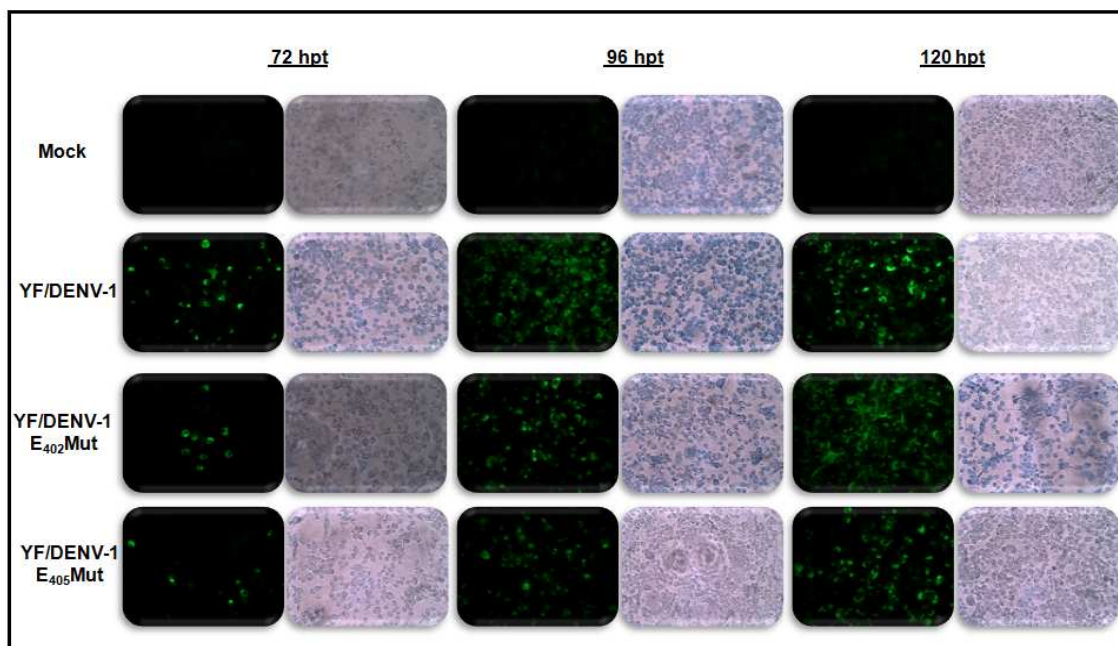
A etapa subsequente à geração dos clones contendo as mutações de interesse consistiu na obtenção dos vírus quiméricos recombinantes. Para tal, o DNA plasmidial dos clones pAC YF/DENV-1, pAC YF/DENV- E<sub>402</sub> e pAC YF/DENV- E<sub>405</sub>, contendo a correta sequência dos fragmentos clonados, foram linearizadas pela digestão com a enzima de restrição XhoI. O sítio de reconhecimento desta endonuclease de restrição está localizado imediatamente após a região 3'UTR do genoma do YFV. O DNA linearizado foi visualizado em gel de agarose 0,8% (Figura 4.12) e, em seguida, purificado pela extração com fenol e precipitação com etanol (item 3.8.1.4.1). O material purificado foi utilizado como molde para a reação de transcrição *in vitro* do RNA viral, utilizando o kit SP6/T7 *Transcription* (Roche), com adição de uma estrutura em *cap* (m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G) (Biolabs). Após a reação de transcrição, o RNA resultante foi observado em gel de agarose 0,8% livre de RNases, para análise de sua integridade (Figura 4.11), e quantificados em fluorímetro Qubit (Invitrogen).



**Figura 4.11 – Preparação do material para transfecção do RNA viral em linhagem celular.** Eletroforese em gel de agarose 0,8%. **(A)** Linearização dos clones pPAC YF/DENV-1, pPAC YF/DENV- E<sub>402</sub> e pPAC YF/DENV- E<sub>405</sub> com a endonuclease de restrição XhoI. **(B)** RNAs resultantes das reações de transcrição *in vitro*. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). **RL** – marcador de peso molecular 0.5-12Kb (Invitrogen).

#### 4.2.2.2 Transfecção dos RNAs recombinantes infecciosos quiméricos (YF/DEN) em células de inseto C6/36

Os RNAs recombinantes transcritos (Figura 4.11) foram utilizados para transfecção em células de inseto C6/36 pelo método de lipofectina. A cultura foi mantida a temperatura adequada em estufa BOD e analisada nos tempos de 72, 96 e 120 horas pós transfecção (hpt) (Figura 4.12). As partículas virais infecciosas presentes no sobrenadante das culturas celulares foram quantificadas pela técnica de imunodeteção por foco em células C6/36, apresentando títulos de  $4,7 \cdot 10^4$  ffu/mL (vAC YF/DENV-1),  $4,5 \cdot 10^4$  ffu/mL (vPAC YF/DENV- E<sub>402</sub>) e  $5 \cdot 10^4$  ffu/mL (vAC YF/DENV- E<sub>405</sub>).



**Figura 4.12 – Análise da cinética de transfecção do RNA dos vírus quiméricos recombinantes pela técnica de imunofluorescência.** As culturas de células C6/36 foram fixadas e submetidas à incubação com anticorpos policlonais contra o YFV, seguida da incubação com anticorpos anti-camundongo conjugado com isocianato de fluoresceína (FITC - do inglês, *fluorescein isothiocyanate*). As fotos foram feitas em microscópio óptico NIKON ECLIPSE E600, utilizando o software Image-ProR Plus versão 4.5. Aumento de 400X.

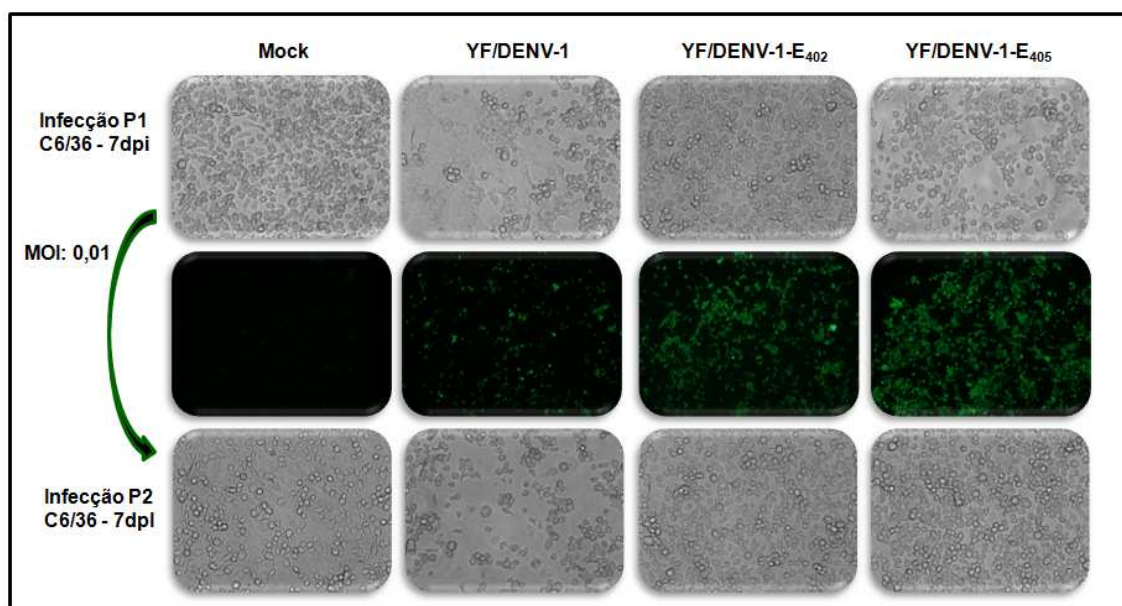
#### 4.2.2.3 Análise comparativa do efeito citopático produzido pelos vírus recombinantes quiméricos em culturas de células de inseto

Os vírus recombinantes quiméricos gerados a partir da transfecção do RNA viral em células C6/36 foram utilizados para infectar células de inseto com MOI de 0,01. A MOI baixa foi utilizada a fim de garantir a integridade genética dos vírus e prevenir o acúmulo de partículas defectivas interferentes. A figura 4.13 mostra o padrão de infecção dos vírus quiméricos recombinantes vAC YF/DENV-1, vAC YF/DENV-E<sub>402</sub> e vAC YF/DENV-E<sub>405</sub>. Todos os vírus recombinantes foram capazes de infectar eficientemente células de inseto da linhagem C6/36, como evidenciado pela síntese de proteínas virais 7 dpi.

Os vírus quiméricos recombinantes YF/DENV-1 não diferem quanto à produção de progênie viral identificadas no sobrenadante de células C6/36 infectadas com MOI de 0,01. Os títulos observados na P1 em células C6/36 foram de  $6,2 \cdot 10^4$  ffu/mL para o vírus parental (YF/DENV-1) e de  $1,9 \cdot 10^4$  ffu/mL e  $6,2 \cdot 10^4$  ffu/mL para os vírus mutados YF/DENV-1/E<sub>402</sub> e YF/DENV-1/E<sub>405</sub>, respectivamente.

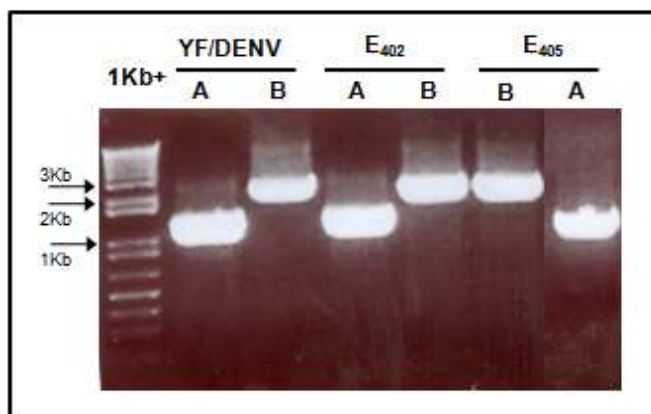


Para avaliar a estabilidade do fenótipo dos vírus quiméricos recombinantes, mais uma passagem em células de inseto (P2) foi realizada a partir dos vírus quiméricos presentes no sobrenadante da Passagem 1 (P1) (Figura 4.13). Da mesma forma, as infecções foram acompanhadas até 7 dpi, confirmando a ausência de CPE em células C6/36 infectadas com os vírus YF/DENV-1/E<sub>402</sub> e YF/DENV-1/E<sub>405</sub>.



**Figura 4.13 – Efeito das mutações E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub> na modulação fenotípica dos vírus quiméricos recombinantes YF/DENV-1 em células C6/36 7 dpi.** As fotos em campo claro foram feitas em aumento de 400X. As culturas celulares foram marcadas com anticorpos policlonais contra o YFV e anti-camundongo conjugado com FITC. As fotos da reação de imunofluorescência foram feitas em aumento de 200X em microscópio óptico NIKON ECLIPSE E600, utilizando-se o software Image-ProR Plus versão 4.5.

Após a segunda passagem em células C6/36, o RNA dos clones quiméricos recombinantes foi extraído a partir do precipitado das células infectadas, utilizando kit comercial. Os RNAs foram convertidos em cDNA na presença de *random primer* e este utilizado como molde para a amplificação por PCR de fragmentos que compreendiam a região prM-E dos vírus recombinantes (Figura 4.14). Todos os fragmentos foram purificados e sequenciados.



**Figura 4.14 – Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% das amplificações por PCR da região prM-E dos vírus quiméricos recombinantes vPAC-YF/DENV-1 da P2 em células C6/36. A numeração 1 corresponde aos fragmentos amplificados com os oligonucleotídeos DomB+ e YF13- e a numeração 2 corresponde aos fragmentos amplificados com os oligonucleotídeos DomB- e YF31+. 1Kb+ – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen).**

A ausência de mutações aleatórias na região prME do genoma dos vírus quiméricos recombinantes nos permite assegurar o papel das substituições de aminoácidos Phe<sub>E402</sub>Leu e Thr<sub>E405</sub>Ile na modulação do CPE em cultura de células.

### **4.3 Produção de insumos para o estudo das mutações na proteína NS3 do DENV-1**

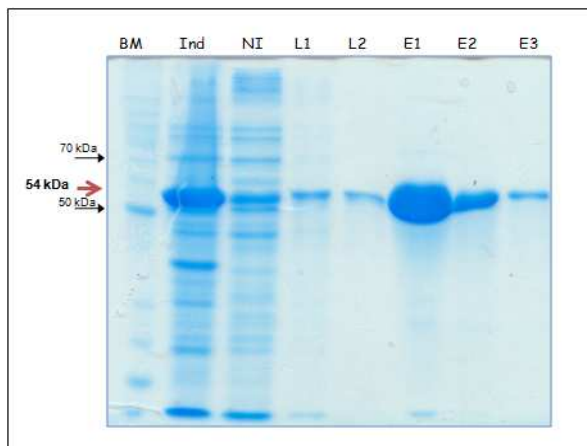
#### **4.3.1 Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra a proteína NS3 helicase do DENV**

Os procedimentos para produção de anticorpos monoclonais (mAbs) contra a proteína NS3 do DENV foram baseados no protocolo modificado de produção de mAbs utilizando células híbridas (MAZZAROTO et al., 2009), descrito primeiramente por Kohler e Milstein em 1975 e por Oi et al. em 1984.

##### **4.3.1.1 Obtenção da proteína recombinante NS3 helicase (NS3<sub>hel</sub>) do DENV-1**

A proteína NS3<sub>hel</sub> do DENV-1 cepa FGA/89 foi expressa eficientemente em *E. coli* cepa Rosetta 2 (DE3) e purificada da fração solúvel por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados em resina de sefarose. Ao final do

processo obteve-se uma proteína de massa molecular de 54 kDa (Figura 4.15), com um rendimento protéico de aproximadamente 5 mg de proteína por litro de cultivo celular.



**Figura 4.15 - Análise da expressão e purificação da proteína NS3<sub>hel</sub> recombinante do DENV-1 por SDS-PAGE, realizada sob condições desnaturantes em gel de poliácridamida 13%. As proteínas foram visualizadas por meio da coloração com *Coomassie brilliant blue*. **BM.** Padrão de massa molecular BenchMark (Invitrogen). **NI.** Extrato não-induzido. **Ind.** Extrato induzido com IPTG 0,4mM. **L1- L2.** Fração do lavado da coluna. **E1-E2.** Frações eluídas com tampão contendo 150mM de Imidazol. **E3.** Fração eluída com tampão contendo 300mM de Imidazol.**

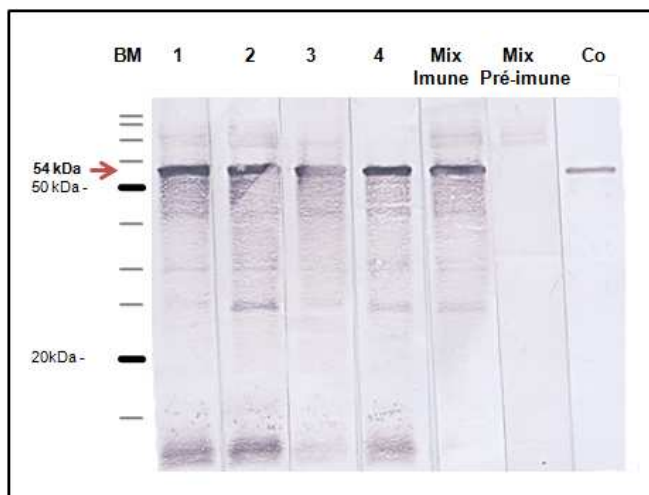
#### 4.3.1.2 Imunização de camundongos

Para a obtenção de anticorpos monoclonais anti-NS3<sub>hel</sub>, quatro camundongos da linhagem BALB/c foram imunizados com cinco doses da proteína recombinante por diferentes vias de inoculação, conforme descrito no item 3.9.2.

Os soros dos animais selecionados para imunização com a proteína recombinante foram analisados antes de ser iniciado o protocolo de imunização e não apresentaram reatividade com a proteína NS3<sub>hel</sub> do DENV-1 em ensaios de *western blotting*, com a proteína imobilizada em membrana de nitrocelulose, e ensaio imunoenzimático com a proteína imobilizada em placas de ELISA (0,02 ug de proteína/poço). Desta forma, foi possível evidenciar a ausência de anticorpos inespecíficos contra a proteína NS3 recombinante. Após quatro imunizações, o soro de cada animal foi avaliado para a presença de anticorpos policlonais contra a proteína alvo pelas técnicas de *western blotting* e ELISA. Todos os soros dos



camundongos foram reativos com o domínio helicase da proteína NS3<sub>hel</sub> do DENV-1, imobilizado em membrana de nitrocelulose (Figura 4.16) e em placas de ELISA (dados não mostrados). Finalmente, mais uma dose de reforço da proteína, sem presença de adjuvante, foi administrada via veia caudal.



**Figura 4.16 - Análise da produção de anticorpos policlonais em soro de camundongos BALB/c imunizados com a proteína NS3<sub>hel</sub> do DENV por ensaio de *western blotting*.** A proteína alvo (NS3<sub>hel</sub> do DENV-1), imobilizada em membrana de nitrocelulose, foi reagida com a mistura dos soros dos animais pré-imunização (**Mix pré-imune**), com o soro dos animais individuais pós-imunização (**1, 2, 3 e 4**) e mistura dos soros pós-imunização (**Mix imune**) com a proteína NS3<sub>hel</sub> recombinante purificada. **Co** indica o controle da reação, proteína NS3<sub>hel</sub> reagida com soro policlonal contra o DENV. **BM**. Padrão de massa molecular

#### 4.3.1.3 Obtenção de hibridomas secretores de anticorpos anti-NS3<sub>hel</sub> do DENV

Após confirmação da soroconversão contra a proteína recombinante NS3<sub>hel</sub> do DENV, os esplenócitos dos animais foram fusionados com células mielômicas da linhagem Ag8XP3653 para produção de células híbridas imortais secretores de anticorpos. Durante o processo de fusão, 1.760 poços contendo  $2,5 \cdot 10^5$  células foram gerados, dos quais 1.634 (92,8% do total de poços) apresentaram expansão clonal após a seleção em meio HAT e foram submetidos à triagem pela técnica de ELISA. As placas de ELISA foram sensibilizadas com 0,02 ug da proteína purificada NS3<sub>hel</sub>. Dos hibridomas testados, 180 (11% do total de poços) apresentaram D.O.

acima de 0,3 e foram considerados positivos. Dentre os clones secretores de anticorpos anti-NS3, 44 foram selecionados para análise de estabilidade por ciclos de congelamento e descongelamento, os demais 136 foram armazenados em nitrogênio líquido, após expansão em cultivo, para análise futura. Dos 44 hibridomas selecionados, apenas 9 clones (20,4%) permaneceram estáveis para a secreção de anticorpos anti-NS3<sub>hel</sub>. Todos os hibridomas selecionados (83, 64, 471, 540, 572, 954, 1281, 1402 e 1722) foram positivos nos testes de ELISA, *western blotting* e IFI (dados não mostrados). Os 9 clones selecionados foram submetidos à diluição limitante, gerando 15 subclones positivos pelo teste de ELISA. Estes clones foram então submetidos à isotipagem, conforme descrito no item 3.9.5. Dos clones isotipados, 7 (83-7C, 234-8E, 358-8E, 1281-1D, 1281-2D, 1402-7B e 1722-1B) foram identificados como monoclonais e todos foram classificados como anticorpos isotípicos de cadeia pesada da classe IgG1 e cadeia leve do tipo Kappa.

A especificidade dos subclones 1281-2D, 1402-7B e 1722-1B foi avaliada por IFI em células C6/36 infectadas com 1MOI dos DENV-1 cepas FGA/89, DENV-2- cepa Jamaica, DENV-3 cepa BR/290 e DENV-4 cepa ThD4-0087-77 (Figura 4.17). Os resultados mostram claramente que os mAbs testados reagem de maneira específica com a proteína NS3 nativa do DENV-1. No entanto, apresentaram especificidade distinta quando desafiados com a proteína nativa de outros sorotipos do DENV (2, 3 e 4), sugerindo o reconhecimento de epítomos distintos. Através da análise das sequências conservadas do domínio helicase da proteína NS3 dos quatro sorotipos do DENV pode-se supor alguns epítomos lineares candidatos para o reconhecimento específicos pelos mAbs desenvolvidos neste trabalho (Figura 4.18).

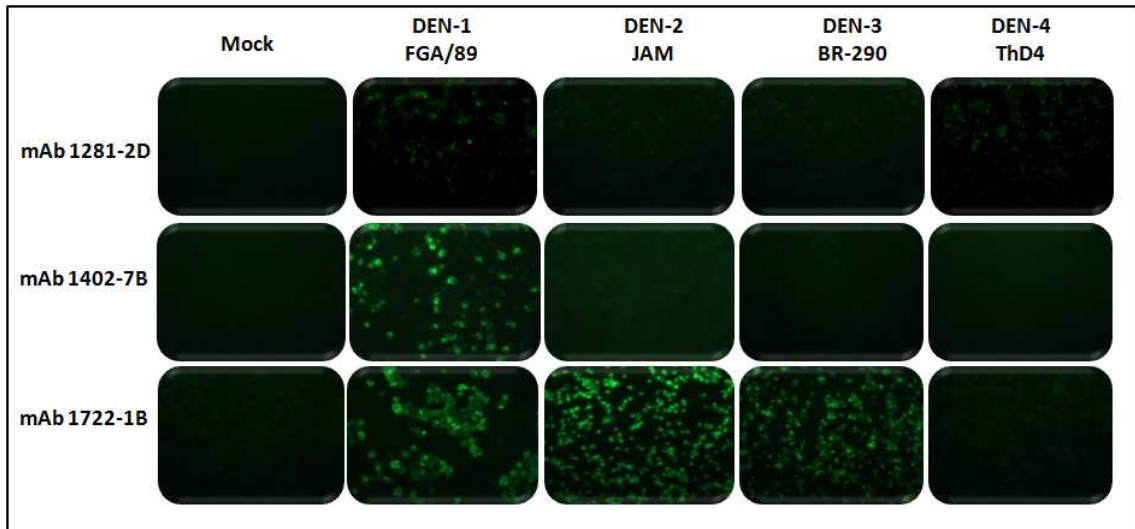


Figura 4.17 Análise da reatividade dos mAbs anti-NS3<sub>hel</sub> por imunofluorescência em células C6/36 infectadas com os DENV1-4. As células foram incubadas primeiramente com os diferentes mAbs anti-NS3<sub>hel</sub> (diluição 1:100) e, em seguida, com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com FITC. Mock = controle negativo, células não infectadas. A = 200X.

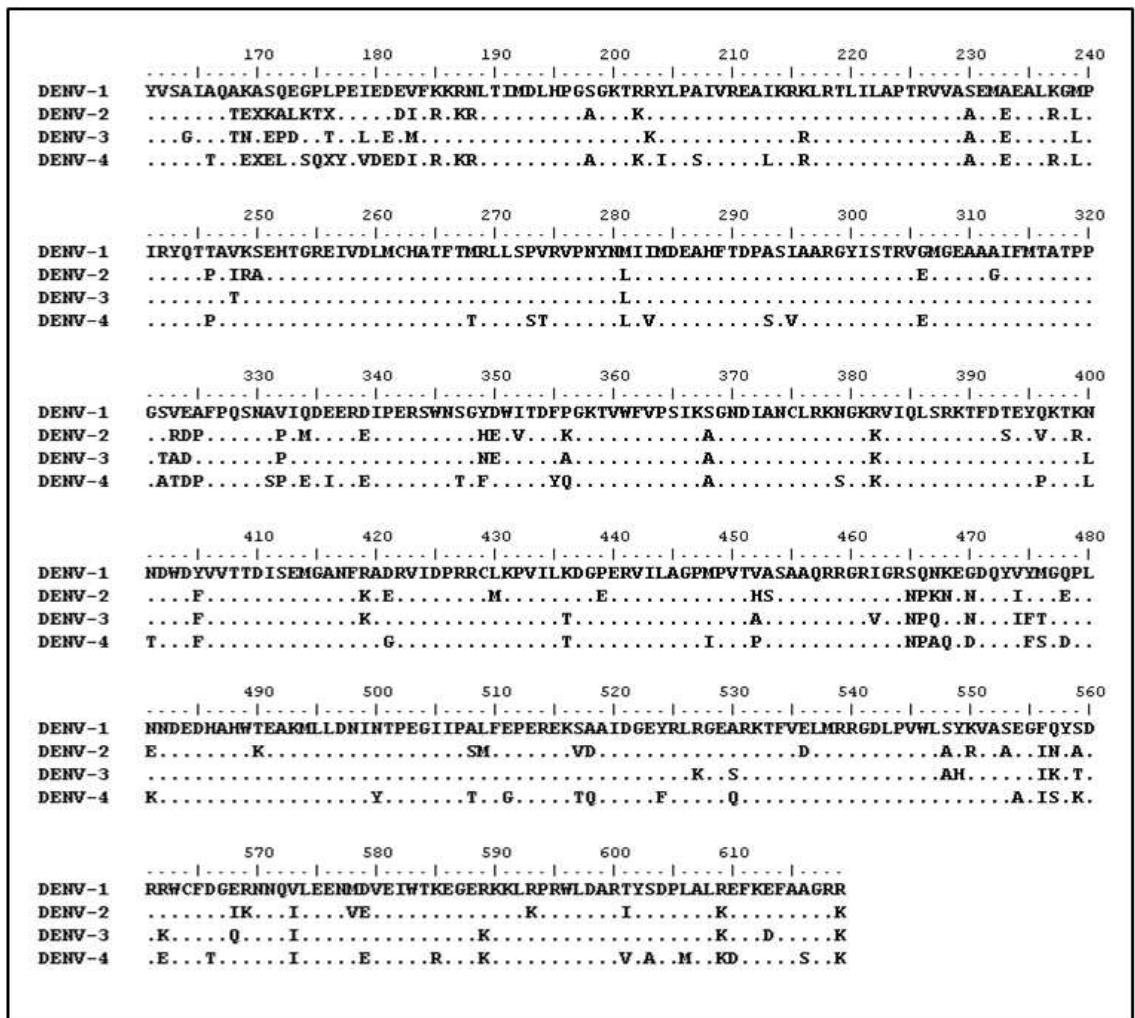
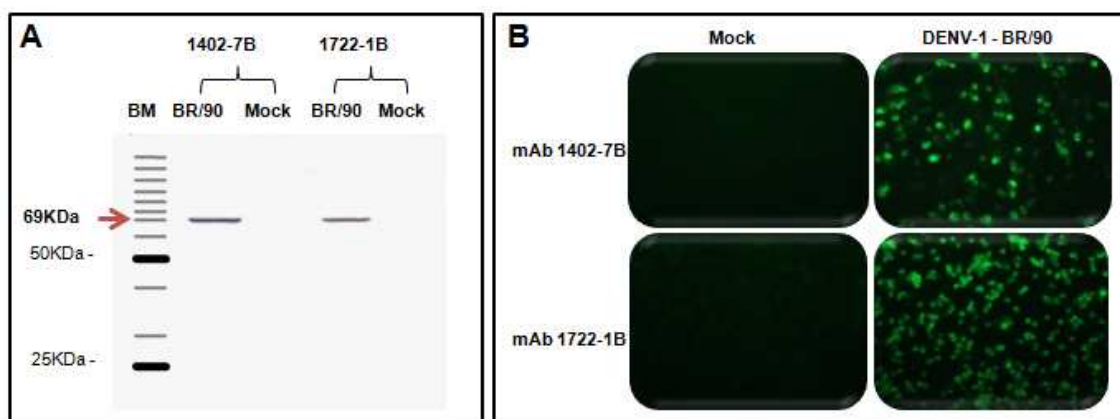


Figura 4.18 – Alinhamento de aminoácidos do domínio helicase dos DENV. DENV-1, cepa FGA/89 (número de acesso no GenBank AF226687), DENV-2, cepa Jamaica (GenBank

número de acesso M20558), DENV-3, cepa BR/290 (*GenBank* número de acesso EF629369) e DEN4, cepa ThD4\_0087\_77 (número de acesso *GenBank* AY618991).

O hibridoma 1402-7B que secreta mAbs que reconhecem apenas o sorotipo DENV-1 e o hibridoma 1722-1B que secreta mAbs que reconhecem os 3 sorotipos do DENV (1, 2 e 3) foram expandidos por cultivo celular. O sobrenadante de cada cultura foi precipitado e, em seguida, purificado por cromatografia de afinidade em coluna G-sepharose. Os anticorpos foram quantificados e titulados por *immunoblotting*. A reatividade dos mAbs purificados com a proteína NS3 do DENV-1 cepa BR/90 foi avaliada por IFI e *western blotting* em células C6/36 infectadas com o vírus e com o mock (Figura 4.19).



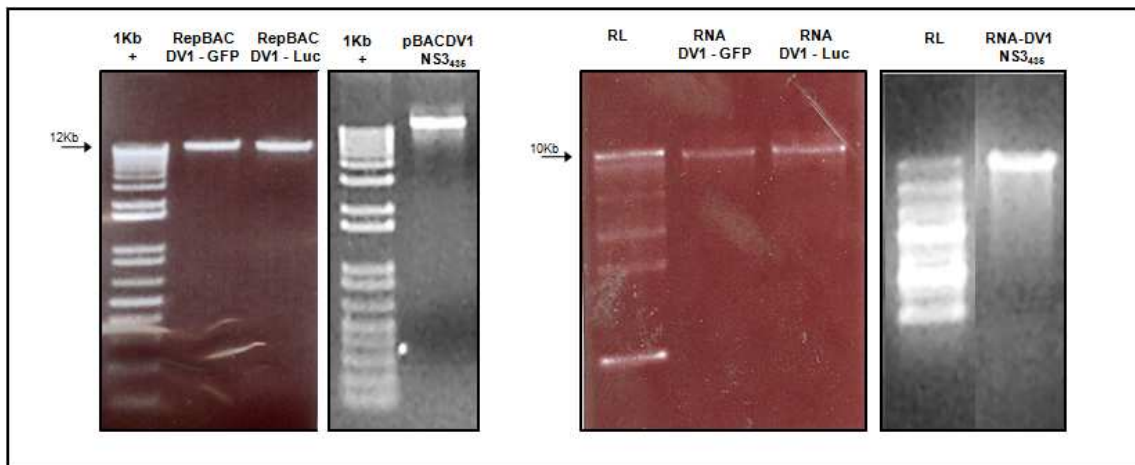
**Figura 4.19 – Análise da reatividade dos mAbs 1402-7B e 1722-1B contra a proteína do DENV-1 cepa BR/90. A. Western blotting. B. Imunofluorescência indireta.** As membranas de nitrocelulose imobilizadas com as proteínas presentes no lisado celular de C6/36 infectadas com o vírus DEN-1 BR/90 e mock e as células fixadas em lâmina de vidro foram incubadas primeiramente com os mAbs anti-NS3<sub>nel</sub> 1402-7B e 1722-1b e, em seguida, com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina ou FITC. As fotos foram feitas em microscópio NIKON ECLIPSE E600 (Nikon, Inc., Melville, NY) com o software Image-Pro Plus versão 4.5 (MediaCybernetics, Bethesda MD).

Os anticorpos anti-NS3 foram produzidos, principalmente, para utilização em ensaios de expressão da proteína NS3 durante a replicação *in vitro*, utilizando o sistema subgenômico de replicon do DENV-1, abordado a seguir. Além disso, os mAbs 1402-7B e 1722-1B foram utilizados para padronização do protocolo de imunoprecipitação da proteína NS3 durante a infecção do DENV-1 em células C6/36 e Huh7.5 (dados não mostrados). Estudos posteriores utilizando estes protocolos serão realizados para co-imunoprecipitar e identificar por espectrometria de massas

parceiros moleculares da proteína NS3, durante a replicação do DENV em células de cultura primária humana.

#### 4.3.2 Utilização da tecnologia de replicons subgenômicos de DENV-1

Com o intuito de caracterizar o papel das mutações na proteína NS3 na modulação das habilidades replicativas do DENV-1 em um sistema subgenômico de replicação, nós avaliamos, primeiramente, a funcionalidade dos replicons subgenômicos do DENV-1 contendo os marcadores moleculares GFP (RepBACDV1 #76-GFP) e renilla luciferase (Luc) (RepBACDV1 #79-Luc), previamente construídos por SUZUKI et al. (2007). O RNA subgenômico obtido por transcrição *in vitro*, utilizando como molde a sequência de DNA dos clones RepBACDV1 #76-GFP e RepBACDV1 #79-Luc (Figura 4.20) foram transfectados pelo método de lipofectina em células C6/36 (1 ug de RNA purificado em  $1.10^5$  células).

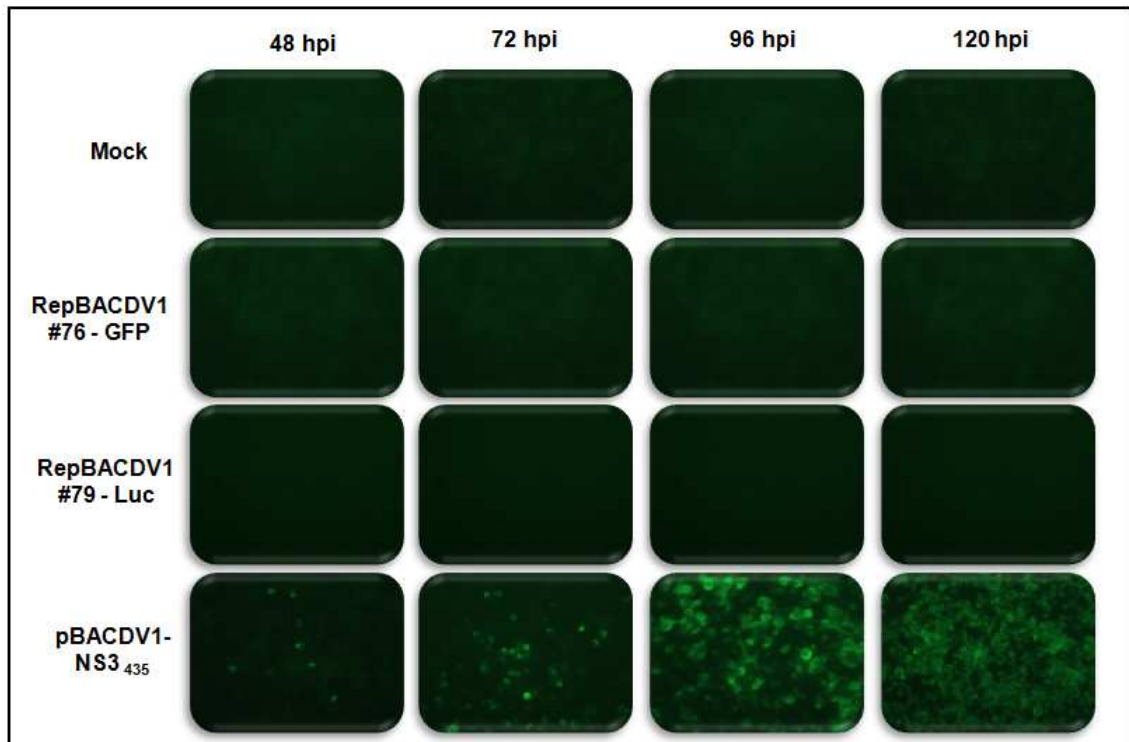


**Figura 4.20 – Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% dos clones subgenômicos do DENV-1 contendo os genes repórteres GFP e renilla luciferase. RNAs resultantes das transcrições *in vitro* (B) dos clones RepBACDV1 #76-GFP, RepBACDV1 #79-Luc e pBACDV1-NS3<sub>435</sub> linearizados com endonuclease de restrição SwaI (A). 1Kb+ – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). RL – marcador de peso molecular 0.5-10 Kb RNA (Invitrogen).**

A expressão de proteínas virais e a síntese de RNA viral nas células C6/36 transfectadas com os RNAs subgenômicos foram avaliadas até 120 hpt pelas técnicas de imunofluorescência, utilizando anticorpos monoclonais contra a proteína NS3, e RT/qPCR, utilizando primers para a detecção do gene da proteína NS3. O RNA proveniente do clone infeccioso pBACDV1-NS3<sub>435</sub> foi transcrito *in vitro* e utilizado como controle do método de transfecção. No entanto, os replicons



subgenômicos do DENV-1 contendo os genes repórteres GFP e renilla luciferase foram incapazes de se replicar e sintetizar proteínas virais na célula hospedeira (Figura 4.21).



**Figura 4.21 - Cinética de transfecção dos RNAs subgenômicos do DENV-1 em células de inseto C6/36.** As culturas de células foram fixadas e submetidas à incubação com anticorpos monoclonais contra a proteína NS3<sub>hel</sub> 1402-1B, seguida da incubação com anticorpos anti-camundongo conjugado com FITC. As fotos foram feitas em microscópio óptico NIKON ECLIPSE E600, utilizando-se o software Image-ProR Plus versão 4.5. Aumento de 200X. Mock = controle da transfecção sem RNA viral.

Toda a sequência nucleotídica dos clones subgenômicos RepBACDV1 #76 – GFP e RepBACDV1 #79 – Luc foi determinada por sequenciamento e não foi detectada a presença de mutações ou deleções que pudessem explicar a incapacidade de replicação *in vitro*. A estratégia de inserção dos genes repórteres, controlados por um sítio de entrada interna ao ribossomo (do inglês, *internal ribosome entry site* – IRES), na região variável da 3'UTR do genoma do DENV-1 pode ter contribuído para a ineficiência de replicação observada *in vitro*. Dessa forma, como a estratégia descrita falhou para a obtenção de um replicon do DENV-1 viável e a tecnologia de replicons subgenômicos apresenta-se como uma interessante ferramenta para o estudo de marcadores moleculares de virulência e, futuramente, para estudos de triagem de compostos antivirais. Decidimos delinear

outra estratégia, descrita a seguir, para a obtenção de replicons do DENV-1 funcionais.

#### **4.3.2.1 Construção de replicons subgenômicos do DENV-1**

Os replicons subgenômicos do DENV-1 foram gerados a partir dos clones infecciosos pBACDV-1 contendo as mutações de interesse na proteína NS3 (BORBA, STROTTMANN et al., 2012). O genoma infeccioso pBACDV1 (SUZUKI et al., 2007) foi construído em um cromossomo artificial de bactéria (BAC), vetor de cópia única, e contém o genoma completo do DENV-1 cepa BR/90, a sequência do promotor da T7 RNA polimerase (T7 prom), a sequência da ribozima do vírus da hepatite delta (HDV-RZ), o sítio de terminação da T7 RNA polimerase (T7 term) e o sítio de restrição Swal, imediatamente após o término do genoma viral. Borba (2010) utilizou o DNA do clone infeccioso pBACDV1 para a geração de clones infecciosos recombinantes contendo cada uma das mutações identificadas nas cepas variantes neurovirulentas do DENV-1 FGA/NA d1d e FGA/NA P6 (Tabela 1.1).

Para obtenção dos clones subgenômicos do DENV-1 (pRepBACDV1, pRepBAC-NS3<sub>209</sub>, pRepBAC-NS3<sub>435</sub>, pRepBAC-NS3<sub>480</sub>) a porção 5' do genoma dos clones infecciosos de DENV-1 foram substituídas pelo fragmento amplificado por PCR a partir do replicon subgenômico de DEN-1 #76-GFP (Figura 4.22). Este fragmento continha o sítio de iniciação do promotor T7 a montante da 5'UTR do vírus mais 93 nucleotídeos da porção N-terminal do capsídeo, seguida por 78 nucleotídeos da porção C-terminal da proteína E e 62 nucleotídeos das proteínas NS1 do DENV. As porções das proteínas estruturais C e E foram mantidas, pois são requeridas para o ancoramento da poliproteína viral nas membranas do RE, possibilitando, a tradução e o processamento da poliproteína viral. A estratégia de clonagem utilizada para construção dos replicons subgenômicos do DENV-1 está esquematizada na figura 4.22. Os possíveis clones recombinantes foram triados por PCR de colônia e o sucesso da estratégia de clonagem foi avaliado pelo sequenciamento nucleotídico. Nenhuma mutação espúria foi observada no genoma dos clones obtidos.

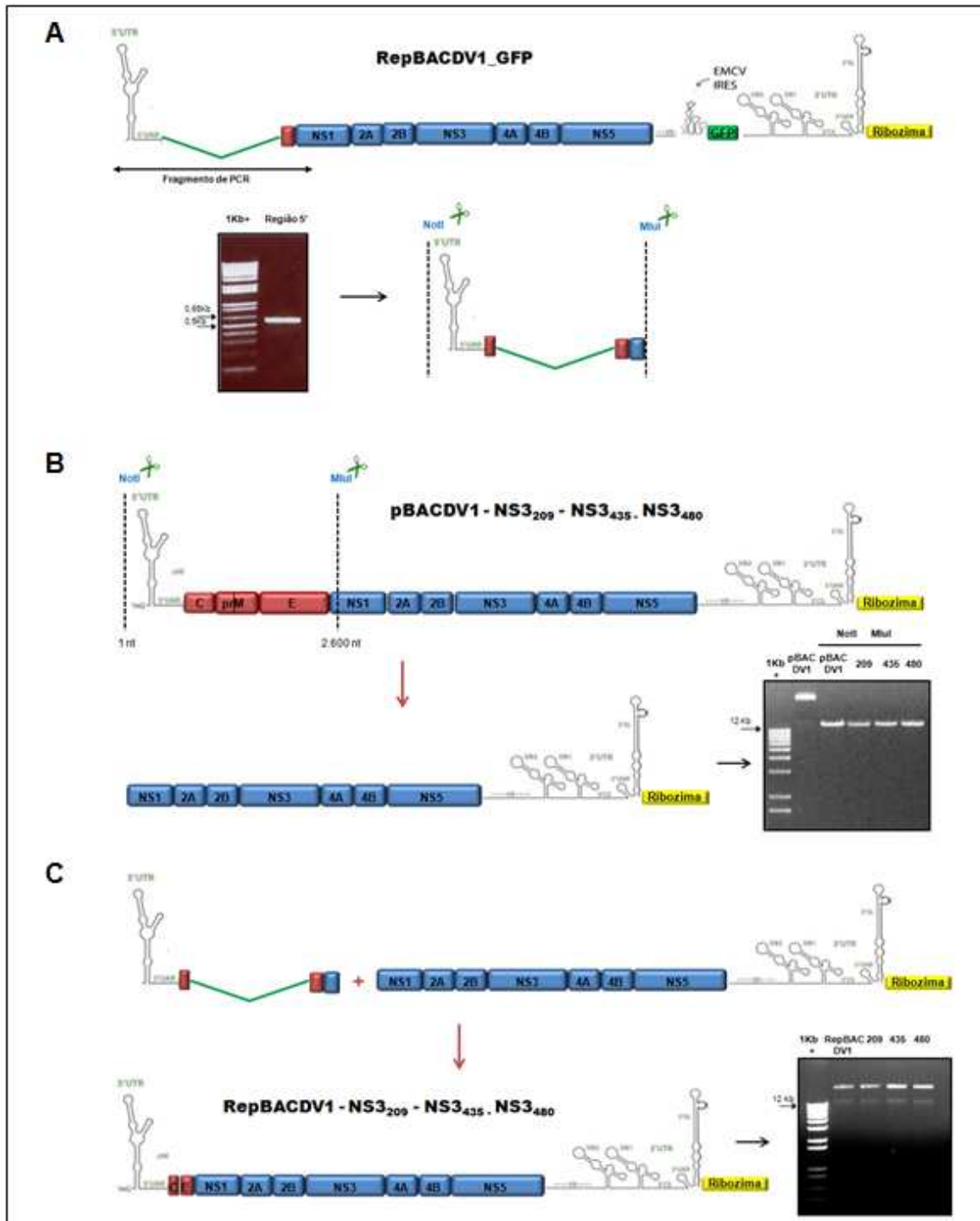


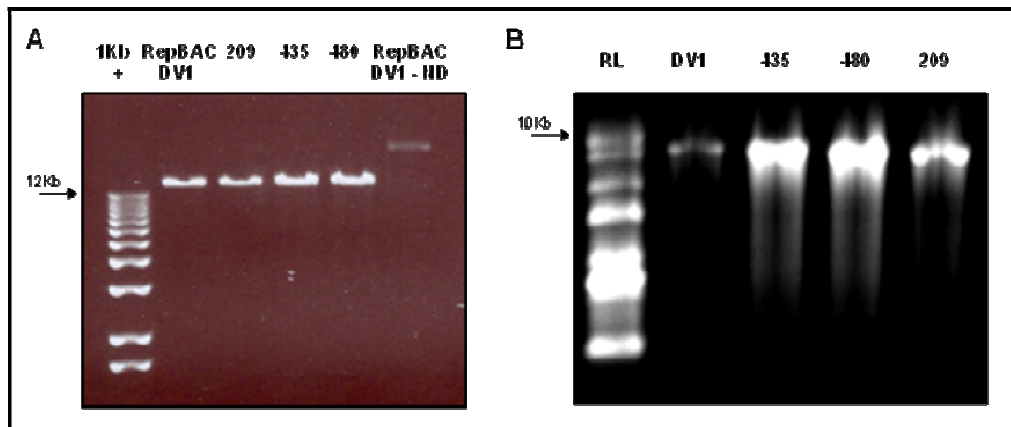
Figura 4.22 - Esquema da estratégia de clonagem para obtenção dos replicons subgenômicos de DENV-1, contendo as mutações de interesse na proteína NS3. O replicon subgenômico não funcional do DENV-1 (RepBACDV1 #76 – GFP) foi utilizado como molde para amplificação da porção 5' do clone. O fragmento foi digerido com as enzimas de restrição NotI e MluI, gerando um fragmento de 472 pb o qual foi utilizado para substituir a porção 5' dos clones pBACDV-1, pBACDV1-NS3<sub>209</sub>, pBACDV1-NS3<sub>435</sub> e pBACDV1-NS3<sub>480</sub>, previamente digeridos com as mesmas endonucleases de restrição, e gerar os replicons subgenômicos RepBACDV-1, RepBACDV1-NS3<sub>209</sub>, RepBACDV1-NS3<sub>435</sub> e RepBACDV1-NS3<sub>480</sub>, sem a presença do gene repórter. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen).



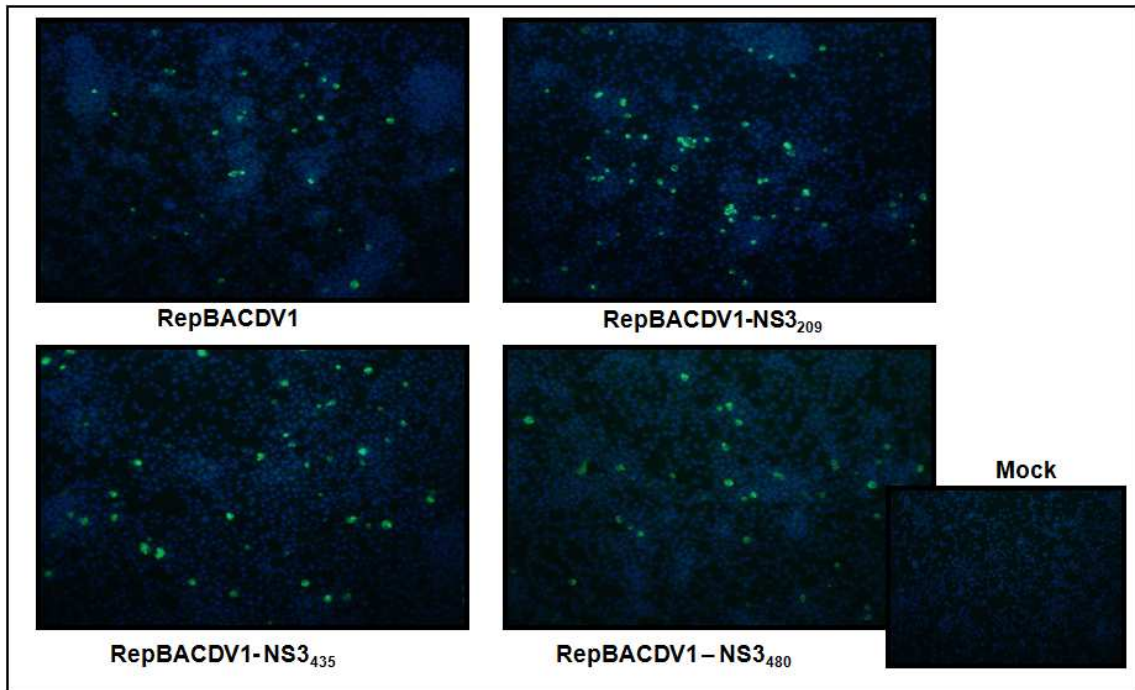
### 4.3.2.2 Transfecção dos RNAs recombinantes sugenômicos do DENV-1 em cultura de células

Os RNAs recombinantes foram transcritos a partir do DNA molde dos clones subgenômicos do DENV-1 linearizado com a endonuclease de restrição Swal (Figura 4.23), utilizando o kit de transcrição *in vitro* T7 MEGAscript (Ambion) em presença de *cap*. Os transcritos purificados (Figura 4.23) foram utilizados para transfecção lipídica em células de inseto C6/36. A concentração de 1 $\mu$ g do RNA viral subgenômico foi utilizada para a transfectar 1.10<sup>5</sup> células C6/36 e avaliar a capacidade replicativa do sistema. A expressão de proteínas NS3 do DENV em células C6/36 foi avaliada 120 hpi pela técnica de imunofluorescência indireta. Conforme mostrado na figura 4.24, a nova estratégia para a obtenção de replicons subgenômicos do DENV-1 foi eficiente, culminando na expressão de proteínas virais.

Os RepBACDV1, RepBAC-NS3<sub>209</sub>, RepBAC-NS3<sub>435</sub> e RepBAC-NS3<sub>480</sub> foram inteiramente sequenciados, confirmando a identidade da sequência nucleotídica dos clones subgenômicos do DENV-1.

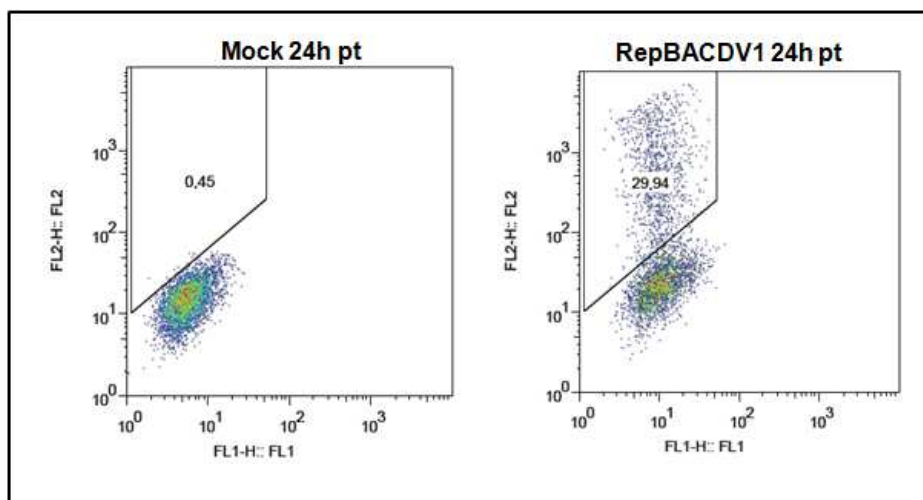


**Figura 4.23 – Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% dos clones subgenômicos do DENV-1.** RNAs resultantes das transcrições *in vitro* (B) dos clones RepBACDV1, RepBACDV1-NS3<sub>209</sub>, RepBACDV1-NS3<sub>435</sub> e RepBACDV1-NS3<sub>480</sub> linearizados com endonuclease de restrição Swal (A). **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). **RL** – marcador de peso molecular 0.5-10Kb RNA (Invitrogen).



**Figura 4.24 - Imunofluorescência em células C6/36 transfetadas com os RNAs subgenômico dos DENV-1.** As culturas de células foram fixadas 120 hpi e submetidas à incubação com anticorpos monoclonais contra a proteína NS3<sub>hel</sub> 1402-1B, seguida da incubação com anticorpos anti-camundongo conjugado com FITC. As fotos foram feitas em microscópio óptico NIKON ECLIPSE E600, utilizando-se o software Image-ProR Plus versão 4.5. Aumento de 200X. Mock = controle da transfecção sem RNA viral.

Com o intuito de aperfeiçoar a eficiência da transfecção dos RNA subgenômicos do DENV, o método de transfecção de RNA por eletroporação, utilizando a tecnologia nucleofactor (Lonza), foi avaliado. Essa metodologia foi utilizada para transfectar os RNAs subgenômicos do RepBACDV-1 em células C6/36. A fim de compararmos a eficiência dos métodos de transfecção, utilizamos a mesma quantidade de RNA (1 ug) determinada para a transfecção lipídica do RNA subgenômico do DENV-1. A expressão de proteínas virais nas células 24 hpi foi avaliada por citometria de fluxo em FACSCanto II (BD), utilizando anticorpos monoclonais contra a proteína NS3. A transfecção do RNA subgenômico do DENV-1 por eletroporação mostrou-se mais eficiente que o método de transfecção lipídica, resultando na positividade de aproximadamente 30% de células C6/36 24 hpt (Figura 4.25).



**Figura 4.25 - Análise da transfecção do RNA subgenômico do RepBACDV1 em cultura de células C6/36 por citometria de fluxo.** As células foram marcadas com anticorpos monoclonais 1722-1B que reconhecem a proteína NS3 do DENV e anticorpos anti-camundongo conjugado com PE. **A.** Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células C6/36 positivas para a presença da proteína NS3 de DENV 24 hpt com mock ou RNA viral subgenômico do DENV-1. A porcentagem de células positivas está representada para cada condição.

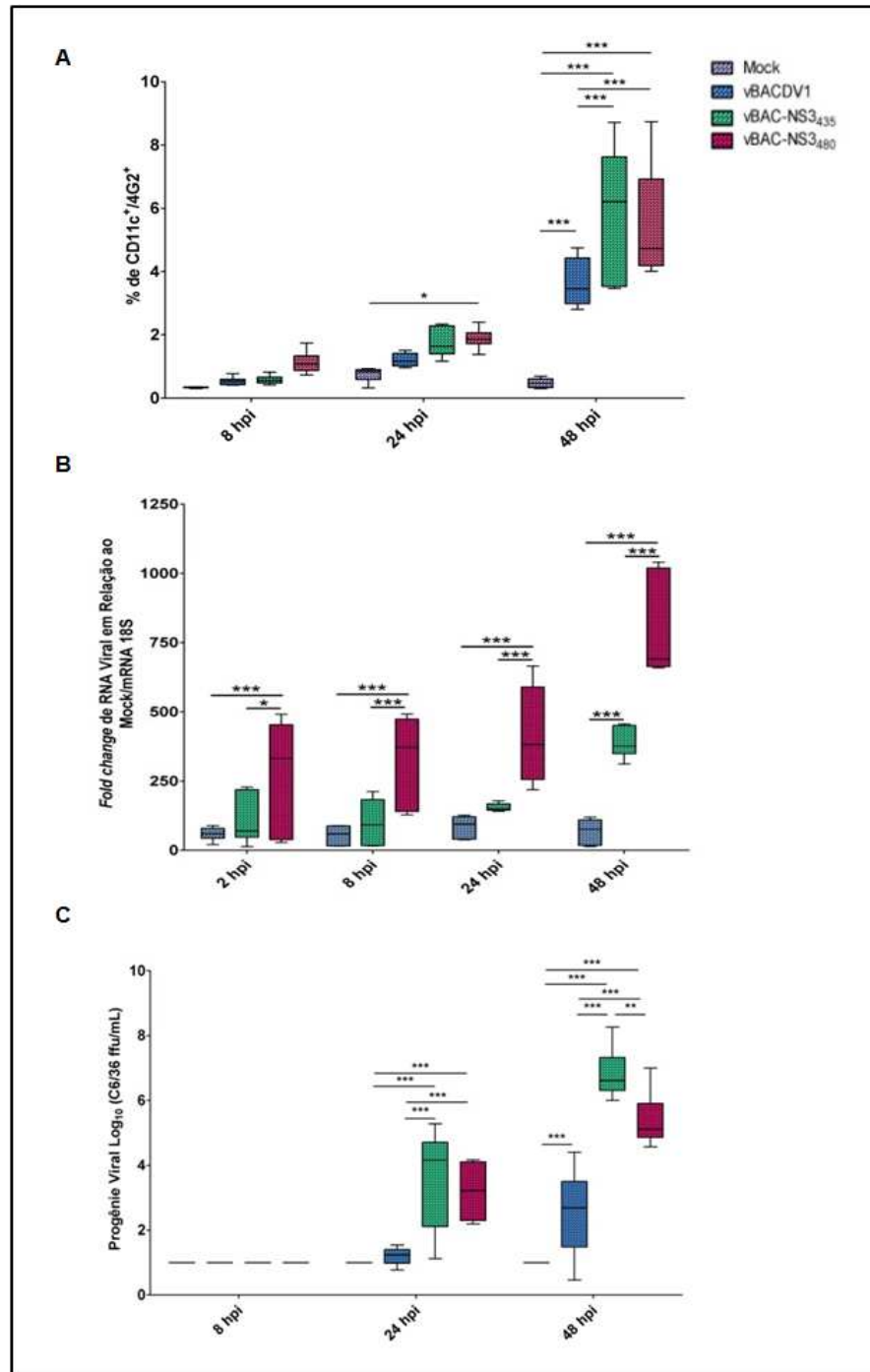
#### 4.4 Caracterização da infecção dos DENV-1 recombinantes em culturas primárias de células humanas

Os resultados de caracterização biológica dos DENV-1 recombinantes em modelo murino e em linhagens celulares humanas demonstram que a presença de uma serina nas posições NS3<sub>435</sub> e NS3<sub>480</sub> conferem ao vírus maior habilidade replicativa, aumentando substancialmente o *fitness* viral nestes modelos de estudo. Os dados sugerem que essas mutações constituem os maiores determinantes genéticos de virulência do DENV-1. Desta forma, decidimos avaliar o papel das mutações na proteína NS3 na modulação do *fitness* viral em um modelo de infecção mais próximo ao que ocorre na natureza, utilizando células dendríticas derivadas de monócitos humanos (mdDCs).

A escolha do modelo experimental de infecção deve-se ao fato de que durante o ciclo natural do vírus, as DCs (células de Langerhans e DCs residentes da derme) representam os primeiros alvos da infecção pelos DENV após a picada do mosquito vetor (WU et al., 2000; NAVARRO-SANCHEZ et al., 2003). Além disso, as DCs constituem uma das mais eficientes células apresentadoras de antígenos (do inglês, *Antigen Presentations Cells* – APCs) e podem desempenhar um papel na patogênese da dengue (DEJNIRATTISAI et al. 2008; WHITEHORN et al., 2011).

Para os estudos de caracterização biológica *ex vivo* dos DENV-1 recombinantes, nós utilizamos mdDCs provenientes de seis doadores saudáveis. As mdDCs foram obtidas a partir do sangue periférico humano, utilizando o protocolo previamente estabelecido em nosso laboratório (SILVEIRA et al., 2011). A análise da expressão dos marcadores de superfície das seis culturas de mdDCs, avaliada por citometria de fluxo, demonstrou que mais de 90% das células em cultura eram negativas para CD14 e positivas para os demais marcadores testados (CD11b, CD11c, CD209 e HLA-DR) (dados não mostrados), confirmando a diferenciação dos monócitos em DCs e a pureza das culturas. Uma vez comprovada a natureza das mdDCs, as culturas foram infectadas com mock e os vírus recombinantes vBACDV1, vBACDV1-NS3<sub>435</sub> e vBACDV1-NS3<sub>480</sub> em uma MOI de 5. A porcentagem de mdDCs positivas para a infecção viral foi avaliada por citometria de fluxo 8h, 24h e 48 hpi (figura 4.26). As taxas de replicação viral e produção de partículas virais infecciosas foram quantificadas pelas técnicas de RT/qPCR e imunodeteção por foco em células C6/36 (figura 4.26).

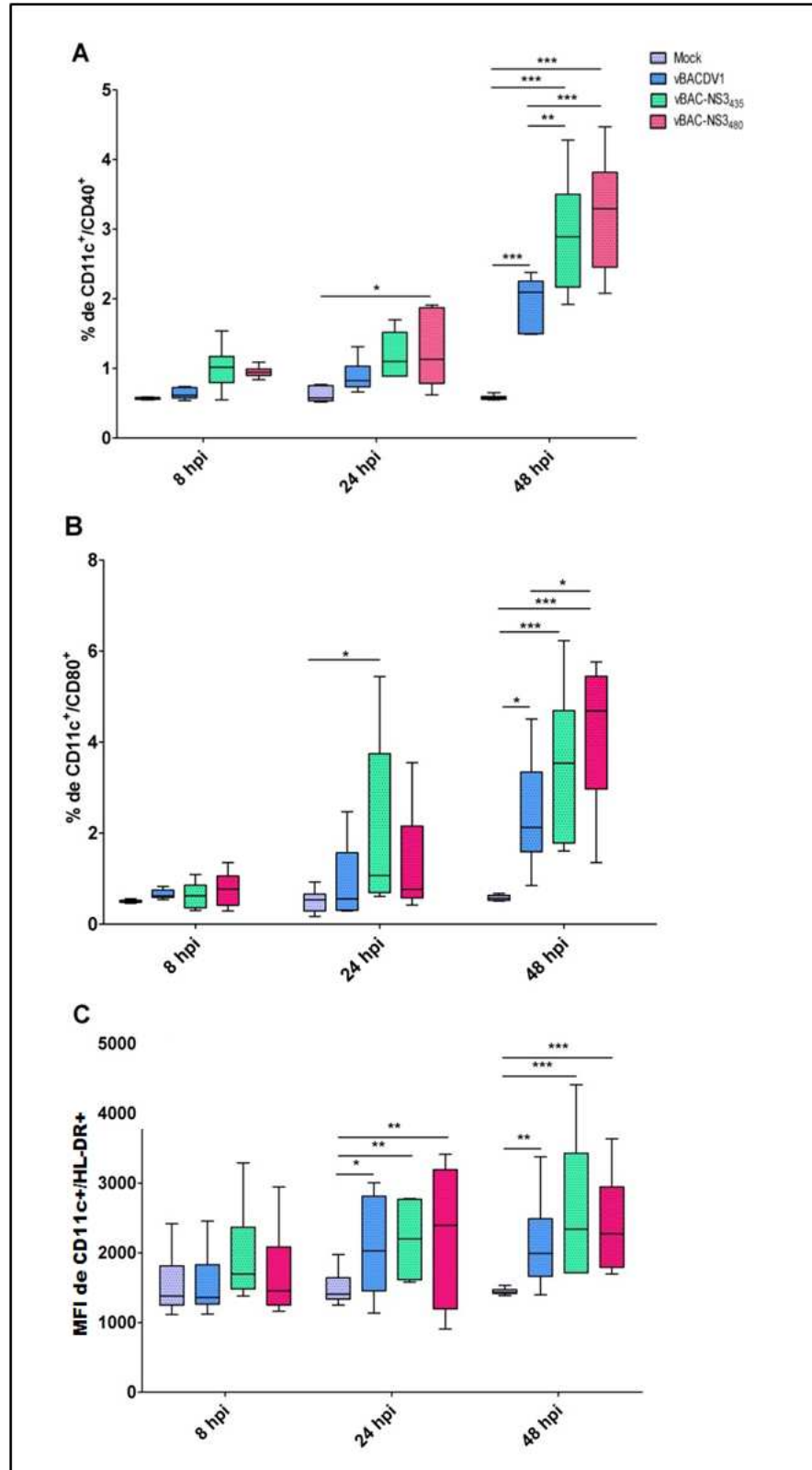
Como demonstrado na figura 4.26, os vírus contendo as mutações NS3<sub>435</sub> e NS3<sub>480</sub> infectam mais eficientemente mdDCs e são capazes de sintetizar um número significativamente maior de moléculas de RNA viral e partículas virais infecciosas, comparado com o vírus parental (vBACDV1). Os mais altos níveis de infecção dos DENV-1 recombinantes foram evidenciados 48 hpi. É importante ressaltar que todas as células positivas para DENV eram também positivas para CD11c, demonstrando que as células infectadas eram realmente mdDCs.



**Figura 4.26 – Análise da cinética de infecção dos DENV-1 recombinantes em mdDCs.** **A.** Co-marcação de mdDCs analisada por citometria de fluxo 8, 24 e 48 hpi. As mdDCs foram marcadas com anticorpos anti-CD11c conjugado com FITC e os DENV foram marcados com anticorpo monoclonal 4G2 anti-flavivírus, seguido pela marcação com anticorpo anti-camundongo conjugado com ficoeritrina (PE). **B.** Quantificação por RT/qPCR dos níveis de RNA viral em mdDCs nos tempos de 2, 8, 24 e 48 hpi. Os dados obtidos foram normalizados pelos níveis de expressão do gene 18S humano. **C.** Quantificação da progênie viral em sobrenadante de culturas de mdDCs por imunodeteção de foco em células C6/36 nos tempos de 8, 24 e 48 hpi. Os dados de seis experimentos independentes foram analisados pelo teste *Two-Way* ANOVA seguido pela correção de Bonferroni. Os valores estão expressos

pela média  $\pm$  o desvio padrão de seis experimentos independentes. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

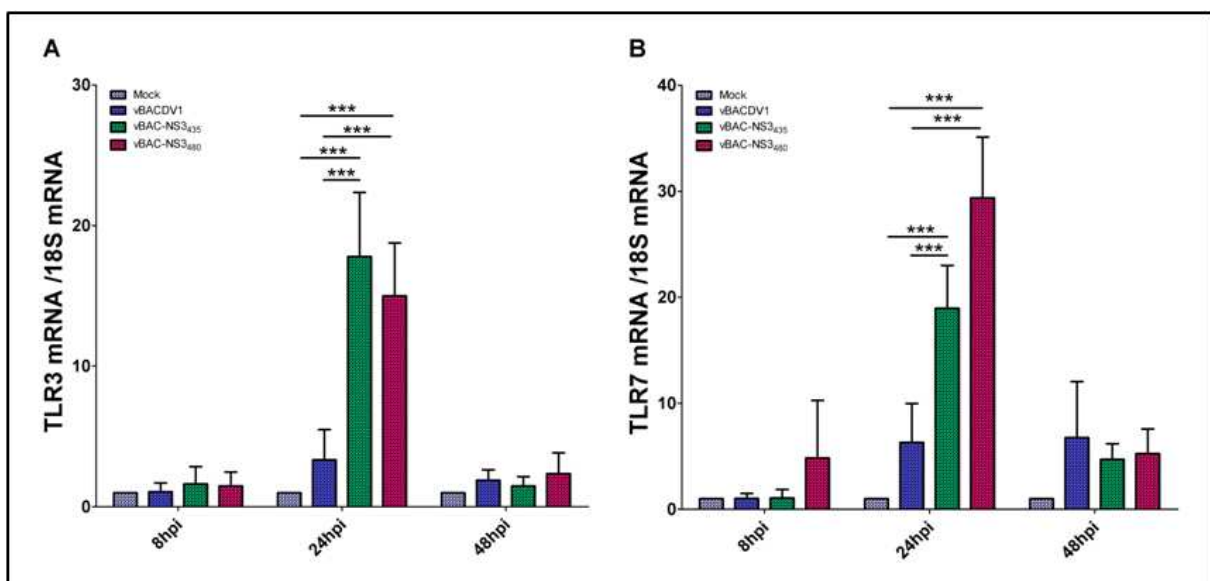
Nós avaliamos por citometria de fluxo a expressão de marcadores de ativação de superfície CD40, CD80 e HDLA-DR nas mdDCs infectadas com o mock e com os DENV-1 recombinates. Os dados de seis experimentos independentes demonstraram que não havia expressão diferencial de marcadores de ativação entre as mdDCs infectadas com o mock ou com os DENV-1 recombinantes 8 hpi. No entanto, nos tempos seguintes pode-se detectar um aumento no número de células expressando esses marcadores de ativação, principalmente 48 hpi; com nível de significância maior em mdDCs estimuladas com os DENV-1 mutantes (Figura 4.27).



**Figura 4.27 – Perfil da expressão de marcadores moleculares de ativação em mDCs infectadas com mock vBACDV1, vBAC-NS3<sub>435</sub> e vBAC-NS3<sub>480</sub>.** As células foram analisadas por citometria de fluxo utilizando-se o equipamento FACSCanto II (BD). **A.** Porcentagem de células positivas para dupla marcação (CD11c<sup>+</sup>/CD40<sup>+</sup>). **B.** Porcentagem de células positivas para dupla marcação (CD11c<sup>+</sup>/CD80<sup>+</sup>). **C.** Intensidade média de fluorescência (do inglês, *mean of fluorescence*)

*intensity* - MFI) de células positivas para dupla marcação (CD11c+/HLA-DR+). Os dados foram analisados pelo teste *Two-Way* ANOVA, seguido pela correção de Bonferroni. Os valores estão expressos pela média  $\pm$  o desvio padrão de seis experimentos independentes. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

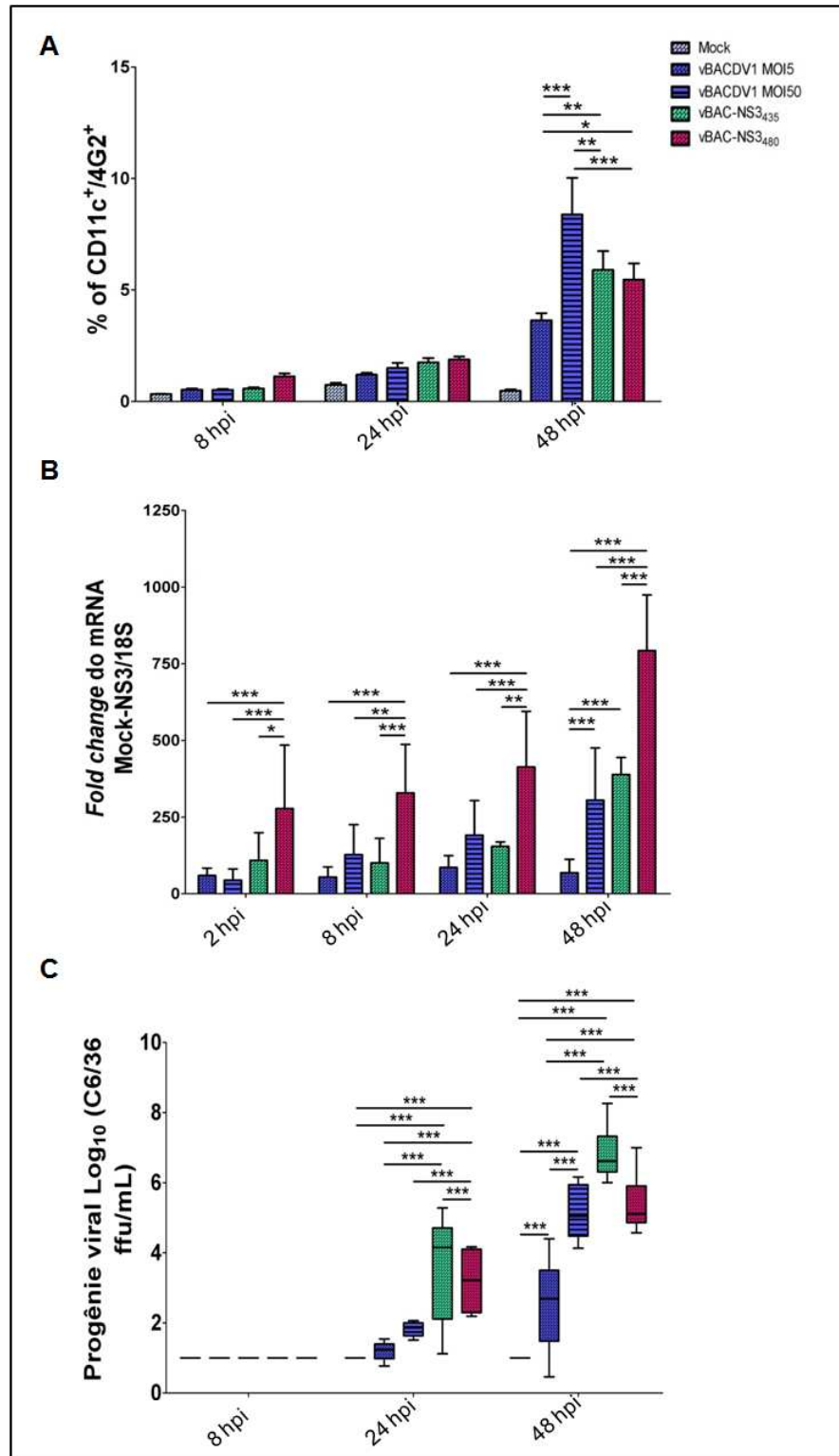
Com a finalidade de determinar a modulação da expressão gênica das mdDCs em resposta a infecção pelos DENV-1 recombinantes, culturas de mdDCs de dez voluntários saudáveis foram infectadas com os vírus vBACDV1, vBAC-NS3<sub>435</sub> e vBACDV1<sub>480</sub> a uma MOI de 5 e processadas para análise por microarranjos de DNA de alta densidade. A análise dos microarranjos revelou uma regulação positiva de genes estimulados por interferons (ISGs) e padrão de reconhecimento a patógenos (PRRs) nas células infectadas com os vírus mutantes em comparação ao vírus parental. Com intuito de validar os resultados observados nos microarranjos, nós avaliamos, primeiramente, os níveis de expressão gênica dos receptores do tipo Toll (do inglês, *toll-like receptor* - TLR) 3 e 7 durante a cinética de infecção dos DENV-1 recombinantes em mdDCs, pois a expressão de ambos os genes apresentava-se positivamente modulada em células infectadas com os DENV-1 recombinantes mutantes. Os resultados obtidos por RT/qPCR demonstraram modulação diferencial significativa dos genes de TLR3/TLR7 em mdDCs infectadas com os vírus vBAC-NS3<sub>435</sub> e vBAC-NS3<sub>480</sub> 24 hpi comparado com o vírus parental (Figura 4.28), validando os resultados obtidos pela técnica de microarranjo de cDNA.





ANOVA, seguido pela correção de Bonferroni. Os valores representam a média  $\pm$  o desvio padrão. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

De acordo com os resultados mostrados nas figuras 4.27 e 4.28 pode-se notar que os níveis de replicação dos DENV-1 recombinantes aumentam a expressão dos genes TLR3/7 em mdDCs. Dessa forma, para determinar a potencial contribuição da dose viral de infecção para o aumento da expressão de receptores do tipo Toll e produção de IFN-I ( $\alpha/\beta$ ), as mdDCs foram infectadas com doses mais altas do vBACDV1 (50 MOI) e os níveis de infectividade e replicação (Figura 4.29), bem como, a indução de IFN-  $\alpha/\beta$  (Figura 4.30) foram avaliadas e comparadas com a infecção dos DENV-1 recombinantes a uma MOI de 5.

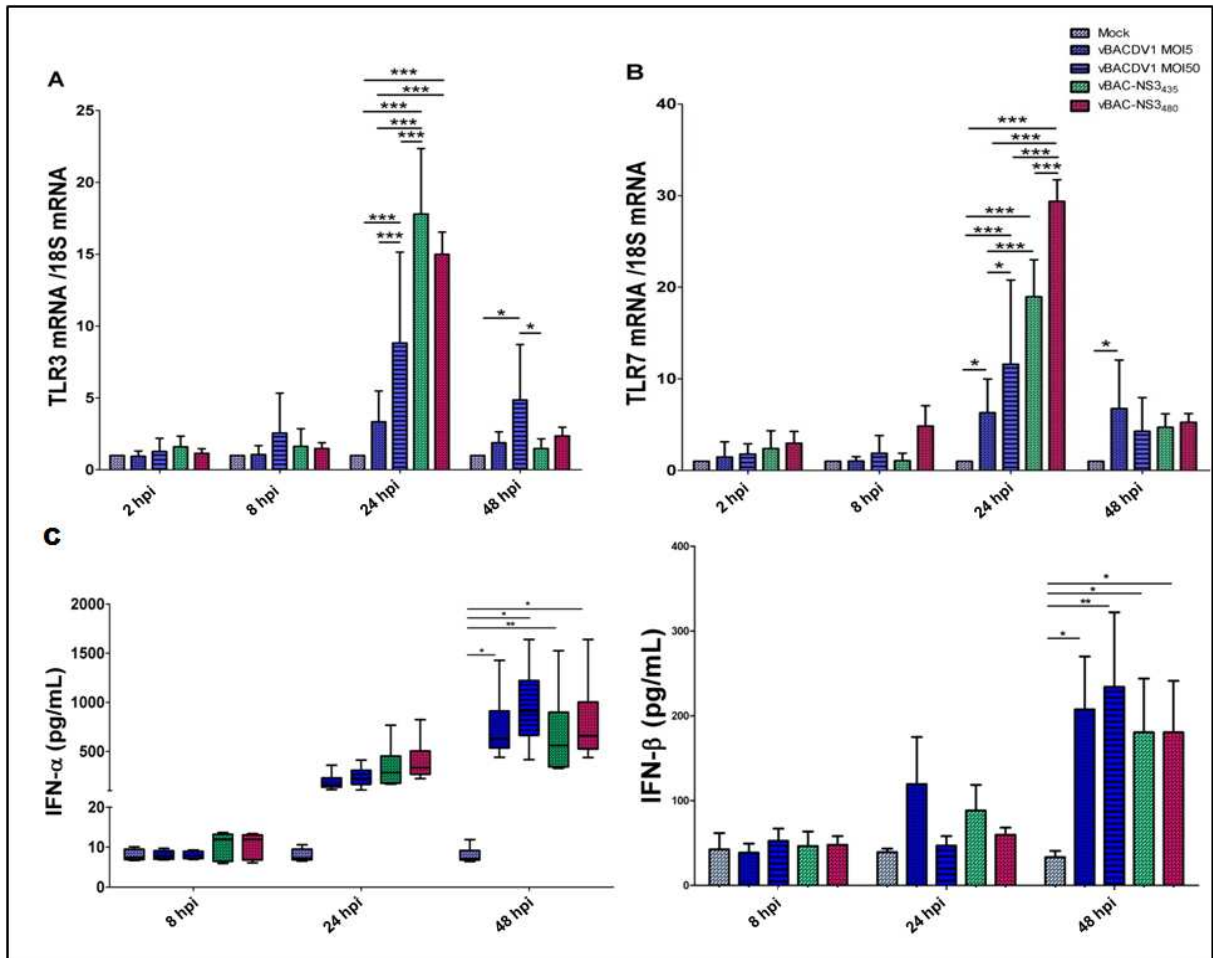


**Figura 4.29 – Análise da infectividade dos DENV-1 recombinantes em mdDCs a diferentes MOIs.** As mdDCs foram infectadas com os DENV-1 recombinantes vBACDV1, vBAC-NS3<sub>435</sub> e vBAC-NS3<sub>480</sub> a uma MOI de 5. Uma MOI de 50 foi utilizada do DENV-1 parental (vBACDV1) e avaliadas para a expressão de CD11c na superfície celular e proteína viral por citometria de fluxo em 8, 24 e 48hpi (**A**), quantificação por RT/qPCR dos níveis de RNA viral em mdDCs 2, 8, 24 e 48 hpi (**B**) e quantificação da progênie viral no sobrenadante de mdDCs infectadas 8, 24 e 48 hpi, por imunodeteção de foco em células C6/36 (**C**). Os dados de quatro experimentos independentes foram analisados pelo teste *Two-Way*

ANOVA seguido pela correção de Bonferroni. Os valores estão expressos pela média  $\pm$  o desvio padrão. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

A análise por citometria de fluxo da cinética de infecção com diferentes doses do vBACDV1 demonstrou que a uma MOI de 50 o vBACDV1 infecta um número maior de mdDCs, evidenciado 48 hpi, em relação a infecção com o mesmo vírus ou com os vírus mutantes a uma dose viral 10 vezes mais baixa (MOI de 5). No entanto, os dados de quantificação do RNA e progênie viral demonstram que a habilidade do vírus vBACDV1 replicar e formar partículas infecciosas em células mdDCs humanas, mesmo a altos títulos, é menor ou igual que a infecção com 5 MOI dos vBACNS3<sub>435</sub> ou vBACNS3<sub>480</sub>. Esse dado reforça o papel das substituições Leu/Ser no domínio helicase da proteína NS3 na modulação da replicação viral e produção de partículas virais infecciosas. É importante ressaltar a maior habilidade replicativa do vírus que contém a mutação NS3<sub>480</sub>, desde os tempos iniciais da cinética de infecção.

Conforme mostrado na figura 4.30, a replicação dos DENV-1 recombinantes estimula a expressão de TLR3/7 em mdDCs 24 hpi, com maior significância nas células infectadas com os vírus mutantes. No entanto, o aumento da modulação gênica dos TLR3/7 não foi capaz de induzir a expressão diferencial de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  durante a cinética de infecção com os DENV-1 recombinantes. Baixos níveis de expressão dessas proteínas foram detectados no sobrenadante das culturas de mdDCs infectadas com os todos os DENV-1 recombinantes 8 e 24 hpi; um sutil aumento na expressão dos IFN- $\alpha/\beta$  foi evidenciado 48 hpi. Uma vez que a replicação dos DENV-1 recombinantes estimula a produção de TLRs em mdDCs, a baixa expressão de IFN- $\alpha/\beta$  nestas células sugere o envolvimento de um mecanismo viral para modular a via de sinalização de IFN-I em mdDCs e beneficiar a infecção viral.



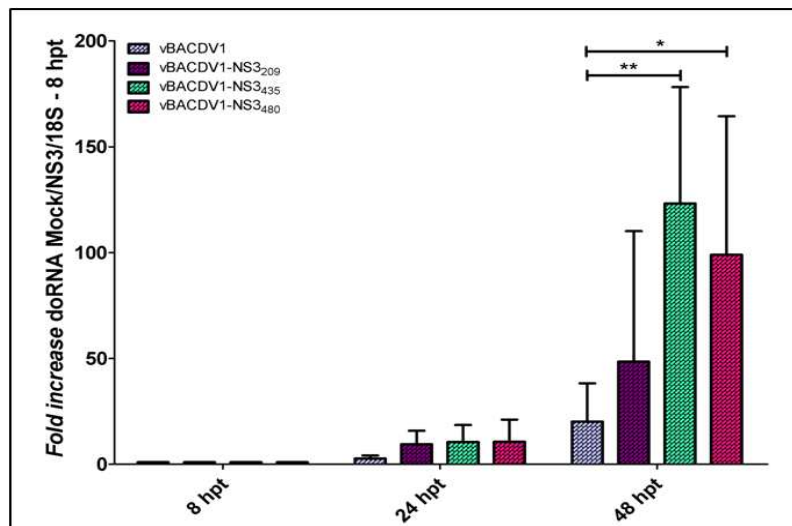
**Figura 4.30 – Análise da expressão de genes de resposta imune e produção de IFN tipo I em mdDCs infectadas com diferentes MOIs dos DENV-1 recombinantes.** Representação gráfica dos dados obtidos pela amplificação por RT/qPCR dos genes TLR3 (A), TLR7 (B) e quantificação de IFN- $\alpha$  por CBA (C) e IFN- $\beta$  por ELISA pan-específico (D) de seis culturas de mdDCs humanas infectadas com 5 MOI dos vírus vBACDV1, vBAC-NS3<sub>435</sub>, vBAC-NS3<sub>435</sub> e 50 MOI do vBACDV1 nos tempos indicados. Os dados foram analisados pelo teste *Two-Way* ANOVA, seguido pela correção de Bonferroni. Os valores representam a média  $\pm$  o desvio padrão de seis experimentos independentes. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

É importante ressaltar que a sequência nucleotídica completa dos DENV-1 recombinantes após a infecção em mdDCs foi determinada por sequenciamento nucleotídico e nenhuma mutação espúria foi identificada. Dessa forma, podemos assegurar que as propriedades virais observadas neste estudo decorrem apenas das mutações em estudo.

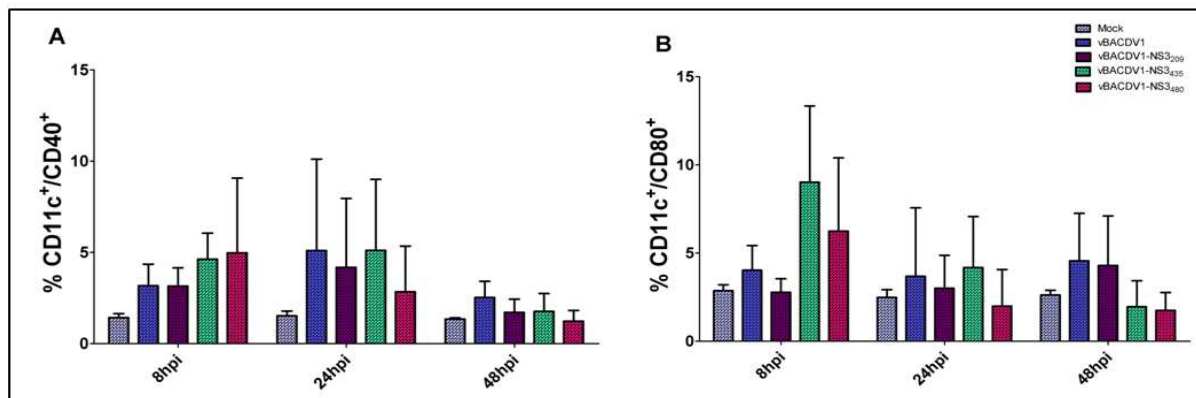
#### 4.4.1 Caracterização da replicação dos RNAs subgenômicos dos DENV-1 recombinantes em culturas primárias de células humanas

Visando confirmar a influência das mutações NS3<sub>209</sub>, NS3<sub>435</sub> e NS3<sub>480</sub> na modulação da replicação viral, nós utilizamos a tecnologia de replicons

subgenômicos do DENV-1 para comparar a eficiência de replicação dos RNAs subgenômicos mutantes (RepBAC-NS3<sub>209</sub>, RepBAC-NS3<sub>435</sub> e RepBAC-NS3<sub>480</sub>) em mdDCs em relação ao RNA subgenômico do vírus parental (RepBACDV1). O papel da mutação NS3<sub>209</sub> na modulação da habilidade replicativa do DENV-1 em mdDCs não foi avaliada no presente estudo. No entanto, os ensaios *in vivo* e *in vitro* demonstraram que essa mutação isoladamente parece não desempenhar um papel importante na habilidade infectiva do DENV-1 recombinante. Desta forma, para determinarmos o papel da mutação NS3<sub>209</sub> na replicação do DENV-1 em modelo *ex vivo*, esta mutação foi incluída nos estudos de caracterização da replicação do RNA viral em mdDCs, utilizando o sistema de replicons subgenômicos. A replicação dos RNAs virais subgenômicos (Figura 4.31) e a expressão de marcadores moleculares de ativação (CD40 e CD80) (Figura 4.32) foram avaliadas nos tempos de 8, 24 e 48 h após eletroporação (hpt) em mdDCs ( $1,0 \times 10^5$  células). A quantidade de RNA a ser eletroporada na célula hospedeira foi determinada previamente em uma cinética de transfecção. A baixa concentração de *input* de RNA (350 ng) foi utilizada a fim de evitar o acúmulo de RNA exógeno na célula hospedeira, o que poderia ativar as mdDCs e mascarar o efeito da replicação do RNA viral subgenômico.



**Figura 4.31 - Análise da cinética de transfecção dos DENV-1 recombinantes em mdDCs.** O RNA viral foi quantificado em mdDCs 8, 24 e 48 hpt por RT/qPCR. Os dados de três experimentos independentes foram normalizados pelos níveis de expressão do gene 18S humano e analisados pelo teste *Two-Way* ANOVA seguido pela correção de Bonferroni. Os valores estão expressos pela média  $\pm$  o desvio padrão. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



**Figura 4.32 - Perfil da expressão de marcadores moleculares de ativação em mdDCs transfectadas com os RNAs subgenômicos do DENV-1 RepBACDV1, RepBAC-NS3<sub>209</sub>, RepBAC-NS3<sub>435</sub> e RepBAC-NS3<sub>480</sub>.** As células foram analisadas utilizando-se o FACS Canto II (BD). **A.** Porcentagem de células positivas para dupla marcação CD11c<sup>+</sup>/CD40<sup>+</sup>. **B.** Porcentagem de células positivas para dupla marcação CD11c<sup>+</sup>/CD80<sup>+</sup>. Os dados de três experimentos independentes foram analisados pelo teste *Two-Way* ANOVA, seguido pela correção de Bonferroni. Os valores estão expressos pela média  $\pm$  o desvio padrão de quatro experimentos independentes.

Os dados demonstram que os replicons do DENV-1 contendo as mutações NS3<sub>435</sub> e NS3<sub>480</sub> apresentam maior habilidade replicativa em mdDCs humanas quando comparado com o RNA viral subgenômico parental ou com o que contém a mutação na NS3<sub>209</sub>, corroborando os dados de replicação do RNA viral em modelo murino e em mdDCs. No entanto, não se observou diferença significativa na ativação das células transfectadas com os distintos RNAs subgenômicos e mock.

Os baixos níveis de detecção de RNA durante a cinética de transfecção podem refletir a baixa eficiência de replicação dos RNAs subgenômicos do DENV-1 em decorrência da ausência das proteínas estruturais, conforme demonstrado por Leardkamolkarn et al., (2012), ou baixa taxa de replicação devido ao baixo número de cópias de RNA utilizados para transfectar as mdDCs.

Para assegurar que o fenótipo observado era decorrente apenas das mutações em estudo, o material genético dos RepBACDV1, RepBAC-NS3<sub>209</sub>, RepBAC-NS3<sub>435</sub> e RepBAC-NS3<sub>480</sub>, obtido a partir do sedimento celular de mdDCs 48 hpt, foi completamente sequenciado. Nenhuma substituição de aminoácido, além das mutações de interesse, foi observada.

#### 4.5 Estudos de caracterização funcional da proteína NS3 do DENV-1

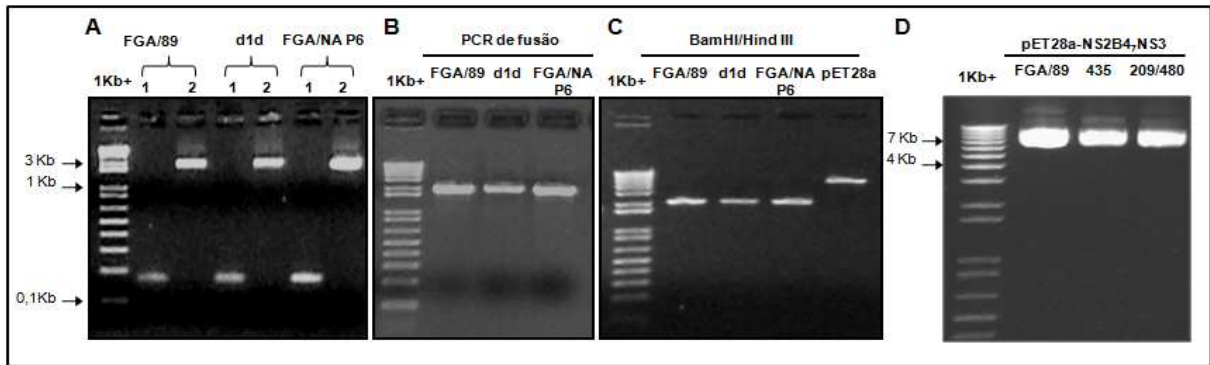
Conforme demonstrado, as mutações presentes na proteína NS3 do DENV-1 aumentam significativamente a habilidade dos vírus replicarem *in vivo*, *in vitro* e *ex*

*vivo*. Para se verificar uma possível correlação entre o aumento da habilidade replicativa dos DENV-1 recombinantes e modulação das atividades catalíticas da proteína NS3, nós realizamos a expressão funcional do domínio helicase ou da porção total da proteína NS3 fusionada ao domínio co-fator da proteína NS2B do DENV-1 e investigamos *in vitro* o papel de cada uma das mutações na modulação das propriedades enzimáticas da proteína recombinante.

#### 4.5.1 Obtenção de proteínas recombinantes NS2B<sub>47</sub>NS3 do DENV-1

##### 4.5.1.1 Clonagem e expressão da proteína NS3 do vírus DEN-1 em sistema procarioto (*E. coli*)

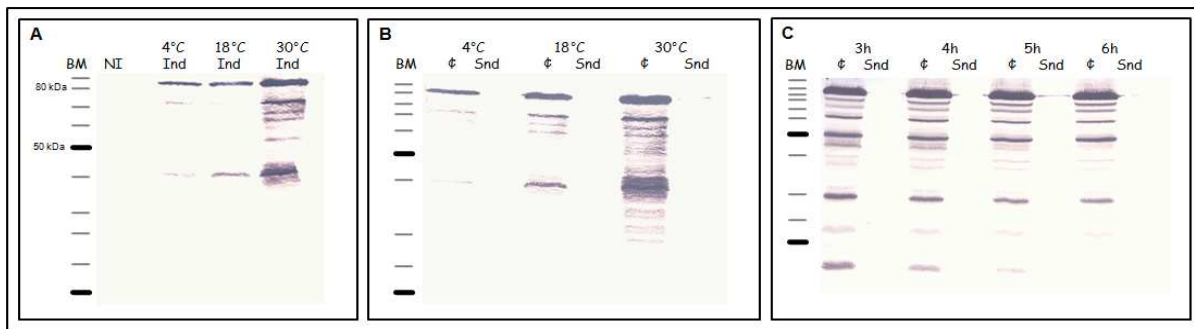
Para a expressão funcional da proteína NS3 dos vírus DEN-1 cepa FGA/89 (parental), FGA/NA d1d (mutação NS3<sub>435</sub>) e FGA/NA P6 (mutações NS3<sub>209</sub> e NS3<sub>480</sub>) utilizamos uma estratégia similar a descrita por LEUNG et al. (2001), na qual o co-fator, formado por aproximadamente 47 aminoácidos do domínio hidrofóbico central da proteína NS2B, é ligado ao domínio protease da proteína NS3 via um “*linker*” constituído de quatro glicinas, uma serina e outras quatro glicinas. Para tanto, o RNA dos DENV-1 foi convertido em uma cópia complementar de DNA (cDNA) e utilizado para a amplificação dos fragmentos de DNA correspondentes a proteína NS3 e ao domínio do co-fator da NS2B (Figura 4.34). Os fragmentos resultantes foram utilizados para amplificar por PCR um fragmento correspondente a construção NS2B<sub>47</sub> Gly4-Ser-Gly4 NS3 (Figura 4.33). Os fragmentos NS2B<sub>47</sub> G4-S-G4 NS3 foram clonados em vetor pET-28a. Os clones recombinantes (Figura 4.34) foram sequenciados, pela empresa Coreana MacroGen, para a confirmação da correta inserção do fragmento de interesse no vetor e verificação do possível aparecimento de mutações indesejáveis.



**Figura 4.33** - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da amplificação dos genes correspondentes ao domínio do co-fator NS2B e da proteína NS3 dos DENV-1 (FGA/89, FGA/NA d1d (435Mut) e FGA/NA P6 (209/480Mut)). M. Marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen); **A. 1.** Fragmento de DNA correspondente ao co-fator NS2B. **2.** Fragmento de DNA correspondente a proteína NS3. **B.** Fragmento de DNA fusionado, correspondente ao gene NS2B<sub>47</sub>G4-S-G4 NS3 da proteína quimérica dos DENV-1. **C.** Produto purificado das digestão dos fragmentos de PCR e vetor pET-28a com enzimas de restrição BamHI e Hind III. **D.** DNA plasmidial contendo o gene NS2B<sub>47</sub>NS3 dos DENV-1 (NS2B<sub>47</sub>NS3 FGA/89, NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>435</sub> e NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>209/480</sub>).

Após a confirmação da sequência correta dos clones, uma cinética de expressão da proteína quimérica NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>209/480Mut</sub> em bactérias *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3) foi realizada para avaliar a expressão da proteína na forma solúvel. Após a indução da expressão da proteína sob diferentes condições de tempo e temperatura, a cultura bacteriana foi sedimentada, lisada e as frações do sobrenadante e sedimento celular foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 13%, para avaliação da solubilidade da proteína recombinante. A identidade da amostra foi determinada pela técnica de *western blotting*, utilizando anticorpos anti-histidina ou anticorpos monoclonais anti-NS3 helicase (1402-7B) (Figura. 4.35). A proteína quimérica NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>209/480Mut</sub> apresentou massa molecular esperada de aproximadamente 79 kDa e a solubilidade da proteína recombinante confirmada, apresentando melhor resultado sob as condições de indução de 0,4 mM IPTG à 30°C por 5 horas. As mesmas condições foram utilizadas para a expressão das proteínas recombinantes NS2B<sub>47</sub>NS3 parental (FGA/89) e mutantes.





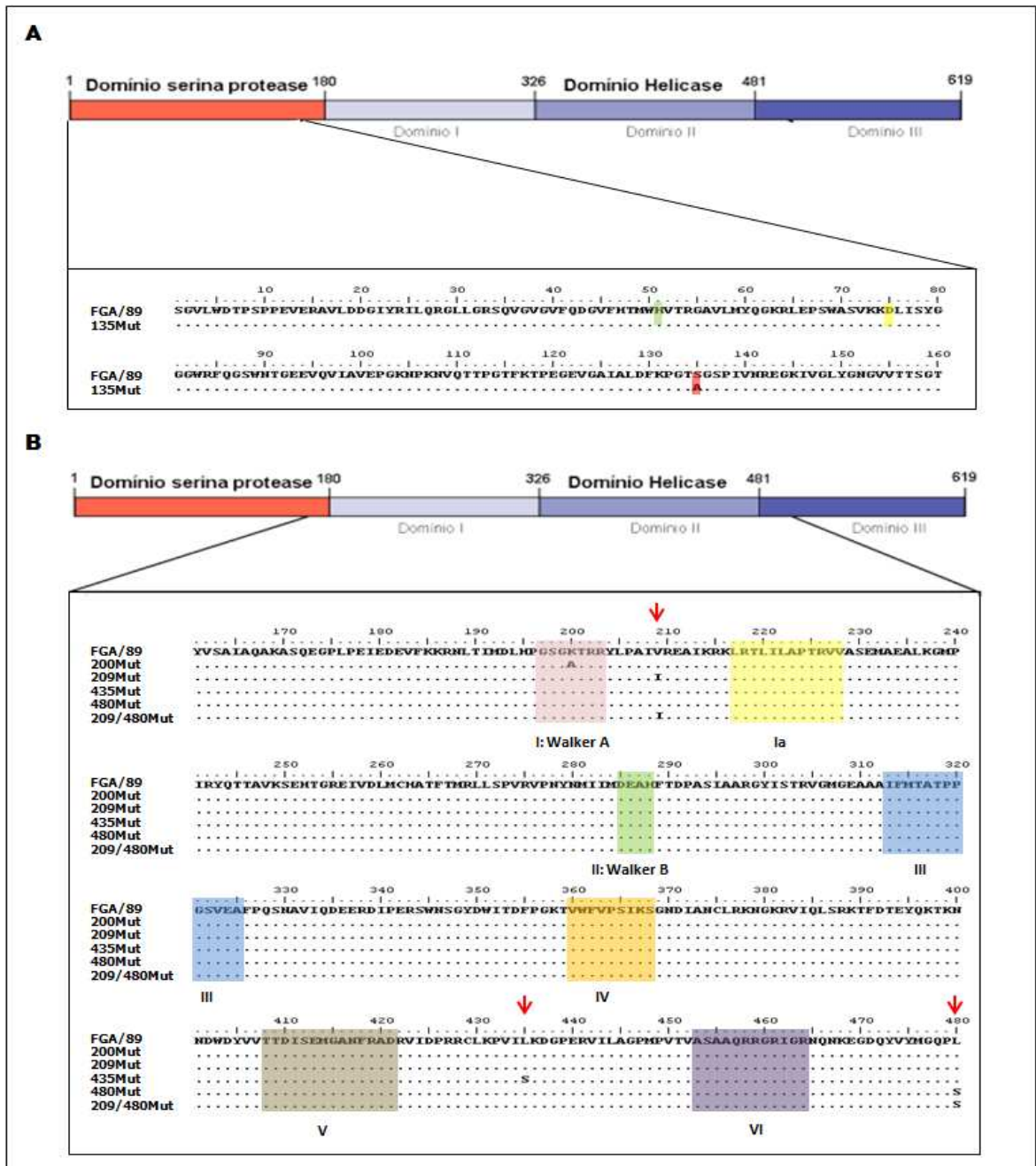
**Figura 4.34 - Análise da expressão da proteína NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>209/480</sub> recombinante em *E. coli* cepa Rosetta-gami 2 (DE3). A.** Cinética de indução da expressão da proteína com 0,4mM de IPTG. **B.** Cinética da expressão da proteína na forma solúvel, utilizando 0,4mM de IPTG. **C.** Cinética da expressão da proteína a 30°C após a indução com 0,4mM de IPTG nos tempos determinados (3h, 4h, 5h e 6h). **NI** extrato não induzido. **Ind.** Extrato induzido. **Snd.** Sobrenadante da cultura sonicada. **c.** Extrato celular sonicado. As membranas de nitrocelulose foram reagidas com anticorpo monoclonal anti-histidina e anticorpo policlonal anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina (PA).

#### 4.5.1.2 Obtenção de mutantes da proteína quimérica NS2B<sub>47</sub>NS3

A fim de avaliar o papel das mutações individuais Val<sub>209</sub>Ile e Leu<sub>480</sub>Ser, identificadas na proteína NS3 do vírus FGA/NA P6, nas atividades enzimáticas das proteínas NS2B<sub>47</sub>NS3, utilizamos o clone NS2B<sub>47</sub>NS3 FGA/89 Cl. 21 como molde para a reação de PCR mutagênica (Stratagene), utilizando oligonucleotídeos mutagênicos específicos, contendo as substituições nucleotídicas que alteravam os resíduos Val<sub>209</sub> e Leu<sub>480</sub> da NS3. Da mesma forma, a fim de excluir possíveis contaminações com proteínas bacterianas que pudessem, eventualmente, interferir nos ensaios de atividade protease, ATPase e helicase das proteínas recombinantes, o motivo Walker A e a tríade catalítica da protease viral foram modificados por mutagênese sítio dirigida utilizando oligonucleotídeos mutagênicos específicos, contendo a sequência nucleotídicas que alteravam os resíduos Ser<sub>135</sub>/Ala e Lys<sub>200</sub>/Ala, e o clone NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>209/480</sub> Cl. 23 como molde. A localização das mutações em estudo está indicada na figura 4.35. Os plasmídeos contendo os genes com as mutações de interesse (Figura 4.36) foram transformados em *E. coli* cepa Rosetta-gami 2 (DE3) (Novagen) e utilizados para a expressão, conforme descrito no item acima. As proteínas recombinantes foram purificadas em coluna de afinidade His Trap (GE) acoplada ao sistema de FPLC Äkta (GE).

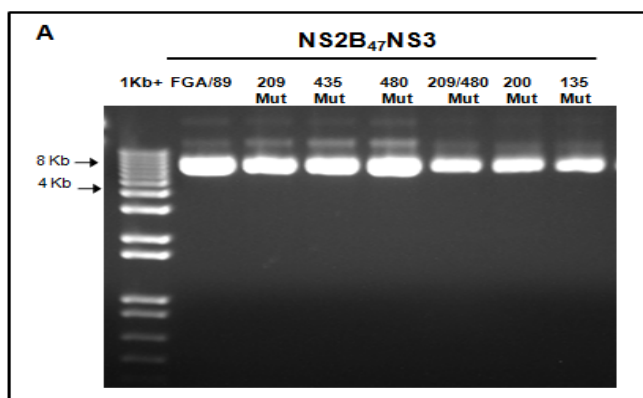
Alíquotas das frações purificadas das proteínas recombinantes foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 13% e caracterizadas pela técnica de *western blotting*, utilizando anticorpos anti-histidina ou mAb contra a proteína NS3

helicase do DENV-1 (1722-1B) (Figura 4.37). As proteínas recombinantes NS2B<sub>47</sub>NS3 apresentaram massa molecular esperada, de aproximadamente 79 kDa. A concentração das proteínas foi determinada em fluorímetro Qubit (Invitrogen), utilizando o coeficiente de extinção molar ( $E = 109 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

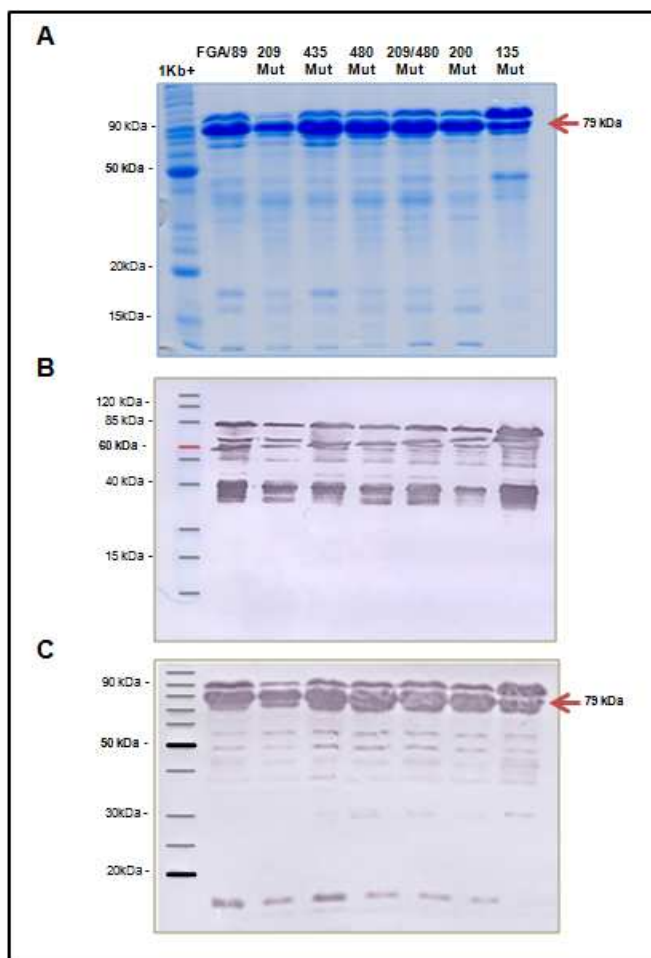


**Figura 4.35 - Localização das mutações em estudo no domínio helicase da proteína NS3. A.** Representação esquemática do alinhamento da sequência de aminoácidos dos clones recombinantes das proteínas quimérica NS2B<sub>47</sub>NS3 FGA/89 e 135 Mut. Os resíduos de aminoácidos que compõem a tríade catalítica do domínio protease da NS3 do DENV-1 estão indicados nas cores verde, amarelo e vermelho. **B.** Representação esquemática do alinhamento da sequência de aminoácidos dos clones recombinantes (resíduos 166 a 480) contendo mutações no domínio helicase da proteína. Os domínios conservados na superfamília 2 das helicases estão indicados pelas cores rosa (motivo I ou Walker A), amarelo (motivo Ia), verde (motivo II ou Walker B), azul (motivo III), cinza (motivo IV), marrom (motivo V) e roxo (motivo VI).

B), azul (motivo III), laranja (motivo IV), marron (motivo V) e roxo (motivo VI). As setas vermelhas indicam a posição das mutações em estudo.



**Figura 4.36 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% das minipreparações plasmidiais de cada clone pET28a-NS2B<sub>47</sub>NS3 confirmado por sequenciamento. 1Kb+ – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). FGA/89, indica o clone contendo a sequência do gene que codifica para a proteína parental do DENV-1 cepa FGA/89. Os demais clones estão identificadas com o número que corresponde a posição da mutação em estudo.**



**Figura 4.37 – Análise do painel de proteínas NS2B<sub>47</sub>NS3 recombinantes do DENV-1 purificadas.**

**A.** Perfil das proteínas em SDS-PAGE corado com gel code *blue stain*. **B.** *Western blotting* em membrana de nitrocelulose reagida com anticorpo monoclonal anti-histidina C-terminal e anticorpo policlonal anti-camundongo conjugado com PA. **C.** *Western blotting* em membrana de nitrocelulose reagida com anticorpo monoclonal anti-NS3<sub>hel</sub> do DENV (1722-1B), seguida pela reação com anticorpo policlonal anti-camundongo conjugado com PA. FGA/89 indica a proteína parental. As demais proteínas mutantes estão identificadas com o número que corresponde a posição da mutação na proteína NS3. A seta vermelha indica o tamanho predito da proteína quimérica.

#### 4.5.2 Ensaio de atividade protease: análise funcional da serina protease NS2B<sub>47</sub>NS3 recombinantes do DENV-1

Tem sido demonstrado que mudanças conformacionais no domínio protease da NS3 afetam a atividade proteolítica da enzima, evidenciando alguns determinantes funcionais para a especificidade de ligação e catálise do substrato (SALAEMAE et al., 2010). A fim de avaliar se as mutações em estudo (NS3<sub>209</sub>, NS3<sub>435</sub> e NS3<sub>480</sub>) no domínio helicase da proteína poderiam também exercer algum efeito sobre a capacidade proteolítica da enzima, nós determinamos, em colaboração com o grupo do Dr. Luiz Juliano Neto da Escola Paulista de Medicina, os parâmetros cinéticos  $K_m$ ,  $k_{cat}$  e  $k_{cat}/K_m$  da hidrólise do substrato sintético Abz-AKRRS↓Q-EDDnp. Em um estudo anterior, este substrato apresentou alta eficiência de clivagem pela proteína NS2BNS3<sub>pro</sub> do DENV-2 (GOUVÊA et al., 2007).

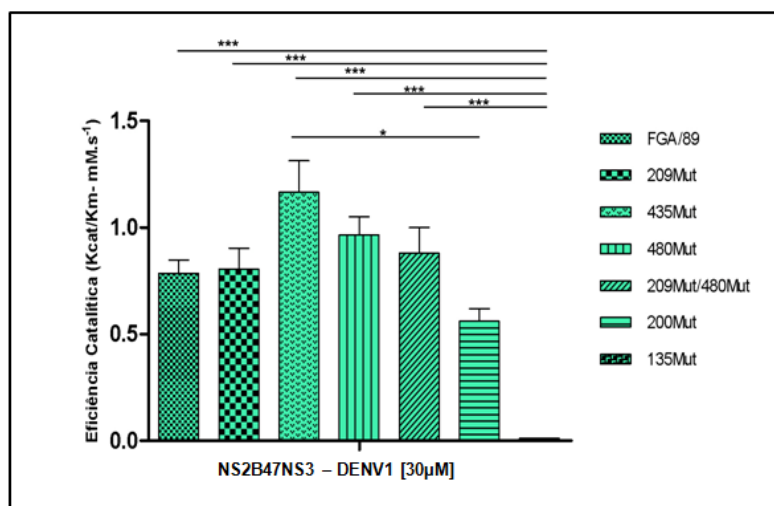
As proteínas recombinantes quiméricas NS2B<sub>47</sub>NS3 do DENV-1 apresentaram atividade hidrolítica similar quando avaliadas em presença de substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência (FRET), que corresponde ao sítio de clivagem endógeno da poliproteína viral (Tabela 4.2 e Figura 4.38). Para confirmar a especificidade de reconhecimento do peptídeo pelas proteínas recombinantes, nós avaliamos os parâmetros de hidrólise do peptídeo referência pela proteína NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>135Mut</sub>, que contém uma mutação na tríade catalítica que a torna inativa. Além disso, as proteínas NS2B<sub>47</sub>NS3 recombinantes foram incapazes de hidrolisar o peptídeo Abz-HRRDKR↓SVAL-Q-EDDnp, peptídeo correspondente ao sítio de clivagem interno da proteína prM do DENV-1, reconhecido pela protease do tipo furina da célula hospedeira (IZIDORO et al., 2010). Fato que demonstra especificidade das proteínas para o reconhecimento e

clivagem de peptídeos sintéticos *in vitro*.

**Tabela 4.2** - Parâmetros cinéticos de hidrólise pela NS2B<sub>47</sub>NS3 recombinante do hexapeptídeo FRET sintético, baseado no sítio de clivagem natural do complexo da protease do DENV

	Sequência Abz-peptidil-Q-EDDnp	V <sub>máx</sub>	K <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>m</sub> (μM)	K <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (mM.s <sup>-1</sup> )
NS2B <sub>47</sub> NS3 FGA/89	AKRR↓SQ	204,22	0,013458076	18,59	0,723954289
NS2B <sub>47</sub> NS3 209Mut	AKRR↓SQ	163,115	0,014417255	20,39	0,708527244
NS2B <sub>47</sub> NS3 435Mut	AKRR↓SQ	236,17	0,022703569	21,91	1,028559637
NS2B <sub>47</sub> NS3 480Mut	AKRR↓SQ	191,375	0,017495493	19,865	0,880888438
NS2B <sub>47</sub> NS3 209/480Mut	AKRR↓SQ	162,91	0,01467738	19,355	0,758884221
NS2B <sub>47</sub> NS3 200Mut	AKRR↓SQ	60,935	0,005310363	9,565	0,560541564
NS2B <sub>47</sub> NS3 135Mut	AKRR↓SQ	0,31	2,18936E-05	0	0

A seta indica o sítio de clivagem, previamente determinado por espectrometria de massas MALDI TOF. Condições de hidrólise: As proteases eram incubadas em tampão 20mM Tris (pH 9,0, 10mM NaCl e 20% glicerol) por 5 min. a 37°C e as reações eram iniciadas pela adição do substrato. Os dados da cinética de hidrólise resultam de três experimentos distintos, com taxa de erro menor que 5%.



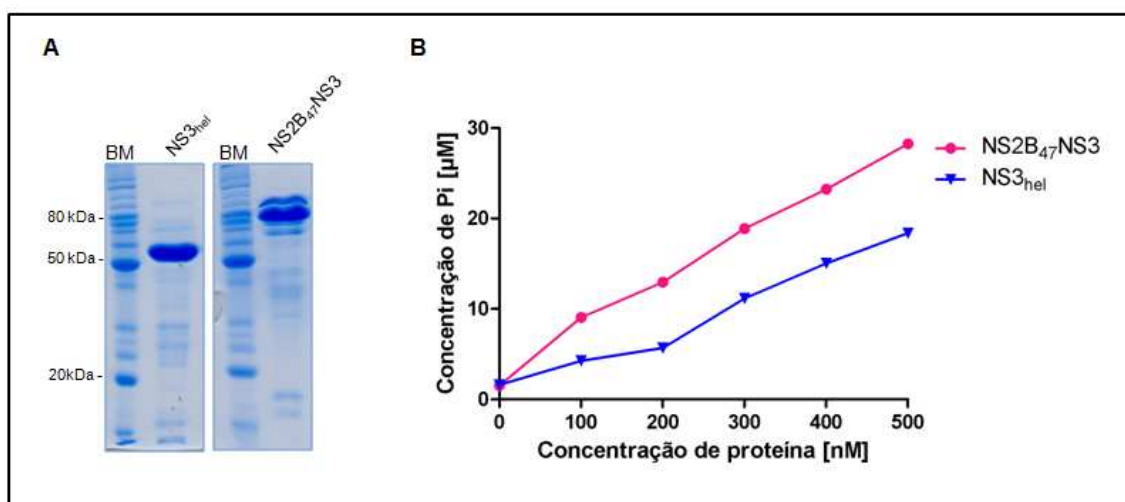
**Figura 4.38** – Análise da eficiência proteolítica das NS2B<sub>47</sub>NS3 do DENV-1. Os dados de Kcat/Km-mM.s<sup>-1</sup> representados na tabela 1 foram plotados em forma gráfica para melhor visualização do resultados. Os dados de três experimentos independentes foram analisados pelo teste One-Way ANOVA, seguido pela correção de Bonferroni. \*  $p < 0.05$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

Adicionalmente, nós avaliamos a capacidade das proteínas processarem sete pequenos FRET substratos sintéticos correspondentes aos sítios nativos de clivagem da poliproteína do DENV-2 (GOUVÊA et al., 2007). No entanto, ao utilizarmos estes substratos não foi possível obter as constantes catalíticas, pois os valores de fluorescência mensurados no espectrofluorímetro foram muito baixos, inviabilizando a quantificação dos parâmetros cinéticos de hidrólise. Desta forma, novos substratos com os sítios de clivagem específicos de DENV-1 (cepas FGA/89 e BR/90) foram sintetizados e serão utilizados em ensaios posteriores na presença e

ausência de potenciais inibidores de protease.

#### 4.5.3 Ensaio de atividade ATPase

O domínio helicase recombinante da proteína NS3 dos flavivírus apresenta-se funcionalmente ativo *in vitro* (WANG et al., 2008). Alguns resultados controversos quanto ao papel da porção N-terminal da proteína NS3 (domínio protease) na modulação das atividades helicase e NTPase, têm sido evidenciados na literatura (GEBHARD et al, 2012; LUO et al., 2008). Para investigar a influência do domínio protease na atividade catalítica de ATPase da NS3 e garantir a confiabilidade dos resultados no estudo das mutações de interesse, nós comparamos a habilidade das duas variantes da proteína NS3 recombinante do DENV-1 FGA/89, NS3<sub>hel</sub> e NS2B<sub>47</sub>NS3, hidrolisar ATP *in vitro*. A atividade ATPase das proteínas recombinantes foi avaliada através do método colorimétrico de detecção de fosfato inorgânico (Pi) liberado a partir da hidrólise de ATP, utilizando o kit de atividade ATPase (Innova Biosciences), de acordo com as recomendações do fabricante, e com diferentes concentrações de proteína. A detecção de Pi foi mensurada em espectrofotômetro a 650 nm (Figura 4.39).

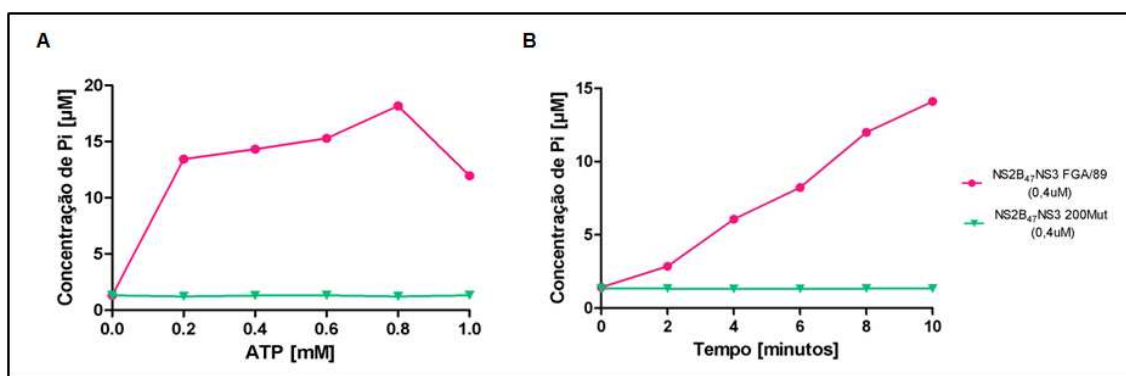


**Figura 4.39 – Atividade ATPase das proteínas recombinantes NS3<sub>hel</sub> e NS2B<sub>47</sub>NS3 do DENV-1.** **A.** Gel SDS-PAGE demonstrando a expressão e purificação das duas variantes da proteína NS3 do DENV-1 FGA/89. **B.** Atividade ATPase do domínio helicase (triângulo) e da proteína NS3 inteira (círculo). A hidrólise de ATP, determinada pela presença de fosfato inorgânico (Pi), foi mensurada a 28°C em presença das concentrações de proteínas indicadas. Os dados representam a média de três determinações independentes.



Como demonstrado na figura 4.39 pode-se verificar que o domínio protease da NS3 confere maior atividade hidrolítica do substrato quando comparado com o domínio helicase isolado. Desta forma, o efeito das mutações nas posições NS3<sub>209</sub>, NS3<sub>435</sub> e NS3<sub>480</sub> na modulação da atividade catalítica de ATPase foi avaliado utilizando-se a proteína recombinante quimérica NS2<sub>47</sub>NS3 .

Primeiramente, a velocidade inicial de hidrólise de ATP pela proteína recombinante NS2B<sub>47</sub>NS3 do DENV-1 parental (FGA/89) foi mensurada em presença de 0,4 µM de proteína, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e diferentes concentrações de ATP (0 – 1mM) (Figura 4.40 A). A variante NS2B<sub>47</sub>NS3 200Mut que apresenta uma mutação no domínio Walker A, que impede a hidrólise de ATP, foi utilizada como controle da reação. Além disso, avaliamos a capacidade da proteína NS2B<sub>47</sub>NS3 do DENV-1 hidrolisar ATP no curso do tempo (Figura 4.40 B).

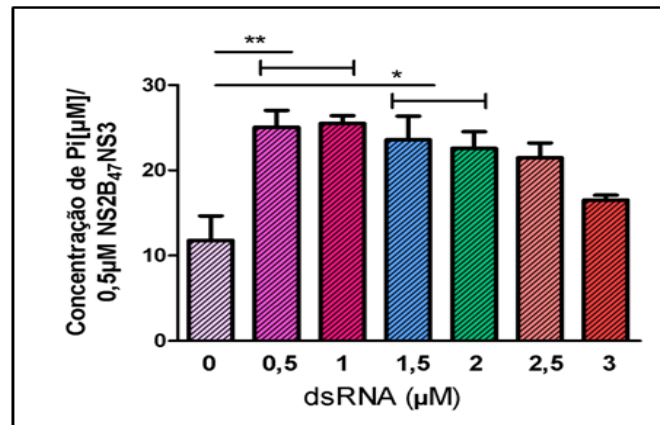


**Figura 4.40 – Quantificação da hidrólise de ATP pela proteína NS2B<sub>47</sub>NS3.** A atividade ATPase das proteínas NS2B<sub>47</sub>NS3 FGA/89 e 200Mut (0,4 µM) foi mensurada utilizando-se o kit para detecção de fosfato inorgânico (Pi) por verde malaquita (Innova Biosciences®). **A.** Atividade ATPase das proteínas NS2B<sub>47</sub>NS3. A velocidade inicial de hidrólise de ATP foi determinada a 28°C (10 min.) em presença das concentrações de ATP indicadas. **B.** Quantificação da hidrólise de ATP ao longo do tempo. O Pi liberado nos tempos indicados foi mensurado após a incubação da proteína a 28°C em tampão Tris HCl pH 7,5, contendo 0,5 mM de ATP e 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>. Os dados representam a média de três determinações independentes.

De acordo com os resultados, determinamos as melhores condições para a hidrólise de ATP pela proteína recombinante NS2B<sub>47</sub>NS3 que deve ocorrer em tampão Tris pH 7,5 contendo 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,5 mM de ATP e incubação a 28°C por 10 min.

Estudos estruturais demonstraram que a proteína NS3 dos flavivírus sofre mudanças conformacionais quando associada ao RNA. Têm sido demonstrado em ensaios *in vitro* que esta interação estimula a atividade catalítica de ATPase da proteína, sugerindo uma interação alostérica entre a proteína NS3 e o RNA (LUO et

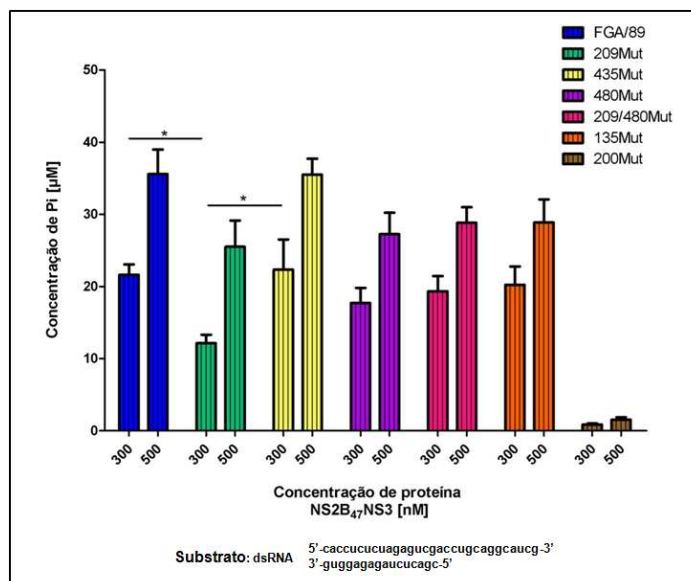
al., 2008; GEBHARD et al., 2012). Os nossos resultados demonstram que concentrações equimolares de dsRNA ou próximas a ela (0,5  $\mu\text{M}$  a 1,5  $\mu\text{M}$ ) são capazes de estimular igualmente a atividade catalítica da proteína NS2B<sub>47</sub>NS3. No entanto, a saturação de RNA reduz a capacidade hidrolítica da proteína (Figura 4.41).



**Figura 4.41 – Atividade hidrolítica de ATP pela proteína recombinante NS2B<sub>47</sub>NS3 do DENV-1 FGA/89 estimulada por dsRNA.** A atividade catalítica de ATPase da proteína (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi determinada a 28°C em presença de 0,5 mM ATP-MgCl<sub>2</sub> e diferentes concentrações de dsRNA (0 a 3  $\mu\text{M}$ ). O gráfico representa os dados de quatro experimentos independentes. A análise estatística foi determinada pelo teste One-Way ANOVA, seguido pela correção de Bonferroni. \*  $p < 0.05$  e \*\*  $p < 0.01$ .

A proteínas recombinantes NS2B<sub>47</sub>NS3 do vírus parental (FGA/89) e as variantes mutantes (209Mut, 435Mut, 480Mut, 209/480Mut, 200Mut e 135Mut) foram utilizadas para determinar comparativamente a atividade catalítica de ATPase estimulada por dsRNA *overhang* (Figura 4.42).





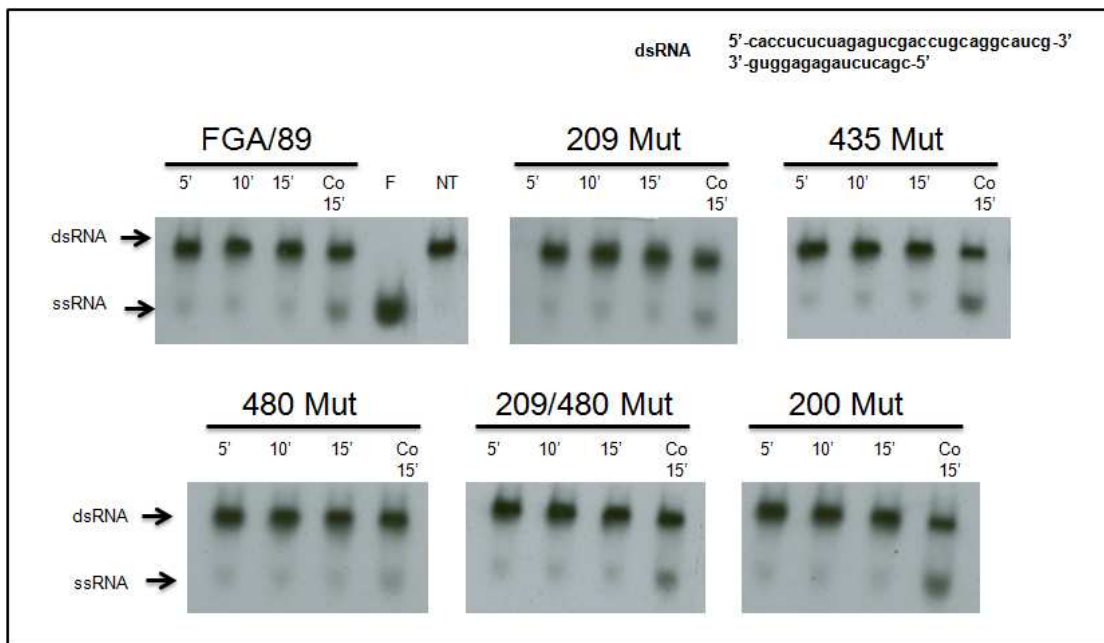
**Figura 4.42 - Análise comparativa da atividade ATPase das variantes das proteínas recombinantes NS2B<sub>47</sub>NS3 do DENV-1.** A atividade catalítica das proteínas foi determinada a 28°C em presença de 0,5 mM ATP-MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de dsRNA e diferentes concentrações de proteína (300 mM e 500 mM). O gráfico representa os dados de quatro experimentos independentes. A análise estatística foi determinada pelo teste One-Way ANOVA, seguido pela correção de Bonferroni. As barras \*  $p < 0.05$  estão indicando apenas as diferenças observadas entre proteínas de mesma concentração. Todas as condições testadas diferem (\*\*\*)  $p < 0.001$ ) da proteína defectiva NS2B<sub>47</sub>NS3 200Mut.

Os resultados indicam que as variantes da proteína NS2B<sub>47</sub>NS3 (435Mut, 480Mut e 209/480Mut) do DENV-1 não diferem da proteína parental quanto a sua habilidade em hidrolisar ATP *in vitro*, evidenciado pelos valores similares de Pi, após incubação com o substrato. Apenas a proteína NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>209Mut</sub> apresentou valores mais baixos em relação a proteína parental e 435Mut quando uma concentração de 300 mM de proteína foi utilizada. No entanto, o aumento na concentração das proteínas resultou em um aumento proporcional dos níveis de Pi na solução, não havendo diferença estatística entre as proteínas recombinantes.

#### 4.5.4 Ensaio de atividade helicase

A atividade helicase das proteínas recombinantes NS2B<sub>47</sub>NS3 foi testada em presença de 250 nM das proteínas recombinantes, 25 mM TrisHCl pH 7,5, 5 mM ATP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM DTT10% glicerol, 0,1 mg/ml BSA e 0,2 µM de substrato

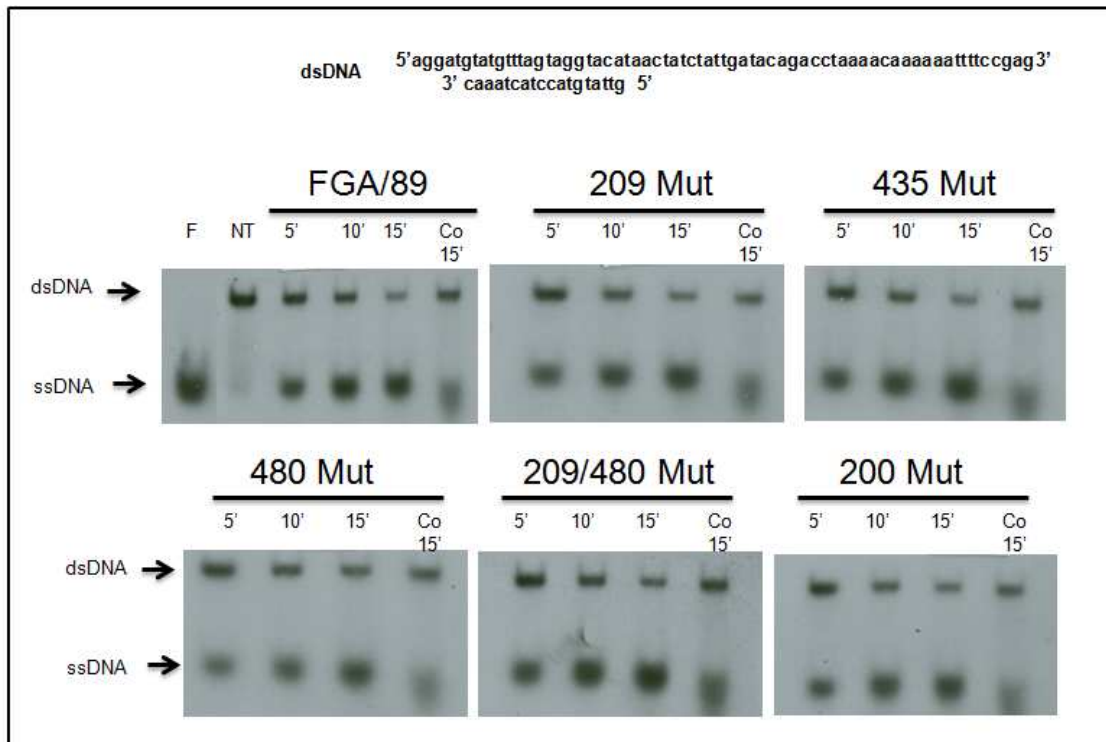
dsRNA marcado radioativamente, o mesmo utilizado nos ensaios de atividade ATPase mencionados acima. As reações foram incubadas em tempos distintos à 37°C e interrompidas pela adição da solução de terminação (3% Fycoll, 1% SDS, 0,02% BPB, 20 mM EDTA). Alíquotas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante (PAGE) 12%. A cinética de atividade helicase demonstrou que as proteínas recombinante NS2B<sub>47</sub>NS3 não foram capazes de promover a abertura *in vitro* da dupla fita de RNA sintético (Figura 4.43). As variações da reação, envolvendo diferentes concentrações de proteína, substrato, tempo e temperatura também não apresentaram resultados satisfatórios quanto a abertura da dsRNA.



**Figura 4.43 – Cinética de atividade helicase das variantes da proteína NS2B<sub>47</sub>NS3 do DENV-1 substrato dsRNA.** Autoradiografia de eletroforeses em gel de poliacrilamida (PAGE) nativo 12% dos produtos da reação helicase. Os tempos de incubação estão indicados pelos números: 5' 10' e 15'. **Co** indica o controle negativo da reação, sem presença de ATP e MgCl<sub>2</sub>. **NT**. substrato não tratado. **F**. substrato fervido.

Embora o DNA não seja o substrato natural das DExH RNA helicases, estudos demonstram que a proteína NS3 dos flavivírus é capaz de promover a abertura da dupla fita de DNA *in vitro* (APPLEBY et al., 2011). Assim, para assegurar que as condições experimentais eram adequadas para promoção da atividade catalítica de helicase *in vitro*, nós utilizamos uma sonda de DNA contendo duas regiões simples fita em suas extremidades (Figura 4.44). Desta forma, foi possível verificar atividade catalítica de helicase de todas as proteínas NS2B<sub>47</sub>NS3

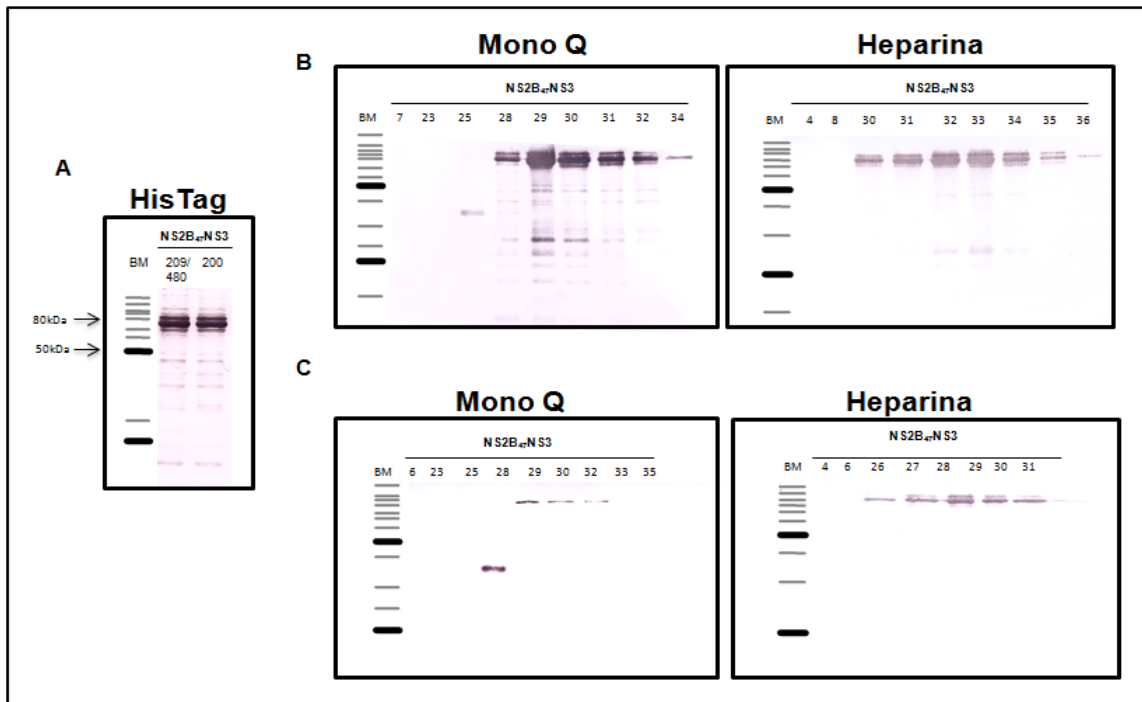
recombinantes utilizando o substrato de dsDNA, inclusive da proteína controle NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>200Mut</sub>, o que pode sugerir a presença de contaminantes na fração purificada das proteínas recombinantes. A proteína NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>200Mut</sub> é incapaz de hidrolisar ATP e, portanto, deve também ser incapaz de promover a abertura da dupla fita de ácidos nucleicos.



**Figura 4.44 – Cinética de atividade helicase das variantes da proteína NS2B<sub>47</sub>NS3 do DENV-1 substrato dsDNA.** Autoradiografia de eletroforeses em gel de poliacrilamida (PAGE) nativo 12% dos produtos da reação helicase. Os tempos de incubação estão indicados pelos números: 5' 10' e 15'. **Co** indica o controle negativo da reação, sem presença de ATP. **NT**, substrato não tratado. **F**, substrato fervido.

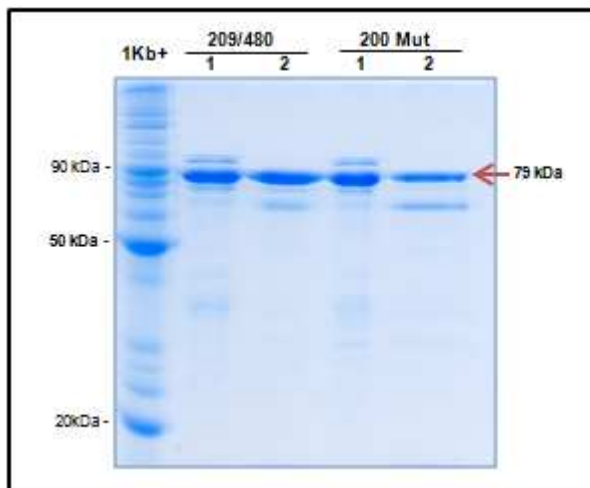
Para excluir os potenciais contaminantes presentes nas amostras ds proteínas recombinantes, as proteínas NS2B<sub>47</sub>NS3 209/480Mut e 200Mut previamente purificadas por cromatografia de afinidade em resina de níquel foram submetidas a uma segunda etapa de purificação em cromatografia líquida de proteínas (FPLC - ÄKTA prime) em colunas pré-empacotadas com resina Mono-Q sefarose (GE), seguida pela purificação em coluna pré-empacotadas com heparina sefarose (GE) (Figura 4.45). Alíquotas das frações coletadas durante o processo de purificação das proteínas recombinantes foram submetidas à eletroforese em géis SDS-PAGE 13% e a identidade das amostras determinada pela técnica de *western blotting*, utilizando

anticorpos anti-histidina ou mAb contra a proteína NS3 helicase do DENV-1 (1402-7B)



**Figura 4.45 – Análise da purificação das proteínas recombinantes NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>209/480</sub> e NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>200</sub> do DENV-1 por cromatografia de afinidade e troca-iônica.** As reações de *western blotting* foram reagidas com anticorpo policlonal anti-histidina (purificações em resina de Ni<sup>2+</sup> coluna Mono-Q) e anticorpo monoclonal anti-NS3 helicase 1402-7B (purificação em coluna heparina) e anticorpo secundário anti-mouse conjugado com fosfatase alcalina. **A.** Perfil da fração purificada das proteínas NS2B<sub>47</sub>NS3 após purificação resina de Ni<sup>2+</sup>. **B.** Perfil da purificação das proteínas NS2B<sub>47</sub>NS3 após purificação em coluna Mono-Q por FPLC **C.** Perfil da purificação das proteínas NS2B<sub>47</sub>NS3 após purificação em coluna de heparina por FPLC. **BM.** Padrão de peso molecular BenchMark (Invitrogen).

Após as etapas de purificação sequencial as frações mais puras de cada proteína foram misturadas e concentradas em centricon de 50 kDa e visualizadas em gel SDS-PAGE 13% corados com gel code *blue stain* (Thermo) (Figura 4.46).



**Figura 4.46 - Análise da purificação das proteínas recombinante NS2B<sub>47</sub>NS3 do DENV-1 por SDS-PAGE, realizada sob condições desnaturantes em gel de poliacrilamida 13%.** As proteínas foram visualizadas por meio da coloração com gel code *blue stain*. **1.** Perfil da purificação das proteínas NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>209/480</sub> e NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>200</sub> em resina de Ni<sup>2+</sup>, antes da purificação por troca-iônica **2.** Perfil da purificação das proteínas NS2B<sub>47</sub>NS3 após purificação em coluna de heparina e concentração em centricon com *cut off* de 50 kDa. **BM.** Padrão de massa molecular BenchMark (Invitrogen).

A análise do processo de purificação das proteínas NS2B<sub>47</sub>NS3 recombinantes em gel SDS-PAGE evidencia a remoção da banda de aproximadamente 95 kDa. A concentração das proteínas purificadas foi determinada utilizando o método de quantificação de proteínas baseado na intensidade de fluorescência (Qubit - Invitrogen). As atividades catalíticas de ATPase e helicase das proteína NS2<sub>47</sub>BNS3<sub>209/480Mut</sub> e NS2<sub>47</sub>BNS3<sub>200Mut</sub> foram avaliadas *in vitro*. Resultados preliminares, mostraram que o método de purificação das proteínas foi eficiente para manter a atividade catalítica de ATPase da proteína NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>209/480Mut</sub> e promover a atividade catalítica de helicase em substrato dsDNA. Como controle negativo dos ensaios catalíticos, utilizamos a proteína NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>200Mut</sub>. A proteína não apresentou atividades catalíticas de ATPase e helicase, sugerindo que os métodos de purificação da proteína foram eficientes para eliminar possíveis contaminantes das amostras. Dessa forma, as purificações sequenciais das proteínas em resinas de níquel e heparina constituem um método eficiente para purificação das proteínas NS2B<sub>47</sub>NS3, as quais poderão ser utilizadas em estudos comparativos futuros de

determinação da atividade catalítica de helicase das proteínas recombinantes do DENV-1.

## 5 DISCUSSÃO

Os mecanismos envolvidos na patogênese da dengue são ainda pouco compreendidos, principalmente pela ausência de um modelo animal que reflita os casos graves da doença; e todos os avanços no conhecimento desta complexa patologia têm sido obtidos através de estudos envolvendo pacientes infectados com o DENV ou pelo uso de modelos animais que reproduzem algumas das características relevantes da dengue. Essas investigações têm demonstrado que vários elementos da resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro estão implicados na patogênese da dengue. Mais recentemente, outros fatores como polimorfismos genéticos de populações e fatores virais têm sido correlacionados com os distintos perfis de apresentação clínica da doença em humanos. A gravidade da doença é, portanto, resultado de uma complexa interação entre os determinantes virais e fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro.

É sabido que as cepas dos quatro sorotipos do DENV variam em termos de patogenicidade e virulência no hospedeiro humano, no entanto, as bases moleculares para a ocorrência dessas diferenças fenotípicas são vagamente conhecidas. Alguns estudos demonstram que o surgimento de mutações espontâneas contribui para a emergência de cepas com maior habilidade infectiva e replicativa, que podem ocasionar mudanças no tropismo celular e culminar no desenvolvimento de formas graves da doença. Embora alguns possíveis determinantes genéticos de virulência do DENV tenham sido descritos, nenhuma evidência conclusiva de correlação entre genótipo viral, transmissibilidade e patogenicidade foi obtida até o momento. Visando melhor compreender a patogênese dessa doença, o nosso grupo tem se dedicado a identificação de alterações genéticas que possam estar relacionadas ao aumento da virulência do DENV em modelo murino. As variantes neuroadaptadas do DENV-1 cepa FGA/89, selecionadas em dois estudos independentes (DESPRÉS et al., 1998; BORDIGNON et al., 2007), apresentam propriedades biológicas definidas para o estudo de marcadores moleculares de virulência. As mutações identificadas no genoma dessas cepas de DENV-1 mapeiam em importantes domínios de duas proteínas virais, E e NS3, que apresentam funções estruturais e enzimáticas essenciais para a manutenção do ciclo viral. A identificação de assinaturas moleculares no genoma

viral ou a determinação de padrões transcricionais de genes do hospedeiro no curso da infecção podem constituir uma ferramenta para a identificação de biomarcadores, mas principalmente, possibilitar o entendimento de mecanismos moleculares e patofisiológicos do desenvolvimento de diferentes padrões da doença.

Com o intuito de definir o papel funcional de mutações pontuais no genoma do DENV-1 (E<sub>402</sub>, E<sub>405</sub>, NS<sub>3209</sub>, NS<sub>3435</sub> e NS<sub>3480</sub>) em modelo experimental de neurovirulência murino, *in vitro* e *ex vivo*, nós utilizamos um painel de 10 DENV-1 recombinantes obtidos a partir dos clones infecciosos de DENV-1 contendo cada uma das mutações isoladamente ou em conjunto, conforme esquema mostrado na figura 4.1, item 4.1

### **Caracterização *in vivo* dos DENV-1 recombinantes**

A cinética de infecção *in vivo* demonstrou que o DENV-1 recombinante triplo mutante (vBAC-E<sub>402</sub>NS<sub>3209</sub>NS<sub>3480</sub>) infecta eficientemente células do SNC de camundongos neonatos, ocasionando severa encefalite e mortalidade dos animais em comparação a baixa eficiência de infecção e virulência do vírus parental vBACDV1. As mais altas taxas de progênie viral foram observadas no tecido cerebral de camundongos infectados com o DENV-1 triplo mutante em todos os pontos da cinética de infecção, demonstrando o papel destas mutações para o estabelecimento de uma infecção produtiva no SNC de camundongos.

A habilidade infectiva do vírus triplo mutante (vBAC-E<sub>402</sub>NS<sub>3209</sub>NS<sub>3480</sub>), caracterizada pelas taxas de RNA e progênie viral presentes no SNC de camundongos 8 dpi, não difere das taxas de infecção e letalidade do vírus duplo mutante (vBAC-E<sub>402</sub>NS<sub>3480</sub>). A mutação NS<sub>3209</sub>, a qual foi co-selecionada com a NS<sub>3480</sub> durante a adaptação do DENV-1 FGA/89 em camundongo, parece não ter efeito na virulência do DENV-1. Interessantemente, níveis semelhantes de RNA e progênie viral foram identificados no SNC de camundongos infectados com os vírus duplo mutantes (vBAC-E<sub>405</sub>NS<sub>3435</sub> e vBAC-E<sub>402</sub>NS<sub>3480</sub>), no entanto, as taxas de mortalidade dos grupos de animais infectados com os vírus vBAC-E<sub>405</sub>NS<sub>3435</sub> foram mais baixas (73%) em comparação a infecção com o vírus vBAC-E<sub>402</sub>NS<sub>3480</sub> que ocasionou mortalidade de 100% dos animais durante o período de observação.



Os vírus simples mutantes vBAC-E<sub>402</sub>, vBAC-E<sub>405</sub> e vBAC-NS3<sub>209</sub> não exibem fenótipo neurovirulento. Em contraste, os DENV-1 recombinantes que contém apenas as mutações NS3<sub>435</sub> e NS3<sub>480</sub> apresentam fenótipo neurovirulento e exibem alteração na capacidade replicativa do DENV-1 no SNC de camundongos, o que sugere a importância dessas mutações, localizadas no subdomínio II do domínio helicase, na modulação do *fitness* viral *in vivo*. Tem sido reportado que uma única substituição de aminoácido (ThrNS3<sub>249</sub>Pro) no domínio helicase da proteína NS3 de uma cepa avirulenta do WNV é suficiente para ocasionar um fenótipo altamente virulento em corvos americanos, por aumentar as taxas de viremia e RNA viral (BRAULT et al., 2007). Esta região da proteína está envolvida na ligação de RNA e hidrólise de ATP e é requerida para dirigir a helicase viral ao longo do substrato de RNA (TUTEJA et al., 2004). Sampath et al. (2006) sugeriram, a partir de estudos mutagênicos da proteína recombinante NS3 do DENV-2, que resíduos de aminoácidos na superfície do domínio II da proteína NS3<sub>hel</sub> podem interagir com a dsRNA e modular as atividade catalíticas de ATPase, helicase e RTPase da proteína. O modelo proposto pelos autores sugere que o resíduo de aminoácido Ile365 (localizado no topo do domínio II da NS3) poderia atuar como “translocador”, desestabilizando as pontes de hidrogênio da forquilha de dsRNA e modular a atividade de helicase da proteína. As mutações NS3<sub>480</sub> e NS3<sub>435</sub> mapeiam na face côncava do domínio II e ambas poderiam alterar a capacidade de ligação ao substrato de RNA e, assim, modular as atividades catalíticas da NS3<sub>hel</sub>.

Recentemente, Grant et al. (2011) identificaram um determinante crítico para a virulência do DENV-2 em camundongo AG129, localizado na posição 52 da proteína NS4B. A alteração do resíduo de aminoácido LeuNS4B<sub>52</sub>Phe em uma cepa de DENV-2 não virulenta era suficiente para aumentar a viremia em células de mamíferos, mas não em células de inseto, e ocasionar mortalidade de 80% dos animais. O aumento da viremia em células de mamífero era independente a habilidade da proteína inibir IFN-I. Os autores hipotetizam que a interação física entre as proteínas NS4B (localizada na face citoplasmática do RE) e NS3, poderia ocorrer antes do processamento da poliproteína viral e que essa interação transiente poderia modular a replicação do DENV.

Interessantemente, o domínio H1<sup>pred</sup> da proteína E, onde mapeiam as mutações E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub>, tem sido associado com a neurovirulência do DENV em

modelo murino. Chen et al., (1995) demonstraram que a substituição LysE<sub>406</sub>Glu, identificada no DENV-2 cepa NGC, era capaz de conferir ao vírus quimérico de DENV-4/DENV-3 um fenótipo neurovirulento em camundongos. Kawano et al. (1993) utilizando a tecnologia de clones infecciosos identificaram dois determinantes genéticos localizados na proteína E (Thr<sub>155</sub>Ile e Phe<sub>401</sub>Leu) potencialmente implicados na neurovirulência do DENV-4 em camundongos. As mutações isoladas na proteína E (E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub>) não exercem efeito sobre a virulência do DENV-1 recombinante. No entanto, quando combinadas com as mutações NS3<sub>435</sub> e NS3<sub>480</sub> ou NS3<sub>209</sub>/NS3<sub>480</sub> aumentam consideravelmente a síntese de RNA e progênie viral no SNC de camundongos, evidenciando o efeito sinérgico dessas mutações para o aumento do *fitness* viral e aquisição de um fenótipo virulento em camundongos. Purdy e Chang (2005) demonstraram que mutações na  $\alpha$ -hélice H1<sup>pred</sup> da proteína E (resíduos de aminoácidos 398, 401 e 412) estão envolvidas com a secreção/retenção de partículas virais não infecciosas em células CHO. Dessa forma, as mutações E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub> poderiam também desempenhar um papel no aumento da secreção de partículas virais infecciosas por influenciar as interações intra e intermoleculares necessárias para a montagem e transporte das partículas virais pela via secretória da célula hospedeira. Por outro lado, as mutações na proteína E poderiam também através de interações intramoleculares facilitar o processo de trimerização, requerido para fusão da membrana viral com a membrana do endossomo, e conseqüentemente aumentar a liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma (STIASNY et al., 2005; MODIS et al., 2004). Assim, o aumento do *input* de RNA viral, juntamente com a maior eficiência de replicação conferida pelas mutações NS3<sub>435</sub> e NS3<sub>480</sub>, poderia contribuir para o aumento da síntese de RNA na célula hospedeira. A presença dessas mutações poderiam aumentar a eficiência de replicação através da modulação das atividades catalíticas ou interação com outras proteínas do complexo replicativo. Tem sido descrito que a proteína NS3 de flavivírus desempenha um importante papel na morfogênese viral. Mais recentemente, Jiang e Luo (2012) demonstraram que mutações na proteína NS3 de HCV podem atuar sinérgicamente para aumentar a eficiência de montagem de partículas virais infecciosas através de interações físicas com outras proteínas virais estruturais e não estruturais. Dessa forma, as mutações nas proteínas E e NS3 poderiam atuar de forma sinérgica modulando os processos de liberação do RNA

viral na célula hospedeira, aumentando a eficiência de replicação, montagem e liberação da partícula viral no SNC de camundongos infectados com os DENV-1 duplos e triplo mutantes

Além disso, nós evidenciamos que a combinação das mutações E<sub>402</sub>/NS3<sub>209</sub>/NS3<sub>480</sub> altera significativamente a capacidade replicativa do DENV-1 recombinante, possibilitando a disseminação do vírus para outros tecidos celulares, tal como a medula espinhal de camundongos. No entanto, o mecanismo envolvido com a infecção e replicação do DENV-1 recombinante em células da medula espinhal necessita ainda ser determinado. Alguns estudos sugerem que o DENV inoculado via i.c. pode disseminar-se para os neurônios da medula espinhal através do canal ependimário, por transmissão via espaço intersticial de células ependimárias ou diretamente pela infecção de neurônio a neurônio, através de vesículas pré e pós-sinápticas. Chaturvedi et al. (1991) utilizando um modelo murino de infecção demonstraram a habilidade do DENV “cruzar” a barreira hematoencefálica, provavelmente pela secreção de uma citocina que o autor denominou de fator citotóxico (CF), produzida durante a infecção viral. Recentemente, foi demonstrado que uma parcela significativa de pacientes com manifestações neurológicas da dengue apresentam vírus circulante ou IgM específica contra proteínas do DENV no líquido, indicando que o vírus pode cruzar ativamente a barreira hematoencefálica e replicar nos tecidos do sistema nervoso humano (DOMINGUES et al., 2008; PUCCIONI-SOHLER et al., 2009).

A patologia provocada pela infecção do DENV é determinada pelo equilíbrio entre a resposta do hospedeiro frente à infecção e a capacidade do agente infeccioso escapar desta resposta imune e multiplicar-se no hospedeiro. Como parte desta interação dinâmica, os níveis da resposta do hospedeiro podem contribuir para a patofisiologia da doença. Foi demonstrado pela técnica de RT/qPCR que níveis elevados de replicação da variante vBAC-E<sub>402</sub>NS3<sub>209</sub>NS3<sub>480</sub> induzem maior expressão de IFN- $\beta$ , USP18 e Ccl5 em comparação com o vírus parental, consistente com os dados anteriores de primatas não humanos (SARIOL et al., 2007) e culturas primárias de células humanas (WARKE et al., 2008). Os nossos dados corroboram os resultados de Bordignon (2008), demonstrando que cepas mais neurovirulentas possuem modulação de IRF (do inglês, *interferon regulatory factors*) mais expressiva em relação aos vírus não patogênicos. Durante este

estudo, Bordignon et al. (2008) evidenciaram que o gene Ube2l6, que codifica uma enzima conjugada a ubiquitina, estava regulado positivamente em animais infectados com o DENV-1 parental (FGA/89) e com a variante neuroadaptada (FGA/NA a5c) 8 dpi; com maiores níveis de significância nos animais infectados com o vírus neuroadaptado. Em um estudo recente, uma proteína celular humana com função semelhante (Ube21, enzima conjugadora a ubiquitina) foi indentificada nos ensaios de interação com as proteínas NS2B, NS4B e NS5 do DENV; e a utilização de siRNA para este gene foi capaz de inibir a replicação viral (KHADKA et al., 2011). A proteína Ube216 participa da mesma via de ubiquitinação que a USP18, importante para os mecanismos de resposta imune inata contra infecções virais. Foi descrito que a proteína Usp18 é capaz de se ligar ao receptor IFNAR2 (do inglês, *Interferon-alpha/beta receptor*) e atuar na regulação negativa da via de IFN (MALAKHOVA, et al., 2006). Dessa forma, o aumento da expressão desse gene, induzida pela infecção com o vírus triplo mutante, parece resultar de uma tentativa da célula hospedeira conter a exacerbação da resposta imune no tecido cerebral de camundongos. No entanto, o aumento da expressão desse gene poderia favorecer a replicação viral no tecido cerebral dos camundongos infectados. O aumento da expressão gênica da quimiocina Ccl5 no tecido cerebral de animais infectados com o vírus triplo mutante pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento de encefalite nesses animais. As quimiocinas da família C-C e C-X-C atraem uma grande variedade de células, como monócitos/macrófagos, eosinófilos, células dendríticas, basófilos e linfócitos T e poderiam contribuir para o desenvolvimento de injúrias teciduais graves observadas no tecido cerebral dos animais infectados com as variantes neurovirulentas do DENV-1 (BORBA, 2010; STROTTMANN, 2008; BORDIGNON et al., 2008).

### **Caracterização *in vitro* dos DENV-1 recombinantes**

A cinética de infecção dos DENV-1 recombinantes em células de linhagem humana e de inseto nos permitiu evidenciar o sinergismo entre as mutações nas proteínas E e NS3 para o estabelecimento de uma infecção mais produtiva. Embora a diferença no número de células infectadas com os DENV-1 vBAC-NS3<sub>435</sub> e vBAC-NS3<sub>480</sub> não sejam significativas, os dados de quantificação por citometria de fluxo,

revelaram a tendência desses vírus infectarem um maior número de células Huh 7.5 em relação ao vírus vBACDV1. A indução de CPE em células Huh7.5 pelos vírus vBACDV1, vBAC-NS3<sub>209</sub>, vBAC-NS3<sub>435</sub> e vBAC-NS3<sub>480</sub> podem ter exercido efeito sobre o número de células infectadas em relação aos vírus que não induzem CPE (vBAC-E<sub>402</sub>, vBAC-E<sub>405</sub>, vBAC-E<sub>402</sub>NS3<sub>480</sub>, vBAC-E<sub>405</sub>NS3<sub>435</sub> vBAC-E<sub>402</sub>NS3<sub>209</sub>NS3<sub>480</sub>). Desta forma, somente a quantificação direta da progênie viral e do RNA viral durante a cinética de infecção dos DENV-1 recombinantes em células C6/36 e Huh7.5 permitirá avaliar, de uma forma mais eficaz, o efeito das mutações na modulação do *fitness* viral *in vitro*.

Como mencionado, os vírus recombinantes utilizados neste trabalho diferem quanto à sua habilidade de causar CPE em culturas de células de humano (Huh7.5) e de inseto (C6/36). Os vírus vBAC-NS3<sub>209</sub>, vBAC-NS3<sub>435</sub> e vBAC-NS3<sub>480</sub> mantêm as mesmas características do vírus parental vBACDV1, induzindo fusão celular tipossincício em células C6/36 e lise celular em células Huh7.5. No entanto, os vírus vBAC-E<sub>402</sub> e vBAC-E<sub>405</sub> não induzem a formação de CPE, semelhante ao vírus FGA/NA d1d e FGA/NA P6, de onde as mutações foram previamente identificadas. Interessantemente, os vírus contendo a combinação das mutações E e NS3 (vBACE<sub>402</sub>NS3<sub>209</sub>, vBACE<sub>402</sub>NS3<sub>480</sub>, vBACE<sub>402</sub>NS3<sub>209</sub>NS3<sub>480</sub> e vBACE<sub>405</sub>NS3<sub>435</sub>) apresentaram alteração no fenótipo de fusão em cultura celular; evidenciando, mais uma vez, o efeito sinérgico das mutações nas proteínas E e NS3 para modulação do fenótipo viral.

Os resultados demonstraram que presença de uma única mutação (E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub>) na região N-terminal da H1<sup>pred</sup> da proteína E era suficiente para suprimir o CPE do DENV-1 recombinante em cultura de células. Com o intuito de confirmar o efeito dessas substituições de aminoácido no fenótipo viral, as mutações PheE<sub>402</sub>Leu e ThrE<sub>405</sub>Ile foram inseridas no contexto do clone infeccioso quimérico de YF/DEN-1; que contém o *backbone* do YFV atenuado e a região genômica equivalente as proteínas prM-E do DENV-1 genótipo V (MATEU et al., 2007). A região prME do clone pAC YF/DEN-1 apresenta 97,8% de similaridade aminoacídica com a região equivalente do DENV-1 cepa FGA/89 e 98,6% de similaridade com o DENV-1 cepa BR/90. A inserção das mutações E<sub>405</sub> e E<sub>402</sub> no contexto genético do vírus quimérico YF/DEN-1 nos permitiu confirmar o papel e a importância dessas mutações no processo de inibição do CPE em culturas de células. A inserção de mutações

pontuais de uma cepa viral (vBAC-E<sub>402</sub> e vBAC-E<sub>405</sub>) no contexto do genoma de outra cepa distinta (YF/DENV) aumenta a confiabilidade dos resultados obtidos, tendo em vista que, a estratégia utilizada nos possibilitou reproduzir *in vitro* o fenótipo de inibição do CPE. Nós especulamos que a substituição dos aminoácidos na região H1<sup>pred</sup> da proteína E do DENV poderia afetar o estado de transição do homodímero da proteína E para a forma de fusão (MODIS et al., 2004) ou influenciar na estrutura e distribuição desses elementos nas membranas do RE (ZHANG et al., 2003). Lin et al., (2011) sugerem a importância do caráter hidrofóbico desta região da proteína E para manutenção da estrutura e função da  $\alpha$ -hélice da H1<sup>pred</sup>. Os aminoácidos Leu e Ile apresentam alto valor empírico de hidrofobicidade e poderiam afetar a associação da *stem region* com a membrana e, dessa forma, interferir com a curvatura e dobramento da membrana lipídica durante a montagem da partícula viral no RE ou trimerização da proteína E, induzida por baixo pH.

Os mecanismos pelos quais os flavivírus induzem alterações morfológicas específicas na célula hospedeira não está completamente elucidado. Porém, sabe-se que no hospedeiro vertebrado, o CPE pode contribuir para a gravidade da doença; no caso da infecção pelo YFV o CPE pode ocasionar injúria hepática (PASTORINO et al., 2010). Tem sido reportado que a replicação viral pode causar extensivo rearranjo do citoesqueleto e membranas intracelulares e culminar no desenvolvimento de CPE em células de origem humanas, de primatas não humanos, de roedores e de insetos. Randolph e Stollar (1990) sugerem que a formação de fusão tipo-sincício em células de mosquitos infectadas com DENV pode ser iniciada por vírions recém-liberados, que se tornam engajados na fusão com a membrana plasmática de células vizinhas infectadas ou não. Durante a infecção dos flavivírus na célula hospedeira, o baixo pH do endossomo induz a exposição do peptídeo de fusão presente na proteína E, promovendo a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. A habilidade do vírus se fundir com a membrana do endossomo da célula hospedeira a médio pH parece ter um papel na infectividade dos flavivírus (GOLLINS; PORTERFIELD, 1986). Da mesma forma o pH parece ter efeito na formação de sincício durante a infecção viral na célula hospedeira.

Análises imunohistológicas prévias do SNC de camundongos infectados com os DENV demonstram que os neurônios corticais e hipocâmpais são os principais alvos de infecção pelo DENV-1 (BORDIGNON, STROTTMANN et al., 2007; BORBA

(2010). Além disso, as células de neurônio primário (NP) e linhagens celulares de neurônio murino (Neuro 2a) suportam com eficiência a replicação do DENV (BORDIGNON, STROTTMANN et al., 2007). De acordo com esses resultados e com o intuito de avaliar o papel das mutações E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub> na interação com receptores das células hospedeira, nós realizamos ensaios de ligação em células de linhagem murina Neuro 2a. Condizente com a localização, as mutações E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub> não modulam a afinidade do vírus aos receptores de superfície da célula hospedeira, apresentando a mesma capacidade de ligação que o vírus parental vBACDV1. Dessa forma, podemos sugerir que o mecanismo pelo qual as mutações na proteína E aumentam a virulência do DENV envolve os passos seguintes a adsorção viral, tal como fusão, morfogênese viral e liberação da partícula infecciosa. Allison et al. (1999) e Lin et al. (2011) demonstraram o envolvimento do domínio H1<sup>pred</sup> em dois importantes passos do ciclo de replicação viral: a entrada e montagem da partícula viral na célula hospedeira.

Os resultados obtidos *in vivo* e *in vitro* sugerem que as mutações identificadas nas variantes neurovirulentas do DENV-1 podem afetar tanto a virulência no hospedeiro vertebrado, ocasionando severa encefalite em camundongos neonatos, quanto o *fitness* viral *in vitro*, aumentando a habilidade infectiva desses vírus em células humanas e de inseto. Gubler et al., (1978) demonstraram que cepas de DENV-2 menos virulentas nos hospedeiros humanos apresentam baixas taxas de transmissão em mosquitos vetores. Cologna, Armstrong e Rico-Hesse (2005) demonstraram que o aumento da viremia do DENV-2 (genótipo asiático) em hospedeiros humanos está associado com a maior eficiência de replicação em DCs residentes na epiderme e maior competência vetorial (infecção e disseminação) em mosquitos *A. aegypti*, quando comparado com o vírus avirulento de mesmo sorotipo. Dessa forma, estudos adicionais utilizando as variantes dos DENV-1 recombinantes serão realizados para avaliar o potencial efeito das mutações nas proteínas E e NS3 na modulação da replicação e transmissibilidade dos DENV-1 recombinantes em mosquitos vetores do gênero *Aedes*.

### **Caracterização *ex vivo* dos DENV-1 para avaliação das mutações na proteína NS3**

As DCs residentes na pele são os primeiros alvos do DENV durante a infecção natural e constituem um elemento chave no desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Deste modo, as DCs representam um interessante modelo de estudo *ex vivo* na patogênese da dengue (DEJNIRATTISAI et al., 2008). Com base nos resultados de infecção *in vivo*, em que se observou um aumento na morbidade e mortalidade dos animais infectados com as variantes vBACNS3<sub>435</sub> e vBACNS3<sub>480</sub>, decidimos avaliar o papel pontual destas mutações no perfil de replicação viral e resposta das mdDCs humanas em relação ao DENV-1 parental (vBACDV1).

O pico de replicação dos DENV-1 recombinantes em mdDCs ocorre 48 hpi. A síntese de proteínas virais e liberação de novas partículas infecciosas acompanham a cinética de replicação. No entanto, a infecção dos vBAC-NS3<sub>435</sub> e vBAC-NS3<sub>480</sub> em mdDCs é mais produtiva, no que se refere a replicação e produção de progênie viral, do que a infecção com o vírus parental vBACDV1 com MOI similar ou mais alto, evidenciando o papel dessas mutações na modulação da infectividade viral. A análise por citometria de fluxo mostrou regulação positiva dos marcadores de superfície CD40 e CD80 em mdDCs infectadas com os vírus mutantes em comparação a infecção com o mock e vBACDV1 e modulação significativa de HLA-DR em todos os DENV-1 recombinantes quando comparado com o mock.

Durante a infecção viral na célula hospedeira, os PRRs citosólicos ou associados a membranas são capazes de reconhecer os componentes virais (PAMPs) e disparar uma resposta antiviral. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a replicação dos DENV-1 em mdDCs estimula a expressão gênica de TLR3 e TLR7 24 hpi, com mais alta significância para os DENV-1 contendo as substituições NS3<sub>435</sub> e NS3<sub>480</sub>; em concordância com as maiores taxas de replicação. Essas moléculas constituem elementos chave da resposta imune e são capazes de disparar a via de sinalização que ativa a produção de IFN-I e citocinas pró-inflamatórias (TAKEUCHI; AKIRA, 2009). No entanto, em contraste com alguns trabalhos reportados na literatura (WANG et al., 2006; SUN et al., 2009), nós evidenciamos que os DENV-1 recombinantes vBAC-NS3<sub>435</sub> e vBAC-NS3<sub>480</sub> não induzem expressão diferencial de IFN-I ( $\alpha/\beta$ ) em células mdDCs, apesar dos altos



níveis de expressão dos genes de TLR3/7 detectados 24 hpi, comparados com o vírus parental. O aumento na expressão de proteínas de IFN- $\alpha$  em mdDCs foi detectado 24 e 48 hpi com os DENV-1 recombinantes em relação ao mock, não havendo diferença significativa entre os DENV-1 recombinantes. Os níveis de IFN- $\alpha$  no sobrenadante das culturas infectadas com os DENV-1 recombinantes não foram maiores que 1,2 ng/mL, em 48 hpi. O aumento significativo na expressão das proteínas de IFN- $\beta$  em relação ao mock foi observado apenas 48 hpi, não havendo diferença significativa entre os DENV-1 recombinantes. Os níveis de IFN- $\beta$  no sobrenadante das culturas infectadas com os DENV-1 recombinantes não foram maiores que 250 pg/mL, em 48 hpi. Tem sido reportado na literatura que os DENV são fracos indutores de IFN-I em cultura de mdDCs humanas (SUN et al., 2009; RODRIGUEZ-MADOZ et al., 2010a/2010b). Uma vez que os nossos estudos iniciais foram feitos com baixas MOIs, utilizamos uma MOI 10 vezes maior para investigar se a dose do DENV-1 poderia ter efeito sobre a produção de IFN-I. Observamos que a produção de IFN- $\alpha/\beta$ , não se alterava mesmo quando altas doses de vírus eram administradas. Os resultados indicam que os DENV-1 recombinantes podem bloquear ou não induzir a via de sinalização de IFN-I nas células infectadas, sugerindo um possível mecanismo viral para evasão da resposta imune em mdDCs.

Diversos trabalhos demonstram que os DENV podem evadir com sucesso a resposta imune da célula hospedeira. Proteínas não estruturais de flavivírus e outros vírus RNA, tal como HCV, HIV e vírus da influenza A, produzem modulação imune efetiva e utilizam distintos mecanismos para limitar a resposta imunológica do hospedeiro e aumentar a replicação viral (GAO et al., 2012; IMRAN et al., 2012; MARSILI et al., 2012; YE et al., 2013). Pelo menos cinco das sete proteínas NS do DENV (NS2A, NS4A, NS4B, NS5 e o complexo NS2BNS3 protease) têm sido associadas com a inibição de diferentes componentes da cascata de sinalização de IFN-I (MUÑOZ-JORDÁN et al., 2003 e 2005; ASHOUR et al., 2009). Recentemente, Aguirre et al. (2012) demonstraram que a atividade proteolítica do complexo NS2BNS3 é requerida para promover a clivagem da molécula adaptadora estimuladora do gene de IFN (STING do inglês, *stimulator of the interferon gene*) e modular a geração de uma resposta imune em DCs humanas mediada pela via de sinalização de IFN-I, por sensibilização independente dos TLR. Estudos envolvendo o complexo protease do HCV (NS4ANS3) demonstraram que esta proteína cliva

especificamente a molécula TRIF em dois polipeptídeos, impedindo a ativação do promotor da transcrição de IFN- $\beta$  dependente de TLR (LI et al., 2005a). Da mesma forma Meylan et al. (2005) demonstraram que o complexo viral NS4ANS3 do HCV também é capaz de clivar eficientemente IPS-1 e inibir a via de sinalização em linhagens celulares humanas. Mais recentemente, Chang et al. (2012) publicaram resultados similares aos identificados neste estudo e evidenciaram que os baixos níveis de IFN- $\beta$  detectados em DCs derivadas da medula espinhal de camundongos infectadas com DENV-2 decorrem do bloqueio da ativação de NF- $\kappa$ B e indução de citocinas disparadas pela sinalização de TLR.

Por outro lado, é sabido que a replicação viral contribui para indução e rearranjo das membranas intracelulares do RE. Nós especulamos que as mutações na proteína NS3 poderiam contribuir para a formação de estruturas vesiculares nas membranas do RE da célula hospedeira infectada, favorecendo a replicação e isolando alguns componentes virais, dificultando a interação PAMP-PRRs. Este fenômeno tem sido descrito para alguns flavivírus (FREDERICKSEN; GALE, 2006) e, conforme demonstrado, pode contribuir para evasão da resposta imune e favorecer a replicação e produção de novas partículas virais na célula hospedeira.

É importante ressaltar que a baixa produção de IFN- $\beta$  induzida pela infecção dos DENV-1 recombinantes vBACDV1, vBAC-NS3<sub>435</sub> e vBAC-NS3<sub>480</sub> em mdDCs humanas está de acordo com os resultados obtidos nos estudos *in vivo* (Figura 7, anexo 1), em que os vírus contendo mutações na proteína NS3, embora repliquem de forma mais eficiente no SNC de camundongos, induzem níveis de expressão de IFN- $\beta$  similares quando comparado com o vírus parental. Em contraste, a expressão do gene de IFN- $\beta$  estabelecida durante a infecção dos vírus duplo mutantes (vBAC-E<sub>402</sub>NS3<sub>435</sub> e vBAC-E<sub>402</sub>NS3<sub>480</sub>), é pelo menos quatro vezes maior do que a expressão induzida pela infecção dos vírus vBACDV1, vBAC-NS3<sub>435</sub> e vBAC-NS3<sub>480</sub>. Posteriormente, será interessante avaliarmos se o efeito sinérgico das mutações E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub> na indução de IFN-I ocorre também em mdDCs humanas. O modelo de infecção *ex vivo* demonstrou a correlação entre a eficiência de replicação e modulação da resposta imune dos vírus contendo as mutações nas proteínas NS3 observada nos estudos *in vivo*.

### **Utilização da tecnologia de replicons subgenômicos para o estudo do papel de mutações pontuais NS3 de DENV-1**

Com o intuito de confirmar o papel dos determinantes genéticos da proteína NS3 na modulação da replicação viral, nós utilizamos a tecnologia de replicons subgenômicos do DENV-1. Os RNAs subgenômicos, obtidos a partir da transcrição *in vitro* dos clones RepBACDV1, RepBACDV1NS3<sub>209</sub>, RepBACDV1NS3<sub>435</sub> e RepBACDV1NS3<sub>480</sub>, foram transfectados em mdDCs e a eficiência de replicação dos RNAs contendo as mutações de interesse, na ausência das proteínas estruturas do DENV-1 foi avaliada por RT/qPCR. O aumento exponencial dos níveis de RNA ao longo da cinética de transfecção em células mdDCs demonstrou que os RNAs subgenômicos do DENV-1 gerados neste trabalho foram hábeis a replicar e produzir proteínas virais neste sistema *ex vivo*; ressaltando a maior eficiência de replicação dos RNAs contendo as mutações nas posições NS3<sub>435</sub> e NS3<sub>480</sub>, detectada 48 hpt. De acordo com os resultados obtidos nos estudos *in vivo* e *in vitro*, a mutação NS3<sub>209</sub> parece também não desempenhar vantagem seletiva para replicação do RNA subgenômico do DENV-1 em sistema *ex vivo*. Visto que durante o processo de neuroadaptação do DENV-1 FGA/89 em camundongos, a mutação NS3<sub>209</sub> foi detectada concomitantemente com a NS3<sub>480</sub>, durante a terceira passagem em cérebro de camundongos neonatos, podemos especular que a presença da mutação NS3<sub>209</sub>, que isoladamente parece não conferir vantagem seletiva ao DENV-1, pode ter favorecido a seleção de uma mutação compensatória (NS3<sub>480</sub>). A expressão de marcadores moleculares de ativação (CD40 e CD80) presentes na superfície das mdDCs transfectadas com os RNAs subgenômicos foi determinada por citometria de fluxo. Nenhuma modulação diferencial dos marcadores de ativação foi observada em mdDCs transfectadas com os RNAs subgenômicos do DENV-1 e mock em todos os tempos da cinética de transfecção, o que poderia sugerir o papel das proteínas estruturais para a ativação das mdDCs. No entanto, alguns trabalhos demonstram que epítomos da proteína NS3 podem ser processados e apresentados via MHC classe I (DUANGCHINDA et al., 2010) e que a maioria dos epítomos reconhecidos pelas células T estão localizados na proteína NS3 do DENV (KURANE et al., 2011), evidenciando que a proteína NS3 constitui um bom componente antigênico. As baixas taxas de replicação do RNA subgenômico, em comparação as altas taxas de

replicação do genoma viral completo, podem também ter exercido efeito na baixa expressão de marcadores moleculares de ativação em mdDCs. Os baixos níveis de detecção de RNA 8, 24 e 48 hpt podem refletir a baixa eficiência de replicação dos RNAs subgenômicos do DENV-1 em decorrência da ausência das proteínas estruturais, conforme demonstrado por Leardkamolkarn et al. (2012). Alternativamente, os baixos níveis de RNA detectados por RT/qPCR também podem refletir o baixo número de cópias de RNA utilizados como *input* para transfectar as mdDCs.

Alguns sistemas subgenômicos de replicon incluem marcadores moleculares que permitem uma quantificação indireta de sua replicação. A inserção de genes repórteres neste sistema poderia facilitar o estudo de marcadores moleculares de virulência por permitir uma quantificação indireta da replicação autônoma desses RNAs em sistemas celulares. Além disso, replicons subgenômicos de flavivírus expressando genes repórteres, como GFP e *renilla* luciferase, têm sido desenvolvidos para propiciar o *screening* de compostos antivirais e siRNA (ROSSI et al., 2005; NG et al., 2007) e o estudo das regiões não traduzidas do genoma viral (ALVAREZ et al., 2005; HOLDEN et al., 2006). Diferentes abordagens técnicas para a inserção de genes repórteres em sistemas subgenômicos de replicons têm sido descritas (BONALDO et al., 2007; KAPTEIN et al., 2010; ZOU et al., 2011). Alguns grupos descrevem que a inserção de genes que codificam para GFP e Rluc na região 3'UTR do genoma viral sob controle traducional do IRES do vírus da encefalomiocardite (EMCV), estratégia similar a utilizada pelo nosso grupo para a construção de replicons subgenômicos do DENV-1 RepBACDV1 #76eGFP, podem resultar na redução das taxas de replicação do RNA viral e eliminação parcial do cassete gênico (KHROMYKH; WESTAWAY, 1997; PIERSON et al., 2005). A modificação do genoma viral com longas sequências nucleotídicas, a instabilidade genética da região 3'UTR e a inserção desses genes na porção variável da região 3'UTR podem ter contribuído para a insuficiente replicação dos RNAs subgenômicos contendo genes repórteres, utilizados neste trabalho.

Recentemente, Schoggins et al. (2012) reportaram a construção de replicons subgenômicos e clones infecciosos do DENV-2 expressando os genes repórteres GFP e firefly luciferase (Fluc). Para tanto, a região conservada de ciclização (CS) do capsídeo do DENV-2 era duplicada e clonada *in frame* com os genes repórteres

GFP e Fluc fusionados com o sítio de clivagem do vírus, *foot-and-mouth disease* (FMDV-2A), para assegurar a clivagem C-terminal dos genes heterólogos (VARNAVSKI; YOUNG; KHROMYKH, 2000). Essa construção era então inserida a montante da região 5' do gene que codifica para o capsídeo viral. Neste sistema, a região CS do capsídeo viral a jusante da sequência heteróloga foi mutada para impedir a ciclização dessa região durante a replicação do RNA viral. Esta estratégia apresentou-se extremamente eficiente para a construção de genomas infecciosos estáveis expressando genes repórteres, desta forma, uma estratégia similar será empregada para a inserção de genes repórteres no contexto dos genomas infecciosos do DENV-1.

### **Caracterização funcional das mutações na proteína NS3 do DENV-1**

Neste trabalho, descrevemos a expressão funcional do domínio helicase da proteína NS3 (resíduos de aminoácido 169 a 619) do DENV-1 FGA/89 e de sete variantes do complexo funcional NS2B<sub>47</sub>NS3 do DENV-1 (NS2B<sub>47</sub>NS3 FGA/89, NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>209Mut</sub>, NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>435Mut</sub>, NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>480Mut</sub>, NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>209/480Mut</sub>, NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>200Mut</sub> e NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>135Mut</sub>). A fração eluída das proteínas recombinantes NS2B<sub>47</sub>NS3 apresentou, além da proteína de massa molecular esperada (aproximadamente 79 kDa), uma proteína específica com peso molecular mais alto, de aproximadamente 90 kDa. Shiryayev et al., 2007, utilizando um sistema de expressão e purificação similar ao que utilizamos, observaram um padrão de bandas similar na obtenção da proteína recombinante NS2B<sub>45</sub>NS3 de WNV. Nós especulamos que a inserção de um único códon de terminação após a sequência que codifica para a proteína NS3 não tenha sido suficiente para promover uma terminação da transcrição de forma eficiente, afetando a acurácia da terminação da tradução. Assim, algumas moléculas podem ter sido traduzidas além do códon de terminação, expressando o *tag* C-terminal hexahistidina, conforme evidenciado pela técnica de *western blotting* reagido com anticorpo monoclonal anti-histidina C-terminal (Figura 4.37). Todas as variantes da proteína NS2B<sub>47</sub>NS3 apresentaram atividade autoproteolítica, como demonstrado nos géis SDS-PAGE pela presença de uma banda de aproximadamente de 18 kDa que corresponde ao sítio de clivagem interna da proteína NS3; exceto a proteína controle NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>135Mut</sub> que

apresentou-se totalmente resistente a autoproteólise.

Os ensaios de atividade proteolítica das NS2B<sub>47</sub>NS3 recombinantes, utilizando como substrato o hexa-peptídeo FRET referência (AKRR↓SQ), correspondente ao sítio de clivagem de reconhecimento da protease dos DENV, revelaram que as proteínas contendo as mutações nas posições NS3<sub>209</sub>, NS3<sub>435</sub>, NS3<sub>480</sub> e NS3<sub>209</sub>/NS3<sub>480</sub> não diferem da proteína selvagem (NS2B<sub>47</sub>NS3 FGA/89) quanto à especificidade e clivagem do substrato. A proteína NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>200Mut</sub> (mutação que inativa a atividade ATPase da proteína) apresentou baixa eficiência catalítica, determinada pelos valores de  $k_{cat}/K_m$ , com alta afinidade ao substrato ( $K_m$ ), porém, baixo *turnover* da enzima ( $k_{cat}$ ). Uma possibilidade seria que a substituição Lys/Ala na posição 200 da proteína NS3<sub>hel</sub> poderia alterar a conformação espacial da proteína quimérica e, assim, reduzir a eficiência de clivagem do substrato. A inclusão da proteína NS2B<sub>47</sub>NS3<sub>135Mut</sub>, que continha uma substituição de aminoácido na tríade catalítica do domínio protease que a impedia a catálise de substratos peptídicos sintéticos, não apresentou atividade e excluiu a possibilidade de eventuais proteases contaminantes. Recentemente, Condotta et al. (2010) descreveram um interessante método para estudos de atividade proteolítica da NS2BNS3 do WNV na célula hospedeira, utilizando substratos fluorescentes ancorados nas membranas do RE. Embora a quantificação dos produtos não possa ser realizada de forma direta, essa abordagem permite avaliar a habilidade proteolítica das enzimas em ambiente fisiológico.

Os ensaios de atividade ATPase demonstraram que a proteína NS2B<sub>47</sub>NS3 FGA/89 apresenta maior capacidade de hidrólise de ATP do que apenas o domínio helicase da NS3, o que sugere o papel regulatório do domínio protease para a atividade NTPase/Helicase, tal como demonstrado em estudos anteriores. Xu et al. (2005) demonstraram que a proteína NS3 inteira apresenta maior atividade ATPase em comparação a habilidade do domínio helicase da proteína NS3 (resíduos de aminoácidos 171-618) hidrolisar ATP. Luo et al. (2008) analisaram a estrutura atômica da proteína NS2BNS3 do DENV-4 e demonstraram que o *linker* polipeptídico flexível, que compreende os resíduos de aminoácidos 160 a 179, apresenta um papel importante na associação do domínio protease com os subdomínios I e II do domínio helicase da NS3. E que a interação entre os dois domínios contribui para o aumento das atividades catalíticas de NTPase e helicase

da proteína NS3 *in vitro*. Os autores propõem que resíduos básicos localizados na superfície do domínio protease apresentam alta afinidade por nucleotídeos e poderiam participar da ligação ao RNA e modular as atividades NTPase/ helicase da NS3. Frick et al. (2004) sugerem que o domínio protease da proteína NS3 de HCV é essencial para a processividade da enzima e que a rotação do domínio protease, a qual parece ocorrer durante a replicação viral, poderia influenciar a atividade catalítica de ATPase/helicase da proteína helicase do HCV, e, portanto, a replicação viral.

Os nossos resultados demonstram que a atividade da proteína recombinante NS2B<sub>47</sub>NS3 é modestamente estimulada pelas concentrações crescentes de ATP e RNA dupla fita *overhang* e que o excesso dessas moléculas em solução reduzem a atividade ATPase da proteína. Frick et al. (2004) demonstrou que o excesso de ácido nucléico inibe a atividade helicase da proteína NS3 do HCV, que atua como uma armadilha (*trap*) enzimática, que sequestra o excesso de helicase não ligado ao substrato de RNA. A comparação da atividade ATPase das proteínas recombinantes NS2B<sub>47</sub>NS3, utilizando as concentrações ótimas de ATP e substrato de RNA, demonstra que as substituições LeuNS3<sub>435</sub>Ser ou LeuNS3<sub>480</sub>Ser parecem não afetar a habilidade dessas proteínas hidrolisar ATP em ensaios *in vitro*. A substituição ValNS3<sub>209</sub>Ile parece ter um leve efeito negativo na modulação da atividade ATPase em relação a proteína parental.

Conjuntamente, os resultados mostram que as mutações em estudo parecem não desempenhar *per se* papel na modulação das atividades catalíticas de protease e ATPase *in vitro*. A predição da localização das mutações nas posições NS3<sub>435</sub> e NS3<sub>480</sub> na estrutura tridimensional da proteína NS3 do DENV-2 sugerem que ambas as mutações mapeiam em um domínio hidrofóbico da proteína que possivelmente representaria uma região de interação com componentes virais ou da célula hospedeira. Por conseguinte, é provável que as substituições Leu/Ser que mapeiam no subdomínio II da porção helicase da proteína NS3, no topo da estrutura de  $\beta$ -*hairpin*, possam provocar mudanças nas interações da proteína, e desta forma, alterar a atividade do complexo de replicação (CR) e ocasionar mudanças no fenótipo viral. Diversos estudos demonstraram por ensaios de imunocolocalização e fracionamento celular a associação da proteína NS3 com as proteínas não estruturais NS5 (KAPOOR et al., 1995; CHEN et al., 1997) NS1, NS2B, NS2A,

NS4A, NS5 e com o RNA viral no complexo de replicação durante a infecção na célula hospedeira (WESTAWAY et al., 1997; MACKENZIE et al., 1998). A relevância biológica dessas interações para a replicação viral não está totalmente esclarecida, no entanto, é sabido que a interação NS3/NS5 estimula a atividade NTPase e RTPase da NS3 (YON et al., 2005) e que a interação NS3/NS4B resulta na dissociação da NS3 com o RNA simples fita e conseqüentemente aumenta sua atividade helicase (UMAREDDY et al., 2006); tanto a NS5 como a NS4B interagem com a porção C-terminal da proteína NS3 (a partir do resíduo de aminoácido da posição 300), no entanto, os determinantes estruturais dessas interações não são conhecidos.

No presente estudo, nós demonstramos que as mutações nas posições NS3<sub>435</sub> e NS3<sub>480</sub> estão envolvidas com o aumento da síntese de RNA viral e tradução de proteínas viras na célula hospedeira. De acordo com os resultados obtidos, podemos supor que embora as mutações na NS3 não estejam diretamente envolvidas na modulação da atividade catalítica de NTPase, um aumento na concentração dessa proteína durante a replicação viral na célula hospedeira poderia contribuir, dentre outros aspectos, para modular a eficiência de replicação através do aumento proporcional da hidrólise de ATP e conseqüente utilização dessa energia para promover a translocação do RNA viral ou desnaturação da dupla fita transiente de RNA e, dessa forma, contribuir para o aumento do *fitness* viral.

### **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra a proteína NS3<sub>hel</sub> para o estudo de mutações pontuais na proteína NS3 do DENV-1**

Os três mAbs produzidos e caracterizados neste trabalho diferem quanto a especificidade de ligação a proteína NS3 nativa dos DENV: o mAb 1281-2D reconhece um epítopo comum aos DENV-1 e DENV-4; o mAb 1402-1B reconhece apenas a proteína NS3 do DENV-1 e o mAb 1722-7B reconhece um epítopo comum aos 3 sorotipos do DENV (DENV-1 a 3). O alinhamento entre as sequências dos DENV 1-4, utilizados para os estudos de caracterização dos mAb, nos permitiu identificar algumas regiões conservadas e variáveis entre os DENV e supor alguns possíveis epítopos lineares candidatos para a ligação dos mAbs obtidos. A região NS3<sub>465-470</sub> é altamente variável entre os quatro sorotipos do DENV e constitui um



forte candidato para o reconhecimento pelo mAb 1402-1B que reconhece apenas a proteína NS3 do DENV-1. Tian et al. (2013) descreveram recentemente o desenvolvimento de um anticorpo monoclonal neutralizante que reconhece os resíduos 469-476 da proteína NS3 do DENV-2. Outra região potencial compreende os resíduos de aminoácidos NS3<sub>168-188</sub> que é distinta entre os 4 sorotipos. A região NS3<sub>268-274</sub> é uma região conservada entre os 3 sorotipos do DENV e poderia constituir o epítopo de ligação do mAb 1722-7B que reconhece a proteína NS3 dos DENV1-3, mas não do DENV-4. Através dos ensaios de *western blotting* a partir de gel desnaturante contendo o lisado celular de células infectadas com o DENV-1 podemos inferir que os mAbs 1402-1B e 1722-7B reconhecem epítomos de ligação não conformacionais.

Os anticorpos monoclonais específicos para a proteína NS3 do DENV aqui apresentados poderão ser utilizados em uma gama de aplicações para facilitar o estudo da replicação dos DENV, incluindo a detecção específica da proteína NS3 em células infectadas, estudos e colocalização, imunoenaios e ensaios de co-precipitação.

## 6 CONCLUSÃO

- Através da utilização da tecnologia de genética reversa foi possível introduzir as mutações detectadas em duas variantes virais neurovirulentas em um outro contexto genético e reproduzir o fenótipo de neuropatogênese *in vivo* e alterar de forma significativa o *fitness* viral em diferentes substratos celulares. O DENV-1 recombinante triplo mutante, contendo a combinação das mutações E<sub>402</sub>, NS3<sub>209</sub> e NS3<sub>480</sub>, replica-se eficientemente no cérebro e medula espinhal de camundongos neonatos, produz altas taxas de progênie viral e induz a expressão de genes relacionados à resposta imune inata, culminando na doença e mortalidade dos animais;
- As mutações E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub> isoladas não aumentam a habilidade infectiva dos DENV-1 recombinantes *in vivo* e *in vitro*, porém combinadas com as mutações nas proteínas NS3 desempenham papel importante na modulação do *fitness* viral nestes modelos de estudo, evidenciando o efeito sinérgico das mutações;
- As mutações E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub> não modificam a afinidade do DENV-1 recombinante pelos receptores das células Neuro 2a, mas desempenham papel importante na inibição do CPE em cultura de célula humana e de inseto;
- Através da tecnologia de genomas quiméricos infecciosos de flavivírus (dengue/febre amarela) foi possível confirmar o envolvimento das mutações nas posições E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub> na inibição da formação de sincício em cultura de células de inseto infectadas com os DENV-1 recombinantes;
- As mutações NS3<sub>435</sub> e NS3<sub>480</sub> constituem os determinantes de virulência mais importantes do DENV-1, conferindo maior habilidade replicativa e capacidade de produção de partículas virais infecciosas em modelo murino e em modelo de infecção de células primárias humanas de linhagem hematopoiética;
- A replicação dos DENV-1 vBAC-NS3<sub>435</sub> e vBAC-NS3<sub>480</sub> induz modulação positiva dos genes TLR3/7 em mdDCs humanas. No entanto, os vírus parental e mutantes induzem baixos níveis de expressão de IFN-I em mdDCs humanas, sugerindo que os DENV-1 recombinantes podem modular a resposta imune da célula hospedeira para estabelecer uma infecção mais produtiva.

- As mutações NS3<sub>209</sub>, NS3<sub>435</sub> e NS3<sub>480</sub> parecem não afetar diretamente as atividades ATPase e protease da proteína NS2B<sub>47</sub>NS3 *in vitro*;
- Anticorpos monoclonais contra proteína NS3<sub>hel</sub> foram produzidos e caracterizados. Os anticorpos monoclonais gerados diferem quanto à especificidade de reconhecimento da proteína NS3 dos DENV;
- Replicons subgenômicos do DENV-1 contendo as mutações na proteína NS3 foram gerados e foram capazes de replicar tanto em células de linhagem celular quanto em células primárias humanas. As mutações NS3<sub>435</sub> e NS3<sub>480</sub> conferem maior habilidade replicativa também em um sistema subgenômico do DENV-1.

## 7. PERSPECTIVAS

- Realizar estudos complementares sobre o papel das mutações E<sub>402</sub> e E<sub>405</sub> no processo de inibição de fusão em culturas celulares, avaliando a habilidade dos vírus recombinantes exporem o peptídeo de fusão e ocasionar CPE na célula hospedeira;
- Determinar as interações moleculares das proteínas NS3 com as mutações, LeuNS3<sub>435</sub>Ser e LeuNS3<sub>480</sub>Ser, com outras proteínas do complexo de replicação ou fatores celulares através de ensaios de co-immunoprecipitação e *pull-down*;
- Determinar o mecanismo pelo qual as mutações NS3<sub>435</sub> e NS3<sub>480</sub> conferem maior habilidade replicativa ao DENV-1 através de ensaios de atividade proteolítica das variantes da proteína NS2B<sub>47</sub>NS3, utilizando peptídeos sintéticos específicos do DENV-1, e ensaios de atividade RNA helicase *in vitro*;
- Realizar a caracterização biofísica e estrutural dos complexos associados à proteína NS3;
- Realizar a caracterização funcional do papel da via de sinalização de IFN no curso da infecção com os DENV-1 recombinantes e avaliar o potencial mecanismo de evasão da resposta imune dos DENV-1 em mdDCs humanas;
- Inserir genes repórteres nos clones infecciosos e replicons subgenômicos do DENV-1 para facilitar os estudos de caracterização dos determinantes genéticos de virulência do DENV-1;
- Realizar estudos de infecção em mosquitos com os vírus recombinantes para avaliar o papel das mutações neste sistema.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, S.; MAESTRE, A. M.; PAGNI, S.; PATEL, J. R.; SAVAGE, T.; GUTMAN, D.; MARINGER, K.; BERNAL-RUBIO, D.; SHABMAN, R. S.; SIMON, V.; RODRIGUEZ-MADOZ, J. R.; MULDER, L. C.; BARBER, G. N.; FERNANDEZ-SESMA, A. DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human STING. **PLoS Pathog.** v. 8, n. 10, p. e1002934, 2012.
- ALCARAZ-ESTRADA, S.L.; YOCUPICIO-MONROY, M.; DEL ANGEL, R. M.. Insights into dengue virus genome replication. **Future Virology.** v. 5, n. 5, p. 575-92, 2010.
- ALCON-LEPODER, S.; DROUET, M. T.; ROUX, P.; FRENKEL, M. P.; ARBORIO, M.; DURAND-SCHNEIDER, A. M.; MAURICE, M.; LE BLANC, I.; GRUENBERG, J.; FLAMAND, M. The secreted form of dengue virus nonstructural protein NS1 is endocytosed by hepatocytes and accumulates in late endosomes: implications for viral infectivity. **J Virol**, v.79, n.17, p.11.403-11, 2005.
- ALEN, M. M.; SCHOLS, D. Dengue virus entry as target for antiviral therapy. **J Trop Med.** v. , p. 628475-88, 2012.
- ALEN, M.M., KAPTEIN, S.J., DE BURGHGRAEVE, T., BALZARINI, J., NEYTS, J., SCHOLS, D. Antiviral activity of carbohydrate-binding agents and the role of DC-SIGN in dengue virus infection. **Virology.** v. 387, n. 1, p. 67–75, 2009.
- ALLISON, S. L.; SCHALICH, J.; STIASNY, K.; MANDL, C. W. & HEINZ F.X. Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. **Journal of Virology**, v. 75, p. 4268-4275, 2001.
- ALLISON, S. L.; STIASNY, K.; STADLER, K.; MANDL, C.W.; HEINZ, F. X. Mapping of functional elements in the stem-anchor region of tick-borne encephalitis virus envelope protein E. **J. Virol.**, v. 73, n. 7, p. 5.605-12, 1999.
- ALVAREZ, D. E.; DE LELLA EZCURRA, A. L.; FUCITO, S.; GAMARNIK, A. V. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. **Virology.** v.339, n.2, p.200-12, 2005.
- AMBROSE, R.L.; MACKENZIE, J.M. West Nile virus differentially modulates the unfolded protein response to facilitate replication and immune evasion. **J Virol.** v.85, n.6, p. 2723-32, 2011.
- AMIT, I.; GARBER, M.; CHEVRIER, N.; LEITE, A. P.; DONNER, Y.; EISENHAURE, T.; GUTTMAN, M.; GRENIER, J. K.; LI, W.; ZUK, O.; SCHUBERT, L. A.; BIRDITT, B.; SHAY, T.; GOREN, A.; ZHANG, X.; SMITH, Z.; DEERING, R.; MCDONALD, R. C.; CABILI, M.; BERNSTEIN, B. E.; RINN, J. L.; MEISSNER, A.; ROOT, D. E.; HACOEN, N.; REGEV, A. Unbiased reconstruction of a mammalian transcriptional network mediating pathogen responses. **Science.** v.326, n.5950, p.257-63, 2009.

APPLEBY TC, ANDERSON R, FEDOROVA O, PYLE AM, WANG R, LIU X, BRENDZA KM, SOMOZA JR. Visualizing ATP-dependent RNA Translocation by the NS3 Helicase from HCV. **J Mol Biol.** v. 405, n. 5, p.1139–53, 2011.

ARAÚJO, F. M.; ARAÚJO, M. S.; NOGUEIRA, R. M.; BRILHANTE, R. S.; OLIVEIRA, D. N.; ROCHA, M. F.; CORDEIRO, R. A.; ARAÚJO, R. M.; SIDRIM, J. J. Central nervous system involvement in dengue: a study in fatal cases from a dengue endemic area. **Neurology.** v. 78, n. 10, p. 736-42, 2012.

ARAUJO, M. C.; MELO, R. L.; CESARI, M. H.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L. CARMONA, A. K. Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. **Biochemistry.** v. 39, n. 29, p. 8519-25, 2000.

ASHOUR, J.; LAURENT-ROLLE, M.; SHI, P. Y.; GARCIA-SASTRE, A. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. **J Virol.** v.83, p.5408–5418, 2009.

ASSENBERG, R.; MASTRANGELO, E.; WALTER, T. S.; VERMA, A.; MILANI, M.; OWENS, R. J.; STUART, D. I.; GRIMES, J. M.; MANCINI, E. J. Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. **J Virol.** v.83, n.24, p.12895-906, 2009.

AVIRUTNAN, P.; PUNYDEE, N.; NOISAKRAN, S.; KOMOLTRI, C.; THIEMMECA, S.; AUETHAVORNANAN, K.; JAIRUNGSRI, A.; KANLAYA, R.; TANGTHAWORNCHAIKUL, N.; PUTTIKHUNT, C. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for nonstructural viral protein NS1 and complement. **J Infect Dis,** v.193, p.1078-88, 2006.

BARGIELOWSKI I, NIMMO D, ALPHEY L, KOELLA JC. Comparison of life history characteristics of the genetically modified OX513A line and a wild type strain of *Aedes aegypti*. **PLoS One.** v. 6, n. 6, p. 20.699-706, 2011.

BARNES, W.J.; ROSEN, L. Fatal hemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a Pacific island. **Am J Trop Med Hyg.** v. 23, n. 3, p. 495-506, 1974.

BENARROCH, D.; SELISKO, B.; LOCATELLI, G. A.; MAGA, G.; ROMETTE, J. L.; CANARD, B. The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of dengue virus protein NS3 are Mg<sup>2+</sup> - dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core. **Virology.** v. 328, p. 208-18, 2004.

BONALDO, M. C.; MELLO, S. M.; TRINDADE, G. F.; RANGEL, A. A.; DUARTE, A. S.; OLIVEIRA, P. J.; FREIRE, M. S.; KUBELKA, C. F.; GALLER, R. Construction and characterization of recombinant flaviviruses bearing insertions between E and NS1 genes. **Virol J.** v. 4, p.115, 2007.

BORBA, L. de. **Dengue: Caracterização de marcadores moleculares de virulência utilizando a tecnologia de genomas infecciosos.** Tese (Doutorado em

Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

BORBA, L., DE; STROTTMANN, D. M.; NORONHA, L. DE, MASON, P. W., DUARTE DOS SANTOS, C.N. Synergistic Interactions between the NS3hel and E Proteins Contribute to the Virulence of Dengue Virus Type 1. **Plos Neg. Trop Disease.** v. 6, n.4, p.e1624, 2012.

BORDIGNON, J.; PROBST, C.M.; MOSIMANN, A.L.P.; PAVONI, D.P.; STELLA, V.; BUCK, G.A.; SATPROEDPRAI, N.; FAWCETT, P.; ZANATA, S.M.; DE NORONHA, L.; KRIEGER, M.A.; DUARTE DOS SANTOS, C.N. Expression profile of interferon stimulated genes in central nervous system of mice infected with dengue virus Type-1. **Virology**, v.377, p.319–329, 2008.

BORDIGNON, J.; STROTTMAN, D.M.; MOSIMANN, A.L.P.; PROBST, C.M.; STELLA, V.; NORONHA, L.; ZANATA, S.M.; DUARTE DOS SANTOS, C.N. Dengue Neurovirulence in Mice: Identification of Molecular Signatures in E and NS3 Helicase Domains. **Journal of Medical Virology**, v. 79, n. 10, p. 1506-1517, 2007.

BOWIE AG, UNTERHOLZNER L. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. **Nat Rev Immunol.** v. 8, n. 12, p. 911-22, 2008.

BOZZA, F.A.; CRUZ, O.G.; ZAGNE, S.M.; AZEREDO, E.L.; NOGUEIRA, R.M.; ASSIS, E. F.; BOZZA, P. T.; KUBELKA, C. F. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. **BMC Infect Dis.** v. 8, n.86 , 2008.

BRAULT, A. C.; HUANG, C. Y.; LANGEVIN, S. A.; KINNEY, R. M.; BOWEN, R. A.; RAMEY, W. N.; PANELLA, N. A.; HOLMES, E. C.; POWERS, A. M.; MILLER, B. R. A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. **Nat Genet.** v. 39, n. 9, p. 1162-6, 2007.

CARDOSA J.; OOI, M.H.; TIO, P.H.; PERERA, D.; HOLMES, E.C.; BIBI, K. ABDUL MANAP, Z. Dengue virus serotype 2 from a sylvatic lineage isolated from a patient with dengue hemorrhagic Fever. **PLoS Negl Trop Dis.** v.3, n.4, p. 423-28, 2009.

CARNEIRO, A.R.; CRUZ, A.C.; VALLINOTO, M.; MELO, D. D. E. V.; RAMOS, R.T.; MEDEIROS, D.B.; SILVA, E.V.; VASCONCELOS, P.F. Molecular characterisation of dengue virus type 1 reveals lineage replacement during circulation in Brazilian territory. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 107, n. 6, p. 805-12, 2012.

CARPP, L. N.; GALLER, R.; BONALDO, M. C. Interaction between the yellow fever virus nonstructural protein NS3 and the host protein Alix contributes to the release of infectious particles. **Microbes Infect.** v. 13, n. 1, p. 85-95, 2011.

CATTEAU A, KALININA O, WAGNER MC, DEUBEL V, COURAGEOT MP, DESPRÈS P. Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. **Journal of General Virology.** v. 84, p. 2781–93, 2003.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Interactive map of global dengue activity. (<http://www.healthmap.org/dengue/index.php>). Acesso em setembro de 2012.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Locally acquired Dengue-Key West, Florida, 2009-2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v.59, n.19, p.577-81, 2010.

CHAMBERS, T.J.; HAHN, C.S.; GALLER, R.; RICE, C.M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Ann Rev Microb**, v. 44, p. 649-688, 1990.

CHAMBERS, T.J.; MONATH, T.P. The flaviviruses: structure, replication and evolution. In: **Advances in virus research**. v. 59, 2003.

CHANG, T. H.; CHEN, S. R.; YU, C. Y.; LIN, Y. S.; CHEN, Y. S.; KUBOTA, T.; MATSUOKA, M.; LIN, Y. L. Dengue virus serotype 2 blocks extracellular signal-regulated kinase and nuclear factor- $\kappa$ B activation to downregulate cytokine production. **PLoS One**. v. 7, n. 8, e41635, 2012.

CHANPRAPAPH S, SAPARPAKORN P, SANGMA C, NIYOMRATTANAKIT P, HANNONGBUA S, ANGSUTHANASOMBAT C, KATZENMEIER G. Competitive inhibition of the dengue virus NS3 serine protease by synthetic peptides representing polyprotein cleavage sites. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 330, n. 4, p.1237-46, 2005.

CHATURVEDI, U.C.; DHAWAN, R.; KHANNA, M.; MATHUR, A. Breakdown of the blood-brain barrier during dengue virus infection of mice. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 859-66, 1991.

CHATURVEDI, U.C.; ELBISHBISHI, E.A.; AGARWAL, R.; RAGHUPATHY, R.; NAGAR, R.; TANDON, R.; PACSA, A.S.; YOUNIS, O.I.; AZIZIEH, F. Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. **Journal of Medical Virology**, v. 59, p. 335-340, 1999.

CHATURVEDI, U.C.; SHRIVASTAVA, R.; NAGAR, R. Dengue vaccines: problems and prospects. **Indian J Med Res**. v. 121, n.5, p. 639-52, 2005.

CHEN, C. J.; KUO, M. D.; CHIEN, L. J.; HSU, S. L.; WANG, Y. M.; LIN, J. H. RNA-protein interactions: involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of Japanese encephalitis virus genomic RNA. **J Virol**. v. 71, p. 3466-3473, 1997.

CHEN, W.; KAWANO, H.; MEN, R.; CLARK, D.; LAI, C.J. Construction of Intertypic Chimeric Dengue Viruses Exhibiting Type 3 Antigenicity and Neurovirulence for Mice. **J Virol**, v. 69, n. 8, p. 5186-90, 1995.

CHIEN, J.; ONG, A.; LOW, S. Y. An unusual complication of dengue infection. **Singapore Med J**. v. 49, n. 12, p. 340-2, 2008.

CHOW, V. T.; SEAH, C. L.; CHAN, Y. C. Use of NS3 consensus primers for the polymerase chain reaction amplification and sequencing of dengue viruses and other flaviviruses. **Arch Virol**. v.133, n.1-2, p.157-70, 1993.



CHU, J.J., YANG, P.L. c-Src protein kinase inhibitors block assembly and maturation of dengue virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 104, n. 9, p. 3520–25, 2007.

CLEAVES, G. R.; RYAN, T. E.; SCHLESINGER, R. W. Identification and characterization of type 2 dengue virus replicative intermediate and replicative form RNAs. **Virology**. v.111, n.1, p.73-83,1981.

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**. v.80, n.5, p.2170-82, 2006.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **J Virol**. v.80, n.23, p.11418-11431, 2006.

COLE, G. A.; WISSEMAN, C. L. Jr. Pathogenesis of type 1 dengue virus infection in suckling, weanling and adult mice. 1. The relation of virus replication to interferon and antibody formation. **Am J Epidemiol**, v. 89, n. 6, p. 669-80, 1969.

COLOGNA R, ARMSTRONG PM, RICO-HESSE R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. **J Virol**. v. 79, n. 2, p. 853-9, 2005.

CONDOTTA, S. A.; MARTIN, M. M.; BOUTIN, M.; JEAN, F. Detection and in-cell selectivity profiling of the full-length West Nile virus NS2B/NS3 serine protease using membrane-anchored fluorescent substrates. **Biol Chem**. v. 391, n. 5, p. 549-59, 2010.

COURAGEOT, M.P., FRENKIEL, M.P., DOS SANTOS, C.D., DEUBEL, V., DESPRÈS, P. Alphaglucoosidase inhibitors reduce dengue virus production by affecting the initial steps of virion morphogenesis in the endoplasmic reticulum. **J Virol**. v. 74, n. 1, p. 564–72, 2000.

DEJNIRATTISAI, W.; DUANGCHINDA, T.; LIN, C.L.; VASANAWATHANA, S.; JONES, M.; JACOBS, M.; MALASIT, P.; XU, X.N.; SCREATON, G.; MONGKOLSAPAYA, J. A complex interplay among virus, dendritic cells, T cells, and cytokines in dengue virus infections. **J Immunol**. v. 181, n. 9, p. 5865-74, 2008.

DEJNIRATTISAI, W.; JUMNAINSONG, A.; ONSIRISAKUL, N.; FITTON, P.; VASANAWATHANA, S.; LIMPITIKUL, W.; PUTTIKHUNT, C.; EDWARDS, C.; DUANGCHINDA, T.; SUPASA, S.; CHAWANSUNTATI, K.; MALASIT, P.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. **Science**. v. 328, n. 5979, p. 745-8, 2010.

DENG, J.; LI, N.; LIU, H.; ZUO, Z.; LIEW, O. W.; XU, W.; CHEN, G.; TONG, X.; TANG, W.; ZHU, J.; ZUO, J.; JIANG, H.; YANG, C. G.; LI, J.; ZHU, W. Discovery of novel small molecule inhibitors of dengue viral NS2B-NS3 protease using virtual screening and scaffold hopping. **J Med Chem**. v.55, n.14, p.6278-93, 2012.

DE-OLIVEIRA-PINTO, L.M.; MARINHO, C.F.; POVOA, T.F.; DE AZEREDO, E.L.; DE SOUZA, L.A.; BARBOSA, L.D.; MOTTA-CASTRO, A.R.; ALVES, A.M.; ÁVILA, C.A.;

DE SOUZA, L.J.; DA CUNHA, R.V.; DAMASCO, P.V.; PAES, M.V.; KUBELKA, C.F. Regulation of inflammatory chemokine receptors on blood T cells associated to the circulating versus liver chemokines in dengue fever. **PLoS One**. v. 7, n. 7, p. e38527, 2012.

DESPRÈS P.; FRENKIEL M.P.; CECCALDI P.E.; DUARTE DOS SANTOS C.N.; DEUBEL V. Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent dengue viruses. **J Virol**. v.72, p.823–829, 1998.

DESPRÈS P.; FRENKIEL, M. P.; DEUBEL, V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. **Virology**. v. 196, n. 1, p.209-19, 1993.

DING, S. C.; PYLE, A. M. Molecular mechanics of RNA translocases. **Methods Enzymol**. v. 511, p. 131-47, 2012.

DOMINGUES, R. B.; KUSTER, G. W.; ONUKI-CASTRO, F. L.; SOUZA, V. A.; LEVI, J. E.; PANNUTI, C. S. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. **J Neurol Science**, v.267, n.1-2, p.36-40, 2008.

DONG H, ZHANG B, SHI PY. Flavivirus methyltransferase: a novel antiviral target. **Antiviral Res**. v. 80, n. 1, p. 1-10, 2008.

DUANGCHINDA, T.; DEJNIRATTISAI, W.; VASANAWATHANA, S.; LIMPITIKUL, W.; TANGTHAWORNCHAIKUL, N.; MALASIT, P.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 107, n. 39, p. 16922-7, 2010.

DUARTE DOS SANTOS, C. N.; FRENKIEL, M. P.; COURAGEOT, M. P.; ROCHA, C. F.; VAZEILLE-FALCOZ, M. C.; WIEN, M. W.; REY, F. A.; DEUBEL, V.; DESPRÈS, P. Determinants in the envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. **Virology**. v. 274, n. 2, p. 292-308, 2000.

DUARTE DOS SANTOS,C.N.; ROCHA,C.F.; CORDEIRO,M.; FRAGOSO,S.P.; REY,F.; DEUBEL,V.; DESPRÈS, P. Genome analysis of dengue type-1 virus isolated between 1990 and 2001 in Brazil reveals a remarkable conservation of the structural proteins but amino acid differences in the non-structural proteins. **Virus Res**, v.90, n.1-2, p.197-205, 2002.

EGLOFF, M.P.; BENARROCH, D.; SELISKO, B.; ROMETTE, J.L. CANARD, B. An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. **EMBO J**. v. 21, n. 11, p. 2757-68, 2002.

ERBEL, P.; SCHIERING, N.; D'ARCY, A.; RENATUS, M.; KROEMER, M.; LIM, S. P.; YIN, Z.; KELLER, T. H.; VASUDEVAN, S. G.; HOMMEL, U. Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. **Nature Structural & Molecular Biology**. v. 13, p.372 – 73, 2006.

FALCONAR, A.K.I. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesion Proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. **Arch Virol**, v.142, p.897-916, 1997.

FALGOUT, B.; PETHEL, M.; ZHANG, Y.M.; LAI, C.J. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of Dengue virus nonstructural proteins. **J. Virol.** v. 65, p. 2.467–475, 1991.

FLAMAND, M.; MEGRET, F.; MATHIEU, M.; LEPAULT, J.; REY, F.A.; DEUBEL, V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosilation-dependent fashion. **J Virol**, v.73, n.7, p.6104-10, 1999.

FLINT, S. J., ENQUIST, L. W., RACANIELLO, V. R. E SKALKA, A. M. **ASM Press, USA**. Principles of Virology – Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses, 2<sup>a</sup> Edição, 2004.

FRANCO L.; PALACIOS, G.; MARTINEZ, J.A.; VÁZQUEZ, A.; SAVJI, N.; DE ORY, F.; SANCHEZ-SECO, M.P.; MARTÍN, D.; LIPKIN, W.I.; TENORIO, A. First Report of Sylvatic DENV-2-Associated Dengue Hemorrhagic Fever in West Africa. **PLoS Negl Trop Dis.** v.5, n.8, p.1.251-58, 2011.

FREDERICKSEN, B. L.; GALE, M., JR. West Nile virus evades activation of interferon regulatory factor 3 through RIG-I-dependent and -independent pathways without antagonizing host defense signaling. **J. Virol.** v. 80, p. 2913–2923, 2006.

FRICK, D. N.; RYPMA, R. S.; LAM, A. M.; GU, B. The nonstructural protein 3 protease/helicase requires an intact protease domain to unwind duplex RNA efficiently. **J Biol Chem.** v. 279, n. 2, p.1269-80, 2004.

FRIMAYANTI, N.; CHEE, C.F.; ZAIN, S.M.; RAHMAN, N.A. Design of new competitive dengue ns2b/ns3 protease inhibitors-a computational approach. **Int J Mol Sci.** v. 12, n. 2, p. 1089-100, 2011.

GAO S.; SONG, L.; LI, J.; ZHANG, Z.; PENG, H.; JIANG, W.; WANG, Q., KANG, T.; CHEN, S.; HUANG, W. Influenza A virus-encoded NS1 virulence factor protein inhibits innate immune response by targeting IKK. **Cell Microbiol.** v. 14 n. 12, p.1849-66, 2012.

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

GOLLINS, S. W.; PORTERFIELD, J. S. The uncoating and infectivity of the flavivirus West Nile on interaction with cells: effects of pH and ammonium chloride. **J Gen Virol.** v. 67, n. 9, p. 1941-50, 1986a.

GOLLINS, S.W.; PORTERFIELD, J.S. PH-dependent fusion between the flavivirus West-Nile and liposomal model membranes. **J Gen Virol**, v.67, p.157-66, 1986b.

GORBALENYA, A. E.; DONCHENKO, A. P.; KOONIN, E. V.; BLINOV, V. M. N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. **Nucleic Acids Res.** v.17, n.10, p.3889-97, 1989.

GOULD, E.A.; CLEGG, J.C.S. Growth, Titration and Purification of Togaviruses. *In*: MAHY, B.W.J. (ed). **Virology: a practical approach.** Washington DC: IRL Press. p. 43-78, 1985.

GOUVEA, I. E.; IZIDORO, M. A.; JUDICE, W. A.; CEZARI, M. H.; CALIENDO, G.; SANTAGADA, V.; DOS SANTOS, C. N.; QUEIROZ, M.;H.; JULIANO, M. A.; YOUNG, P. R.; FAIRLIE, D. P. & JULIANO, L. Substrate specificity of recombinant dengue 2 virus NS2B-NS3 protease: influence of natural and unnatural basic amino acids on hydrolysis of synthetic fluorescent substrates. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 457, p. 187–196, 2007.

GRANT D.; TAN, G. K.; QING, M.; NG, J. K.; YIP, A.; ZOU, G.; XIE, X.; YUAN, Z.; SCHREIBER, M. J.; SCHUL, W.; SHI, P. Y.; ALONSO, S. A Single Amino Acid in Nonstructural Protein NS4B Confers Virulence to Dengue Virus in AG129 Mice through Enhancement of Viral RNA Synthesis. **Journal of Virol.** v. 85, n. 15, p. 7775–87, 2011.

GU, M.; RICE, C. M. Three conformational snapshots of the hepatitis C virus NS3 helicase reveal a ratchet translocation mechanism. **PNAS.** p.521–528, 2010.

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

GUBLER, D. J.; REED, D.; ROSEN, L.; HITCHCOCK, J. R. Epidemiologic, clinical, and virologic observations on dengue in the Kingdom of Tonga. **Am J Trop Med Hyg.** v. 27, n. 3, p. 581-9, 1978.

GUIRAKHOO, F.; PUGACHEV, K.; ARROYO, J.; MILLER, C.; ZHANG, Z.X.; WELTZIN, R.; GEORGAKOPOULOS, K.; CATALAN, J.; OCRAN, S.; DRAPER, K.; MONATH, T.P. Viremia and immunogenicity in nonhuman primates of a tetravalent yellow fever-dengue chimeric vaccine: genetic reconstructions, dose adjustment, and antibody responses against wild-type dengue virus isolates. **Virology.** v. 298, n. 1, p. 146-59, 2002.

GUY, B.; BARREREA, B.; MALINOWSKIB, C.; SAVILLE, M.; TEYSSOUC, R.; LANG, J. From research to phase III: Preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. **Vaccine.** v. 29, 7229– 41, 2011.

GUZMÁN, M.G. Thirty years after the Cuban hemorrhagic **dengue** epidemic of 1981. **Medic Rev.** v. 14, n. 2, p. 46-51, 2012.

HALSTEAD, S. Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology. **Science,** v. 239, p. 46-481, 1988.

HALSTEAD, S.B.; NIMMANNITYA, S.; COHEN, S.N. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. **Yale J Biol Med.** v.42, n.5, p.311-28, 1970.

HALSTEAD, S.B.; O'ROURKE, E.J. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 146, n. 1, p. 201-17, 1977.

HAMMOM, W. M.; RUDNICK, A.; SATHER, G. E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of Philippine and Thailand. **Science**, v.131, n.1, p.102-03, 1960.

HEINZ, F.X.; STIASNY, K. Flaviviruses and their antigenic structure. **J Clin Virol.** v. 55, n. 4, p. 289-95, 2012.

HOLDEN, K. L.; STEIN, D. A.; PIERSON, T. C.; AHMED, A. A.; CLYDE, K.; IVERSEN, P. L.; HARRIS, E. Inhibition of dengue virus translation and RNA synthesis by a morpholino oligomer targeted to the top of the terminal 3' stem-loop structure. **Virology.** v. 344, p.439-452, 2006.

HOLMES, E.C.; WOROBEY, M.; RAMBAUT, A. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. **Mol Biol Evol**, v.16, n.3, p.405-9, 1999.

HOTTA, S. Experimental studies on dengue. I. Isolation, identification and modification of the virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v.90, n.1, p.1-9, 1952.

HUANG, C.Y.; BUTRAPET, S.; TSUCHIYA, K.R.; BHAMARAPRAVATI, N.; GUBLER, D.J.; KINNEY, R.M. Dengue PDK-53 virus as a chimeric carrier for tetravalent dengue vaccine development. **J Virol**, v.77, n.21, p.11436-447, 2003.

ICTV Virus Taxonomy. (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>). Acesso em setembro de 2012.

IMRAN, M.; WAHEED, Y.; MANZOOR, S.; BILAL, M.; ASHRAF, W.; ALI, M.; ASHRAF, M. Interaction of Hepatitis C virus proteins with pattern recognition receptors. **Virol J.** v. 9, n. 1, p.126, 2012.

IZIDORO, M. A.; ASSIS, D. M.; OLIVEIRA, V.; SANTOS, J. A.; JULIANO, M. A.; LINDBERG, I.; JULIANO, L. Effects of magnesium ions on recombinant human furin: selective activation of hydrolytic activity upon substrates derived from virus envelope glycoprotein.. **Biol Chem.** v. 391, n.9, p. 1105-12, 2010.

JACKSON, S.T.; MULLINGS, A.; BENNETT, F.; KHAN, C.; GORDON-STRACHAN, G.; RHODEN, T. Dengue infection in patients presenting with neurological manifestations in a dengue endemic population. **West Indian Med J.** v. 57, n. 4, p. 373-6, 2008.

JIANG J.; LUO G. Cell culture-adaptive mutations promote viral protein-protein interactions and morphogenesis of infectious hepatitis C virus. **J Virol.** v. 86, n. 17, p. 8987-97, 2012.

JOHANSSON, M.; BROOKES, A.J.; JANS, D.A.; VASUDEVAN, S.G. A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin- $\beta$  and the viral helicase, NS3. **J Gen Virol**, v.82, p.735-745, 2001.

JONES, C.T.; MA L.; BURGNER, J.W.; GROESCH, T.D.; POST, C.B.; KUHN, R.J. Flavivirus capsid is a dimeric  $\beta$ -helical protein. **J Virol**, v.77, n.12, p.7143-49, 2003.

KADARÉ, G.; HAENNI, A. L. Virus-encoded RNA helicases. **J Virol**. v.71, n.4, p.2583-90,1997.

KAPOOR, M.; ZHANG, L. W.; RAMACHANDRA, M.; KUSUKAWA, J.; EBNER, K. E.; PADMANABHAN, R. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. **J Biol Chem**. v. 270, p.19100-106, 1995.

KAPTEIN, S. J.; DE BURGHGRAEVE, T.; FROEYEN, M.; PASTORINO, B.; ALEN, M. M.; MONDOTTE, J. A.; HERDEWIJN, P.; JACOBS, M.; DE LAMBALLERIE, X.; SCHOLS, D.; GAMARNIK, A. V.; SZTARICKAI, F.; NEYTS, J. A Derivate of the Antibiotic Doxorubicin Is a Selective Inhibitor of Dengue and Yellow Fever Virus Replication in vitro. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 54, n. 12, p. 5269-5280, 2010.

KAWANO, H.; ROSTAPSHOV, V.; ROSEN, L.; LAI, C.J. Genetic Determinants of Dengue Type 4 Virus Neurovirulence for Mice. **J Virol**, v. 67, n. 11, p.6567-75, 1993.

KHADKA, S.; VANGELOFF, A. D.; ZHANG, C.; SIDDAVATAM, P.; HEATON, N. S.; WANG, L.; SENGUPTA, R.; SAHASRABUDHE, S.; RANDALL, G.; GRIBSKOV, M.; KUHN, R. J.; PERERA, R.; LACOUNT, D. J.. A physical interaction network of dengue virus and human proteins. **Mol Cell Proteomics**. v. 10, n. 12, 2011.

KHROMYKH, A. A.; WESTAWAY, E. G. Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. **J Virol**. v. 71, n. 2, p. 1497-505, 1997.

KIAT, T.S.; PIPPEN, R.; YUSOF, R.; IBRAHIM, H.; KHALID, N.; RAHMAN, N.A. Inhibitory activity of cyclohexenyl chalcone derivatives and flavonoids of fingerroot, *Boesenbergia rotunda* (L.), towards dengue-2 virus NS3 protease. **Bioorg Med Chem Lett**. v.16, n.12, p.3337-40, 2006.

KIERMAYR, S.; STIASNY, K.; HEINZ, F.X. Impact of Quaternary Organization on the Antigenic Structure of the Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Glycoprotein E. **J Virol**, v.83, n.17, p.8482-8491, 2009.

KING, C. A.; MARSHALL, J. S.; ALSHURAF, H.; ANDERSON, R. Release of vasoactive cytokines by antibody-enhanced dengue virus infection of a human mast cell/basophil line. **J Virol**. v. 74, n. 15, p. 7146-50, 2000.

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

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**. v. 256, n. 5517, p. 495-7, 1975.

KÖHLER, G.; Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**. Vol. 256, 1975.

KOKERNOT, R.H.; SMITHBURN, K.C.; WEINBREN, M.P. Neutralizing antibodies to arthropod-borne viruses in human beings and animals in the Union of South Africa. **J Immunol**. v.77, n.5, p.313-23, 1956.

KOURÍ, G.; MÁŠ, P.; GUZMÁN, M.G.; SOLER, M.; GOYENECHEA, A.; MORIER, L. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: rapid diagnosis of the etiologic agent. **Bull Pan Am Health Organ**. v. 17, n. 2, p.126-32, 1983.

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

KUHN RJ, ZHANG W, ROSSMANN MG, PLETNEV SV, CORVER J, LENCHES E, JONES CT, MUKHOPADHYAY S, CHIPMAN PR, STRAUSS EG, BAKER TS, STRAUSS JH. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation and fusion. **Cell**. v. 108, p. 717–25, 2002.

KUNO, G. Serodiagnosis of flaviviral infections and vaccinations in humans. **Adv Virus Res**. v. 61, p. 3-65, 2003.

KURANE, I.; MATSUTANI, T.; SUZUKI, R.; TAKASAKI, T.; KALAYANAROOJ, S.; GREEN, S.; ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A. T-cell responses to dengue virus in humans. **Trop Med Health**. v. 39, n. 4, p. 45-51, 2011.

KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. **Annu Rev Microbiol**. v. 62, p. 71-92, 2008.

LA RUCHE, G.; SOUARÈS, Y.; ARMENGAUD, A.; PELOUX-PETIOT, F.; DELAUNAY, P.; DESPRÈS, P.; LENGLET, A.; JOURDAIN, F.; LEPARC-OFFART, I.; CHARLET, F.; OLLIER, L.; MANTEY, K.; MOLLET, T.; FOURNIER, J.P.; TORRENTS, R.; LEITMEYER, K.; HILAIRET, P.; ZELLER, H.; VAN BORTEL, W.; DEJOUR-SALAMANCA, D. GRANDADAM, M.; GASTELLU-TCHEGORRY, M. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France. **Euro Surveill**. v.15, n.39, p.19.676-81, 2010.

LE BRETON, M.; MEYNIEL-SCHICKLIN, L.; DELOIRE, A.; COUTARD, B.; CANARD, B.; DE LAMBALLERIE, X.; ANDRE, P.; RABOURDIN-COMBE, C.; LOTTEAU, V.; DAVOUST, N. Flavivirus NS3 and NS5 proteins interaction network: a high-throughput yeast two-hybrid screen. **BMC Microbiol**. v.11, p.234, 2011.

LEARDKAMOLKARN, V.; SIRIGULPANIT, W.; CHOTIWAN, N.; KUMKATE, S.; HUANG, C. Y. Development of Dengue type-2 virus replicons expressing GFP reporter gene in study of viral RNA replication. **Virus Res**. v. 163, n. 2, p. 552-62, 2012.

LEE, C.J., LIN, H.R., LIAO, C.L., LIN, Y.L., Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus. **J. Virol.** v. 82 n. 13, p. 6470–80, 2008.

LEITMEYER, K. C.; VAUGHN, D. W.; WATTS, D. M.; SALAS, R.; VILLALOBOS, I.; DE CHACON RAMOS, C.; RICO-HESSE, R. Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. **J Virol**, v.73, p.4738-47, 1999.

LEUNG, D.; SCRODER, K.; WHITE, H.; FANG, N.; STOERMER, M. J.; ABBENANTE, G.; MARTIN, J.; YOUNG, P. R.; FAIRLIE, D. P. Activity of recombinant dengue 2 virus NS3 protease in the presence of truncated NS2B co-factor, small peptide substrates, and inhibitors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n.49, p.45762-771, 2001.

LI, K.; FOY, E.; FERREON, J. C.; NAKAMURA, M.; FERREON, A. C.; IKEDA, M.; RAY, S. C.; GALE, M. JR.; LEMON, S. M. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease- mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. **Proc. Natl Acad. Sci.USA.** v. 102, p. 2992–2997, 2005.

LI, H.; CLUM, S.; YOU, S.; EBNER, K.E.; PADMANABHAN, R. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. **J Virol.** v. 73, n. 4, p. 3108-16, 1999.

LI, J.; LIM, S. P.; BEER, D.; PATEL, V.; WEN, D.; TUMANUT, C.; TULLY, D. C.; WILLIAMS, J. A.; JIRICEK, J.; PRIESTLE, J. P.; HARRIS, J. L.; VASUDEVAN, S. G. Functional profiling of recombinant NS3 proteases from all four serotypes of dengue virus using tetrapeptide and octapeptide substrate libraries. **J Biol Chem.** v. 280, n. 31, p. 28766-74, 2005.

LI, L.; LOK, S.M.; YU, I.M.; ZHANG, Y.; KUHN, R.J.; CHEN, J.; ROSSMANN, M.G. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. **Science.** v. 319, n. 5871, p. 1830-4, 2008.

LI, X. D.; SUN, L.; SETH, R. B.; PINEDA, G.; CHEN, Z. J. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 102, n. 49, p. 17717-22, 2005a.

LIBRATY, D. H.; PICHYANGKUL, S.; AJARIYAKHAJORN, C.; ENDY, T. P.; ENNIS, F. A. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. **J Virol.** v. 75, n. 8, p. 3501-8, 2001.

LIBRATY, D.H.; YOUNG, P.R.; PICKERING, D.; ENDY, T.P.; KALAYANAROOJ, S.; GREEN, S.; VAUGHN, D.W.; NISALAK, A.; ENNIS, F.A.; ROTHMAN, A.L. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **J Infect Dis.** v. 186, n. 8, p. 1165-8, 2002.



LIMA, M.D.A.R.; NOGUEIRA, R.M.; SCHATZMAYR, H.G.; DOS SANTOS, F.B. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 4, n. 7, p. 738, 2010.

LIN, C.F.; LEI, H.Y.; SHIAU, A.L.; LIU, C.C.; LIU, H.S.; YEH, T.M.; CHEN, S.H.; LIN, Y.S. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. **J Med Virol**. v. 69, n. 1, p. 82-90, 2003.

LIN, S. R.; ZOU, G.; HSIEH, S. C.; QING, M.; TSAI, W. Y.; SHI, P. Y.; WANG, W. K. The helical domains of the stem region of dengue virus envelope protein are involved in both virus assembly and entry. **J Virol**. v. 85, n.10, p. 5159-71, 2011.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. Molecular biology of flaviviruses. In: CHAMBERS, T.J.; MONATH, T.P. **Advances in Virus Research**, The Flaviviruses: Detection, Diagnosis and Vaccine Development, California: Elsevier Academic Press, v. 59, p.235-289, 2003.

LINDENBACH, B.D.; THIEL, H.; RICE, C.M. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**, Flaviviridae: The viruses and their replication, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 5<sup>o</sup>Ed., p. 1101-152, 2007.

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

LIU, W.J.; WANG, X.J.; CLARK, D.C.; LOBIGS, M.; HALL, R.A.; KHROMYKH, A. A. A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice. **J Virol**. v. 80, n. 5, p. 2396-404, 2006.

LODEIRO, M. F.; FILOMATORI, C. V.; GAMARNIK, A. V. Structural and functional studies of the promoter element for dengue virus RNA replication. **J Virol**. v.83, n.2, p.993-1008, 2009.

LOK, S.M., KOSTYUCHENKO, V., NYBAKKEN, G.E., HOLDAWAY, H.A., BATTISTI, A.J., SUKUPOLVI-PETTY, S., SEDLAK, D., FREMONT, D.H., CHIPMAN, P.R., ROHRIG, J.T., DIAMOND, M.S., KUHN, R.J., ROSSMANN, M.G. Binding of a neutralizing antibody to dengue virus alters the arrangement of surface glycoproteins. **Nat. Struct. Mol. Biol**. v.15, n. 3, p. 312–17, 2008.

LONG, H. T.; HIBBERD, M. L.; HIEN, T. T.; DUNG, N. M, VAN NGOC, T.; FARRAR, J.; WILLS, B.; SIMMONS, C.P. Patterns of gene transcript abundance in the blood of children with severe or uncomplicated dengue highlight differences in disease evolution and host response to dengue virus infection. **J Infect Dis**. v. 199, n.4, p. 537-46, 2009.

LOO, Y. M.; OWEN, D. M.; LI, K.; ERICKSON, A. K.; JOHNSON, C. L.; FISH, P. M.; CARNEY, D. S.; WANG, T.; ISHIDA, H.; YONEYAMA, M.; FUJITA, T.; SAITO, T.; LEE, W. M.; HAGEDORN, C. H.; LAU, D. T.; WEINMAN, S. A.; LEMON, S. M.; GALE, M. JR. Viral and therapeutic control of IFN-beta promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 103, p. 6001–06, 2006.

LOZACH, P.Y.; BURLEIGH, L.; STAROPOLI, I.; NAVARRO-SÁNCHEZ, E.; HARRIAGUE, J.; VIRELIZIER, J.L.; REY, F.A.; DESPRÈS, P.; ARENZANASEISDEDOS, F.; AMARA, A. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. **J Biol Chem**, v.280, n.25, p.23698-708, 2005.

LU, P.; BIAN, G.; PAN, X.; XI, Z. Wolbachia induces density-dependent inhibition to dengue virus in mosquito cells. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 6, n. 7, p. 1.754 - 62 , 2012.

LUO, D.; WEI, N.; DOAN, D. N.; PARADKAR, P. N.; CHONG, Y.; DAVIDSON, A. D.; KOTAKA, M.; LESCAR, J.; VASUDEVAN, S. G. Flexibility between the protease and helicase domains of the dengue virus NS3 protein conferred by the linker region and its functional implications. **J Biol Chem**. v.285, n.24, p.18817-27, 2010.

LUO, D.; XU, T.; HUNKE, C.; GRÜBER, G.; VASUDEVAN, S.G.; LESCAR, J. Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. **J Virol**. v. 82, n. 1, p. 173-83, 2008.

MA, L.; JONES, C.T.; GROESCH, T.D.; KUHN, R.J.; POST, C.B. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 101, p. 3414–3419, 2004.

MACKENZIE, J. M.; KHROMYKH, A. A.; JONES, M. K.; WESTAWAY, E. G. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. **Virology**. v. 245, p. 203–15, 1998.

MACKENZIE, J.M.; JONES, M.K.; YOUNG, P.R. Immunolocalization of the Dengue Virus Nonstructural Glycoprotein NS1 Suggests a Role in Viral RNA Replication. **Virology** v. 220, n.1, p. 232–40, 1996.

MALAKHOVA, O. A.; KIM, K. I.; LUO, J. K.; ZOU, W.; KUMAR, K. G.; FUCHS, S. Y.; SHUAI, K.; ZHANG, D. E. UBP43 is a novel regulator of interferon signaling independent of its ISG15 isopeptidase activity. **EMBO Journal**, v. 25, n. 11, p. 2368-67, 2006.

MALAVIGE, G.N.; FERNANDO, S.; FERNANDO, D.J.; SENEVIRATNE, S.L. Dengue Viral Infections. **Postgrad. Med. J.**, v. 80, n. 948, p. 588-601, 2004.

MANGADA, M.M.; ENDY, T.P.; NISALAK, A.; CHUNSUTTIWAT, S.; VAUGHN, D.W.; LIBRATY, D.H.; GREEN, S.; ENNIS, F.A.; ROTHMAN, A. L. Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. **J Infect Dis**. v. 185, n. 12, p. 1697-703, 2002.

MANGADA, M.N.M.; IGARASHI, A. Molecular and in vitro analysis of eight dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. **Virology**, v.244, p.458-66, 1998.

MARKOFF, L.; FALGOUT, B.; CHANG, A. A conserved internal hydrophobic domain mediates the stable membrane integration of the dengue virus capsid protein. **Virology**. v. 233, n. 1, p.105-17, 1997.

MARSILI, G.; REMOLI, A. L.; SGARBANTI, M.; PERROTTI, E.; FRAGALE, A.; BATTISTINI, A. HIV-1, interferon and the interferon regulatory factor system: an interplay between induction, antiviral responses and viral evasion. **Cytokine Growth Factor Rev**. v. 23, n. 4-5, p. 255-70, 2012.

MATEU, G. P.; MARCHEVSKY, R. S.; LIPRANDI, F.; BONALDO, M. C.; COUTINHO, E. S.; DIEUDONNÉ, M.; CARIDE, E. JABOR, A. V.; FREIRE, M. S.; GALLER, R. Construction and biological properties of yellow fever 17D/dengue type 1 recombinant virus. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 101, n. 3, p.289-98, 2007.

MATUSAN, A.E.; PRYOR, M.J.; DAVIDSON, A.D.; WRIGHT, P.J. Mutagenesis of the Dengue virus type 2 NS3 protein within and outside helicase motifs: effects on enzyme activity and virus replication. *J Virol*, v.75, n.20, p.9633-43, 2001.

MAZZAROTTO, G. A.; RABONI, S. M.; STELLA, V.; CARSTENSEN, S.; DE NORONHA, L.; LEVIS, S.; ZANLUCA, C.; ZANETTI, C. R.; BORDIGNON, J.; DUARTE DOS SANTOS, C. N. Production and characterization of monoclonal antibodies against the recombinant nucleoprotein of Araucaria hantavirus. **Virol Methods**. v. 162, n. 1-2, p. 96-100, 2009.

MCLEAN, J. E.; WUDZINSKA, A.; DATAN, E.; QUAGLINO, D.; ZAKERI, Z. Flavivirus NS4A-induced Autophagy Protects Cells against Death and Enhances Virus Replication. **J Biol Chem**. v. 286, n. 25, p. 22147–159, 2011.

MCMINN, P. C. The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. **Gen Virol**. v. 78, n. 11, p. 2711-22, 1997.

MEYLAN, E.; CURRAN, J.; HOFMANN, K.; MORADPOUR, D.; BINDER, M.; BARTENSCHLAGER, R.; TSCHOPP, J. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. **Nature**. v. 437, n. 7062, p. 1167-72, 2005.

MIAGOSTOVICH, M.P.; RAMOS, R.G.; NICOL, A.F.; NOGUEIRA, R.M.; CUZZIMAYA, T.; OLIVEIRA, A.V.; MARCHEVSKY, R.S.; MESQUITA, R.P.; SCHATZMAYR, H.G. Retrospective study on dengue fatal cases. **Clin Neuropathol**, v.16, n.4, p.204-208, 1997.

MILLER, S.; SPARACIO, S.; BARTENSCHLAGER, R. Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. **J Biol Chem**. v. 281,n.13, p. 8854-63, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde, Dengue no Brasil – Informe epidemiológico. Disponível em <http://ebookbrowse.com/incidencia-de-dengue-brasil-1990-2011-21-06-12-pdf-d380272611>. Acesso em setembro de 2012.

MISRA, U. K.; KALITA, J.; SYAM, U. K.; DHOLE, T. N. Neurological manifestations of dengue virus infection. **J Neurol Sci**, v. 244, n. 1, p. 117-122, 2006.

MLADINICH, K. M.; PIASKOWSKI, S. M.; RUDERSDORF, R.; EERNISSE, C. M.; WEISGRAU, K. L.; MARTINS, M. A.; FURLOTT, J. R.; PARTIDOS, C. D.; BREWOO, J. N.; OSORIO, J. E.; WILSON, N. A.; RAKASZ, E. G.; WATKINS, D. I. Dengue virus-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes target NS1, NS3 and NS5 in infected Indian rhesus macaques. **Immunogenetics**. v. 64, n. 2, p.111-21, 2012.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S.C. Structure of the Dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, n. 6972, p.313-19, 2004.

MOREIRA, L.A.; ITURBE-ORMAETXE, I.; JEFFERY, J.A.; LU, G.; PYKE, A.T.; HEDGES, L.M.; ROCHA, B.C.; HALL-MENDELIN; S.; DAY, A.; RIEGLER, M.; HUGO, L.E.; JOHNSON, K.N.; KAY, B.H.; MCGRAW, E.A.; VAN DEN HURK, A.F.; RYAN, P.A.; O'NEILL, S.L. A Wolbachia symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. **Cell**. v. 139, n. 7, p. 1268-78, 2009.

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

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R.J.; ROSSMANN, M.G. A structural perspective of flavivirus life cycle. **Nat Rev Microbiol**, v.3, p.13-22, 2005.

MUÑOZ-JORDAN, J. L.; LAURENT-ROLLE, M.; ASHOUR, J.; MARTINEZ-SOBRIDO, L.; ASHOK, M.; LIPKIN, W. I.; GARCIA-SASTRE, A. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. **Journal of Virology**, v. 79, p. 8004-8013, 2005.

MUÑOZ-JORDÁN, J. L.; SÁNCHEZ-BURGOS, G. G.; LAURENT-ROLLE, M.; GARCÍA-SASTRE, A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 100, n. 24, p. 14333-8, 2003.

MUYLAERT, I.R.; CHAMBERS, T.J.; GALLER, R.; RICE, C.M. Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: Effects on virus replication and mouse neurovirulence. **Virology**. v. 222, n.1, p.159-68, 1996.

NAVARRO-SANCHEZ, E. ; ALTMAYER, R. ; AMARA, A. ; SCHWARTZ, O. ; FIESCHI, F. ; VIRELIZIER, J. L. ; ARENZANA-SEISDEDOS, F. ; DESPRÉS, P. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. **EMBO Rep**. v. 4, n. 7, p. 723-28, 2003.

NG, C. Y.; GU, F.; PHONG, W. Y.; CHEN, Y. L.; LIM, S. P.; DAVIDSON, A.; VASUDEVAN, S.G. Construction and characterization of a stable subgenomic dengue virus type 2 replicon system for antiviral compound and siRNA testing. **Antiviral Res.** v. 76, n.3, p. 222–31, 2007.

NIYOMRATTANAKIT, P.; WINOYANUWATTIKUN, P.; CHANPRAPAPH, S.; ANGSUTHANASOMBAT, C.; PANYIM, S.; KATZENMEIER, G. Identification of residues in the dengue virus type 2 NS2B cofactor that are critical for NS3 protease activation. **J Virol.** v.78, n.24, p.13708-16, 2004.

NOBLE, C. G.; SHE, C. C.; CHAO, A. T.; SHI, P. Y. Ligand-bound structures of the dengue virus protease reveal the active conformation. **J Virol.** v.86, n.1, p.438-46, 2012.

NOGUEIRA, M.B.; STELLA, V.; BORDIGNON, J.; BATISTA, W.C.; BORBA, L.; SILVA, L.H.; HOFFMANN, F.G.; PROBST, C.M.; SANTOS, C.N. Evidence for the co-circulation of dengue virus type 3 genotypes III and V in the Northern region of Brazil during the 2002-2004 epidemics. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v.103, n.5, p.483-8, 2008.

OEHLER, E.; LE HÉNAFF, O.; GHAWCHE, F. Neurological manifestations of dengue. **Presse Med.** v. 41, n. 10, p. 547-52, 2012.

OI, V. T.; VUONG, T. M.; HARDY, R.; REIDLER, J.; DANGLE, J. HERZENBERG, L. A.; STRYER, L. Correlation between segmental flexibility and effector function of antibodies. **Nature.** v. 307, n. 5947, p. 136 – 40, 1984.

OLIPHANT, T., ENGLE, M., NYBAKKEN, G., DOANE, C., JOHNSON, S., HUANG, L., GORLATOV, S., MEHLHOP, E., MARRI, A., CHUNG, K., EBEL, G., KRAMER, L., FREMONT, D., DIAMOND, M. Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. **Nat. Med.** v. 11, n. 5, p. 522–30, 2005.

PAHO - Pan American Health Organization. Dengue e dengue hemorrhagic fever in the Americas: an overview of the problem. **Epidemiol Bull.** v. 13, p. 1-2, 1992.

PARANJAPE, S.M.; HARRIS, E. Control of dengue virus translation and replication. **Curr Top Microbiol Immunol.** v. 338, p. 15-34, 2010.

PASTORINO, B.; NOUGAIREDE, A.; WURTZ, N.; GOULD, E.; DE LAMBALLERIE, X. Role of host cell factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. **Antiviral Res.** v. 87, n. 3, p. 281-94, 2010.

PATEY, O.; OLLIVAUD, L.; BREUIL, J.; LAFAIX, C. Unusual neurologic manifestations occurring during dengue fever infection. **Am J Trop Med Hyg,** v.48, n.6, p.793-802, 1993.

PERERA, R; KUHN, R.J. Structural proteomics of dengue virus. **Curr Opin Microb,** v.11, n.4, p.1-9, 2008.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S.; AHMED, A. A.; VALENTINE, L. E.; DAVIS, C. W.; SAMUEL, M. A.; HANNA, S. L.; PUFFER, B. A.; DOMS, R. W. An infectious West Nile virus that expresses a GFP reporter gene. **Virology**. v. 334, n. 1, p. 28-40, 2005.

PIJLMAN, G. P.; KONDRATIEVA, N.; KHROMYKH, A. A. Translation of the flavivirus kunjin NS3 gene in cis but not its RNA sequence or secondary structure is essential for efficient RNA packaging. **J Virol**. v.80, n.22, p.11255-64, 2006.

POERSCH C.P.O.; PAVONI, DP, QUEIROZ, M.H.; DE BORBA, L.; GOLDENBERG, S.; DOS SANTOS C.N.; KRIEGER, M.A. Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. **J Clin Virol**, p. 32, v. 4, p. 272-77, 2005.

PRYOR, M.J.; CARR, J.M.; HOCKING, H.; DAVIDSON, A.D.; LI, P.; WRIGHT, P.J. Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. **Am J Trop Med Hyg**. v. 65, n. 5, p. 427-34, 2001.

PRYOR MJ, RAWLINSON SM, BUTCHER RE, BARTON CL, WATERHOUSE TA, VASUDEVAN SG, BARDIN PG, WRIGHT PJ, JANS DA, Davidson AD. Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 through its importin alpha/beta-recognized nuclear localization sequences is integral to viral infection. **Traffic**. v.8, n.7, p.795-807, 2007.

PUCCIONI-SOHLER, M.; SOARES, C.N.; PAPAIZ-ALVARENGA, R.; CASTRO, M. J.; FARIA, L. C.; PERALTA, J. M. Neurologic dengue manifestations associated with intrathecal specific immune response. **Neurology**. v. 73, n. 17, p.1413-7, 2009.

PUIG-BASAGOITI, F.; TILGNER, M.; BENNETT, C.J.; ZHOU, Y.; MUÑOZ-JORDÁN, J.L.; GARCÍA-SASTRE, A.; BERNARD, K.A.; SHI, P.Y. A mouse cell-adapted NS4B mutation attenuates West Nile virus RNA synthesis. **Virology**. v. 361, n.1, p. 229-41, 2007.

PURDY, D. E.; CHANG, G. J. Secretion of noninfectious dengue virus-like particles and identification of amino acids in the stem region involved in intracellular retention of envelope protein. **Virology**, v. 333, n. 2, p.239-50, 2005.

RABONI, S. M.; STELLA, V.; CRUZ, C. R.; FRANÇA, J. B.; MOREIRA, S.; GONÇALVES, L.; NOGUEIRA, M. B.; VIDAL, L. R.; ALMEIDA, S. M.; DEBUR, M. C.; CARRARO, H. JR.; DOS SANTOS, C. N. Laboratory Diagnosis, Epidemiology, and Clinical Outcomes of Pandemic Influenza A and Community Respiratory Viral Infections in Southern Brazil. **J Clin Microbiol**. v. 49, n. 4, p.1287–93, 2011.

RAMOS, C.; SÁNCHEZ, G.; PANDO, R. H.; BAQUERA, J.; HERNÁNDEZ, D.; MOTA, J.; RAMOS, J.; FLORES, A.; LLAUSÁS, E. Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. **J Neurovirol**. v.4, p.465-8, 1998.

RANDOLPH, V.B; STOLLAR, V. Low pH-induced cell fusion in flavivirus-infected *Aedes albopictus* cell cultures. **J Gen Virol**, v. 71, p. 1845-50, 1990.

REIS, S. R.; SAMPAIO, A. L.; HENRIQUES, M. D.; GANDINI, M.; AZEREDO, E. L.; KUBELKA, C. F. An in vitro model for dengue virus infection that exhibits human monocyte infection, multiple cytokine production and dexamethasone immunomodulation. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 102, n. 8, p. 983-90, 2007.

REY, F.A.; HEINZ, F.X.; MANDL, C.; KUNZ, C.; HARRISON, S.C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2Å resolution. **Nature**, v. 375, p. 291-298, 1995.

REY, F. A. Dengue virus envelope glycoprotein structure: New insight into its interactions during viral entry. **Proc. Nat. Acad. Sci**. v. 100, n.12 p. 6.899-901, 2003.

RICE, C.M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Virology**. New York: Raven Press, 1996. p.931-60.

RICO-HESSE, R. L. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. **Virology**, v. 174, p. 479- 93, 1990.

RICO-HESSE, R.; HARRISON, L.M.; SALAS, R.A.; TOVAR, D.; NISALAK, A.; RAMOS, C.; BOSHELL, J.; DE MESA, M.T.R.; NOGUEIRA, R.M.R; DA ROSA, A.T. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, v.230, p.244-251, 1997.

RIGAU-PÉREZ, J.G. The early use of break-bone fever (Quebranta huesos, 1771) and dengue (1801) in Spanish. **Am J Trop Med Hyg**. v. 59, n. 2, p. 272-4, 1998.

ROBIN, Y.; CORNET, M.; HEME, G.; LE GONIDEC, G. Isolement du virus de la dengue au Sénégal. **Ann. Virol**. v.131, p.149–54, 1980.

ROCAK, S.; LINDER, P. DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v.5, n.3, p.232-41, 2004.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cell Mol Life Sci**. v. 67, n. 16, p. 2773-86, 2010.

RODRIGUEZ-MADOZ, J. R.; BERNAL-RUBIO, D.; KAMINSKI, D.; BOYD, K.; FERNANDEZ-SESMA, A. Dengue virus inhibits the production of type I interferon in primary human dendritic cells. **J Virol**. v.84, p.4845–4850, 2010a.

RODRIGUEZ-MADOZ, J. R.; BELICHA-VILLANUEVA, A.; BERNAL-RUBIO, D.; ASHOUR, J.; AYLLON, J. et al. Inhibition of the type I interferon response in human dendritic cells by dengue virus infection requires a catalytically active NS2B3 complex. **J Virol**. v. 84, p. 9760–9774, 2010b.

RODRIGUEZ-ROCHE, R.; SANCHEZ, L.; BURGHER, Y.; ROSARIO, D.; ALVAREZ, M.; KOURI, G.; HALSTEAD, S.B.; GOULD, E.A.; GUZMÁN, M.G. Virus role during intraepidemic increase in dengue disease severity. **Vector Borne Zoonotic Dis**. v. 11, n. 6, p. 675-81, 2011.

ROSSI, S. L.; ZHAO, Q.; O'DONNELL, V.K.; MASON, P.W. Adaptation of West Nile virus replicons to cells in culture and use of replicon-bearing cells to probe antiviral action. **Virology**. v. 331, p. 457–70, 2005.

ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nat Rev Immun**. v. 11, p. 532-43, 2011.

ROTHMAN, A.L.; ENNIS, F. A. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. **Virology**. v. 257, n. 1, p. 1-6, 1999.

SABCHAREON, A.; WALLACE, D.; SIRIVICHAYAKUL, C.; LIMKITTIKUL, K.; CHANTHAVANICH, P.; SUVANNADABBA, S.; JIWARIYAVEJ, V.; DULYACHAI, W.; PENGSAI, K.; WARTEL, T.A.; MOUREAU, A.; SAVILLE, M.; BOUCKENOOGHE, A.; VIVIANI, S.; TORNIEPORTH, N.G.; LANG, J. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. **Lancet**. v. 380, n. 9853, p. 1559-67, 2012.

SABIN, A.B. Research on dengue during World War II. **Am J Trop Med Hyg**, v.1, p.30-50, 1952.

SABIN, A.B.; SCHLESINGER, R.W. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. **Science**, v.101, p.640-42, 1945.

SALAEMAE W, JUNAID M, ANGSUTHANASOMBAT C, KATZENMEIER G. Structure-guided mutagenesis of active site residues in the dengue virus two-component protease NS2B-NS3. **J Biomed Sci**. v. 24 p.17-68, 2010.

SAMPATH, A.; XU, T.; CHAO, A.; LUO, D.; LESCAR, J.; VASUDEVAN, S.G. Structure- Based Mutational Analysis of the NS3 Helicase from Dengue Virus. **J Virol**, v. 80, n. 13, p. 6686–90, 2006.

SÁNCHEZ, 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, p. 2541-45, 1996.

SARIOL, C.A.; MUÑOZ-JORDÁN, J.L.; ABEL, K.; ROSADO, L.C.; PANTOJA, P.; GIAVEDONI, L.; RODRIGUEZ, V.; WHITE, L.J.; MARTINEZ, M.; ARANA, T.; KRAISELBURD, E.N. Transcriptional Activation of Interferon-Stimulated Genes but Not of Cytokine Genes after Primary Infection of Rhesus Macaques with Dengue Virus Type 1. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 6, p. 756-66, 2007.

SARKAR, J.K; MONDAL, A.; CHAKARAVARTY, S.K.; CHATTERJEE, S.N.; PAL, S.R. Isolation of dengue virus from the blood of a clinical case of encephalitis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 57, n. 9, p. 1616-20, 1969.

SCHERER, W. F.; RUSSELL, P. K.; ROSEN, L.; CASALS, J.; DICKERMAN, R. W. Experimental infection of chimpanzees with dengue viruses. **Am J Trop Med Hyg**. v. 27, n. 3, p. 590-9, 1978.



SCHMIDT-CHANASIT, J.; HADITSCH, M.; SCHONEBERG, I.; GUNTHER, S.; STARK, K.; FRANK, C. Dengue virus infection in a traveller returning from Croatia to Germany. **Euro Surveill.** v.15, n.40, p.19.677-79, 2010.

SCHOGGINS, J. W.; DORNER, M.; FEULNER, M.; IMANAKA, N.; MURPHY, M. Y.; PLOSS, A.; RICE, C. M. Dengue reporter viruses reveal viral dynamics in interferon receptor-deficient mice and sensitivity to interferon effectors in vitro. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 109, n. 36, p. 14610-5, 2012.

SCOTT, R. M.; NISALAK, A.; CHEAMUDON, U. SERIDHORANAKUL, S. NIMMANNITYA, S. Isolation of dengue viruses from peripheral blood leukocytes of patients with hemorrhagic fever. **J Infect Dis.** v. 141, n. 1, p. 1-6, 1980.

SHIRYAEV SA, KOZLOV IA, RATNIKOV BI, SMITH JW, LEBL M, STRONGIN AY. Cleavage preference distinguishes the two-component NS2B-NS3 serine proteinases of Dengue and West Nile viruses. **Biochem J.** v. 401,n. 3, p. 743-52, 2007.

SILVEIRA, G. F.; MEYER, F.; DELFRARO, A.; MOSIMANN, A. L.; COLUCHI, N.; VASQUEZ, C.; PROBST, C. M.; BÁFICA, A.; BORDIGNON, J.; DOS SANTOS, C. N. Dengue virus type 3 isolated from a fatal case with visceral complications induces enhanced proinflammatory responses and apoptosis of human dendritic cells. **J Virol.** v. 85, n.11, p.5374-83, 2011.

SOARES, C. N.; CABRAL-CASTRO, M. J.; PERALTA, J. M.; FREITAS, M. R.; PUCCIONI-SOHLER, M. Meningitis determined by oligosymptomatic dengue virus type 3 infection: Report of a case. **Int J Infect Dis.** v. 14: e150-2, 2010.

SOLOMON, T.; DUNG, M.N.; VAUGHN, W.D.; KNEEN, R.; THAO, T.T.L.; RAENGSAKULRACH, B.; LOAN, T.H.; DAY, J.P.N.; FARRAR, J.; MYINT, A.S.K.; WARRELL, J.M.; JAMES, S.W.; NISALAK, A.; WHITE, J.N. Neurological manifestations of dengue infection. **Lancet.** v.355, p.1053-9, 2000.

STEIMER, L.; KLOSTERMEIER, D. RNA helicases in infection and disease. **RNA Biol.** v.9, n.6, p.751-71, 2012.

STIASNY, K.; KÖSSL, C.; HEINZ, F. X. Differences in the postfusion conformations of full-length and truncated class II fusion protein E of tick-borne encephalitis virus. **J Virol.** v. 79, n. 10, p. 6511-5, 2005.

SUMARMO, H.W.; JAHJA, E.; GUBLER, D.J.; SUTOMENGGOLO, T.S.; SAROSO, S.J. Encephalopathy associated with dengue virus. **Lancet,** p.449-50, 1978.

SUN, D.S.; KING, C.C.; HUANG, H.S.; SHIH, Y.L.; LEE, C.C.; TSAI, W.J.; YU, C.C.; CHANG, H.H. Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause thrombocytopenia and mortality in mice. **J Thromb Haemost,** v. 5, n.11, p.2291-9, 2007.

SUN, P.; FERNANDEZ, S.; MAROVICH, M. A.; PALMER, D. R.; CELLUZZI, C. M.; BOONNAK, K.; LIANG, Z.; SUBRAMANIAN, H.; PORTER, K. R.; SUN, W.; BURGESS, T. H. Functional characterization of ex vivo blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells after infection with dengue virus. **Virology**. v.383, n.2, p.207-15, 2009.

SUZUKI, R.; DE BORBA, L.; DUARTE DOS SANTOS, C.N.; MASON, P.W. Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1: characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1. **Virology**, v.326, n.2, p.374-83, 2007.

TACKETT, A. J.; CHEN, Y.; CAMERON, C. E.; RANEY, K. D. Multiple full-length NS3 molecules are required for optimal unwinding of oligonucleotide DNA in vitro. **J Biol Chem**. v. 280, n. 11, p. 10797-806, 2005.

TAJIMA, S.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. Characterization of Asn130-to-Ala mutant of dengue type 1 virus NS1 protein. **Virus Genes**, v.36, n.2, p.323-9, 2008.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Innate immunity to virus infection. **Immunol Rev**. v. 227, n. 1, p. 75-86, 2009.

TIAN, Y.; CHEN, W.; YANG, Y.; XU, X.; ZHANG, J.; WANG, J.; XIAO, L.; CHEN, Z. Identification of B cell epitopes of dengue virus 2 NS3 protein by monoclonal antibody. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 97, n. 4, p. 1553-60, 2013.

TUISKUNEN, A.; WAHLSTRÖM, M.; BERGSTRÖM, J.; BUCHY, P.; LEPARC-GOFFART, I.; LUNDKVIST, A. Phenotypic characterization of patient dengue virus isolates in BALB/c mice differentiates dengue fever and dengue hemorrhagic fever from dengue shock syndrome. **Virol J**. v. 11, p. 8:398, 2011a.

TUISKUNEN, A.; MONTEIL, V.; PLUMET, S.; BOUBIS, L.; WAHLSTRÖM, M.; DUONG, V.; BUCHY, P.; LUNDKVIST, A.; TOLOU, H.; LEPARC-GOFFART, I. Phenotypic and genotypic characterization of dengue virus isolates differentiates dengue fever and dengue hemorrhagic fever from dengue shock syndrome. **Arch Virol**. v. 156, n. 11, p. 2023-32, 2011b.

TUTEJA, N.; TUTEJA, R. Unraveling DNA helicases: Motif, structure, mechanism and function. **Eur J Biochem**, v. 271, n. 10, p. 1.849-63, 2004.

UMAREDDY, I.; CHAO, A.; SAMPATH, A.; GU, F.; VASUDEVAN, S. G. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. **J Gen Virol**. v. 87, n. 9, p. 2605-14, 2006.

VALLE, R. P.; FALGOUT, B. Mutagenesis of the NS3 protease of dengue virus type 2. **J Virol**. v.72, n.1, p.624-32, 1998.

VARATHARAJ, A. Encephalitis in the clinical spectrum of dengue infection. **Neurol India**. v. 58, n. 4, p. 585-91, 2010.

VARNAVSKI, A. N.; YOUNG, P. R.; KHROMYKH, A. A. Stable high-level expression of heterologous genes in vitro and in vivo by noncytopathic DNA-based Kunjin virus replicon vectors. **J. Virol.** v. 74, p. 4394–403, 2000.

VASILAKIS, N.; WEAVER, S.C. The history and evolution of human dengue emergence. **Adv Virus Res.** v.72, p.1-76, 2008.

VASILAKIS, N; CARDOSA, J.; HANLEY, K. A.; HOLMES, E.C.; WEAVER, S.C. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. **Nat Rev Microbiol.** v.9, n.7, p.532-41, 2011.

VAUGHAN, K.; GREENBAUM, J.; BLYTHE, M.; PETERS, B.; SETTE, A. Meta-analysis of all immune epitope data in the Flavivirus genus: inventory of current immune epitope data status in the context of virus immunity and immunopathology. **Viral Immunol.** v. 23, p. 259–84, 2010.

VU TT, HOLMES EC, DUONG V, NGUYEN TQ, TRAN TH, QUAIL M, CHURCHER C, PARKHILL J, CARDOSA J, FARRAR J, WILLS B, LENNON NJ, BIRREN BW, BUCHY P, HENN MR, SIMMONS CP. Emergence of the Asian 1 genotype of dengue virus serotype 2 in Vietnam: in vivo fitness advantage and lineage replacement in south-east Asia. *PLoS Negl Trop Dis.* 4: e757., 2010.

WANG, J. P.; LIU, P.; LATZ, E.; GOLENBOCK, D. T.; FINBERG, R. W.; LIBRATY, D. H. Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7 signaling beyond endosomal recognition. **J Immunol.** v. 177, n. 10, p. 7114-21, 2006.

WARKE RV, MARTIN KJ, GIAYA K, SHAW SK, ROTHMAN AL, BOSCH I. TRAIL is a Novel Antiviral Protein against Dengue virus. **J Virol.** v. 82, p. 555–564, 2008.

WEAVER S.C.; VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infect Genet Evol.** v.9, n.4, p.523-40, 2009.

WESTAWAY, E. G.; MACKENZIE, J. M.; KENNEY, M. T.; JONES, M. K.; KHROMYKH, A. A. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. **J Virol.** v. 71, p. 6650–61, 1997.

WESTAWAY, E.G.; KHROMYKH, A.A.; KENNEY, M.T.; MACKENZIE, J.M.; JONES, M.K. Proteins C and NS4B of the flavivirus Kunjin translocate independently into the nucleus. *Virology.* v. 234, n.1, p. 31-41, 1997.

WESTAWAY, E.G.; MACKENZIE, J.M.; KHROMYKH, A.A. Kunjin RNA replication and applications of Kunjin replicons. **Adv Virus Res.** v. 59, p. 99-140, 2003.

WHITEHEAD, S.S.; BLANEY, J.E.; DURBIN, A.P.; MURPHY, B.R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, n. 7, p. 518-28, 2007.

WHITEHORN J, SIMMONS CP. The pathogenesis of dengue. **Vaccine**. v. 29, n. 42, p. 7221-8, 2011.

WICHAPONG, K.; PIANWANIT, S.; SIPPL, W., KOKPOL, S. Homology modeling and molecular dynamics simulations of Dengue virus NS2B/NS3 protease: insight into molecular interaction. **J Mol Recognit**. v. 23, n. 3, p. 283-300, 2010.

WICKER, J. A.; WHITEMAN, M. C.; BEASLEY, D.W.; DAVIS, C. T.; MCGEE, C. E.; LEE, J.C.; HIGGS, S.; KINNEY, R.M.; HUANG, C.Y.; BARRETT, A.D. Mutational analysis of the West Nile virus NS4B protein. **Virology**. v. 426, n.1, p. 22-33, 2012.

WU S.J.; GROUARD-VOGEL, G. SUN, W.; MASCOLA JR, BRACHTEL E, PUTVATANA R, LOUDER MK, FILGUEIRA L, MAROVICH MA, WONG HK, BLAUVELT A, MURPHY GS, ROBB ML, INNES BL, BIRX DL, HAYES CG, FRANKEL SS. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nat Med**. v. 6, n. 7, p. 816-20, 2000.

WU, J.; BERA, A. K.; KUHN, R. J.; SMITH, J. L. Structure of the flavivirus helicase: implications for catalytic activity, protein interactions, and proteolytic processing. **J Virol**. v. 79, p.10268–77, 2005.

XIE, X.; WANG, Q.Y.; XU, H.Y.; QING, M.; KRAMER, L.; YUAN, Z.; SHI, P.Y. Inhibition of dengue virus by targeting viral NS4B protein. **J Virol**. v. 85, n. 21, p. 11183-95, 2011.

XU, T.; SAMPATH, A.; CHAO, A.; WEN, D.; NANAQ, M.; CHENE, P.; SUBHASH, G.; LESCAR, J. Structure of the dengue virus helicase/nucleoside triphosphatase catalytic domain at a resolution of 2.4Å. **J Virol**, v. 79, n. 16, p. 10.278-88, 2005

XU, S.; LI, H.; SHAO, X.; FAN, C.; ERICKSEN, B.; LIU, J.; CHI, C.; WANG, C. Critical effect of peptide cyclization on the potency of peptide inhibitors against Dengue virus NS2B-NS3 protease. **J Med Chem**. v. 55, n. 15, p. 6881-7, 2012.

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

YAP, T.L.; XU, T.; CHEN, Y.L.; MALET, H.; EGLOFF, M.P.; CANARD, B.; VASUDEVAN, S.G.; LESCAR, J. Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution. **J Virol**. v. 81, n. 9, p. 4753-65, 2007.

YAUCH, L. E.; SHRESTA, S. Mouse models of dengue virus infection and disease. **Antiviral Res**. v. 80, n. 2, p. 87-93, 2008.

YE, J.; ZHU, B.; FU, Z.F.; CHEN, H.; CAO, S. Immune evasion strategies of flaviviruses. **Vaccine**. v. 31, n. 3, p. 461-71, 2013.

YIN Z, PATEL SJ, WANG WL, WANG G, CHAN WL, RAO KR, ALAM J, JEYARAJ DA, NGEW X, PATEL V, BEER D, LIM SP, VASUDEVAN SG, KELLER TH. Peptide inhibitors of Dengue virus NS3 protease. Part 1: Warhead. **Bioorg Med Chem Lett.** v. 16, n.1, p. 36-9, 2006.

YOKOYAMA, W. M.; CHRISTENSEN, M.; SANTOS, G. D.; MILLER, D. Production of monoclonal antibodies. *Curr Protoc Immunol.* Cap. 2, Und. 2,5, 2006.

YON, C.; TERAMOTO, T.; MUELLER, N.; PHELAN, J.; GANESH, V. K.; MURTHY, K. H.; PADMANABHAN, R. Modulation of the nucleoside triphosphatase/RNA helicase and 5'-RNA triphosphatase activities of Dengue virus type 2 nonstructural protein 3 (NS3) by interaction with NS5, the RNA-dependent RNA polymerase. **J Biol Chem.** v. 280, n. 29, p. 27412-9, 2005.

ZHANG, Y.; CORVER, J.; CHIPMAN, P.R.; ZHANG, W.; PLETNEV, S.V.; SEDLAK, D.; BAKER, T.S.; STRAUSS, J.H.; KUHN, R.J.; ROSSMANN, M.G. Structures of immature flavivirus particles. **EMBO J.** v. 22, p. 2604–13, 2003.

ZOMPI, S.; HARRIS, E. Animal Models of Dengue Virus Infection. **Viruses.** v. 4, p. 62-82, 2012.

ZOU, G.; XU, H. Y.; QING, M.; WANG, Q. Y.; SHI, P. Y. Development and characterization of a stable luciferase dengue virus for high-throughput screening. **Antiviral Res.** v. 91, n. 1, p. 11-9. 2011.

## ANEXO

### A. ARTIGO PUBLICADO

BORBA, L. DE; STROTTMANN, D. M.; NORONHA, L. DE; MASON, P. W.; DUARTE DOS SANTOS, C. N. Synergistic Interactions between the NS3hel and E Proteins Contribute to the Virulence of Dengue Virus Type 1. **Plos Neg. Trop Disease.** v. 6, n. 4, p.e1624, 2012.

# Synergistic Interactions between the NS3<sub>hel</sub> and E Proteins Contribute to the Virulence of Dengue Virus Type 1

Luana de Borba<sup>1</sup>\*, Daisy M. Strottmann<sup>1</sup>\*, Lucia de Noronha<sup>2</sup>, Peter W. Mason<sup>3</sup>\*, Claudia N. Duarte dos Santos<sup>1</sup>\*

**1** Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Carlos Chagas (ICC-FIOCRUZ/PR), Curitiba, Paraná, Brazil, **2** Laboratório de Patologia Experimental, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC/PR), Curitiba, Paraná, Brazil, **3** Department of Pathology, University of Texas Medical Branch (UTMB), Galveston, Texas, United States of America

## Abstract

**Background:** Dengue includes a broad range of symptoms, ranging from fever to hemorrhagic fever and may occasionally have alternative clinical presentations. Many possible viral genetic determinants of the intrinsic virulence of dengue virus (DENV) in the host have been identified, but no conclusive evidence of a correlation between viral genotype and virus transmissibility and pathogenicity has been obtained.

**Methodology/Principal Findings:** We used reverse genetics techniques to engineer DENV-1 viruses with subsets of mutations found in two different neuroadapted derivatives. The mutations were inserted into an infectious clone of DENV-1 not adapted to mice. The replication and viral production capacity of the recombinant viruses were assessed *in vitro* and *in vivo*. The results demonstrated that paired mutations in the envelope protein (E) and in the helicase domain of the NS3 (NS3<sub>hel</sub>) protein had a synergistic effect enhancing viral fitness in human and mosquito derived cell lines. E mutations alone generated no detectable virulence in the mouse model; however, the combination of these mutations with NS3<sub>hel</sub> mutations, which were mildly virulent on their own, resulted in a highly neurovirulent phenotype.

**Conclusions/Significance:** The generation of recombinant viruses carrying specific E and NS3<sub>hel</sub> proteins mutations increased viral fitness both *in vitro* and *in vivo* by increasing RNA synthesis and viral load (these changes being positively correlated with central nervous system damage), the strength of the immune response and animal mortality. The introduction of only pairs of amino acid substitutions into the genome of a non-mouse adapted DENV-1 strain was sufficient to alter viral fitness substantially. Given current limitations to our understanding of the molecular basis of dengue neuropathogenesis, these results could contribute to the development of attenuated strains for use in vaccinations and provide insights into virus/host interactions and new information about the mechanisms of basic dengue biology.

**Citation:** de Borba L, Strottmann DM, de Noronha L, Mason PW, N Duarte dos Santos C (2012) Synergistic Interactions between the NS3<sub>hel</sub> and E Proteins Contribute to the Virulence of Dengue Virus Type 1. PLoS Negl Trop Dis 6(4): e1624. doi:10.1371/journal.pntd.0001624

**Editor:** Aravinda M. de Silva, University of North Carolina at Chapel Hill, United States of America

**Received:** July 7, 2011; **Accepted:** March 8, 2012; **Published:** April 17, 2012

**Copyright:** © 2012 de Borba et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The work was supported by CNPq, Fundação Araucária, FioCruz. LB and DMS are supported by a fellowship from CAPES. CNDS is a CNPq fellowship recipient. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: clsantos@tecpar.br

✉ These authors contributed equally to this work.

✉ Current address: Novartis Vaccines and Diagnostics, Cambridge, Massachusetts, United States of America

## Introduction

Dengue virus (DENV) is an arthropod-borne flavivirus that belongs to the family *Flaviviridae*. The DENV genome is a 11 kb single-stranded RNA molecule of positive polarity that encodes a single open read frame (ORF), which is flanked by two untranslated regions (5' and 3' UTR) [1–2], which are involved in viral RNA replication and translation [3–6]. ORF translation generates a single polyprotein that is cleaved by host and virus-derived proteases to produce three structural (C, prM and E) and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5) [1].

The four serotypes of DENV (DENV-1 to DENV-4) are transmitted to humans by the mosquito vector *Aedes aegypti*. Dengue disease is endemic to subtropical and tropical countries, and the

World Health Organization (WHO) estimates that 50 to 100 million individuals become infected annually. DENV infection results in a spectrum of illnesses, ranging from a flu-like disease (dengue fever, DF) to more severe and potentially fatal, dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS) [7–8]. Epidemics with high frequencies of DHF/DSS are spreading throughout South America and unusual clinical presentations such as encephalitis, hepatitis and other visceral signs are becoming more frequent [9–12]. There are currently no vaccines or specific licensed antiviral drugs for prevention or treatment of dengue [13–15].

Despite major advances in DENV biology, many aspects of dengue pathogenesis remain largely unknown. Animal models reproducing some of the salient features of dengue disease have been used to investigate the underlying pathogenesis mechanisms.



### Author Summary

Dengue virus constitutes a significant public health problem in tropical regions of the world. Despite the high morbidity and mortality of this infection, no effective antiviral drugs or vaccines are available for the treatment or prevention of dengue infections. The profile of clinical signs associated with dengue infection has changed in recent years with an increase in the number of episodes displaying unusual signs. We use reverse genetics technology to engineer DENV-1 viruses with subsets of mutations previously identified in highly neurovirulent strains to provide insights into the molecular mechanisms underlying dengue neuropathogenesis. We found that single mutations affecting the E and NS3<sub>hel</sub> proteins, introduced in a different genetic context, had a synergistic effect increasing DENV replication capacity in human and mosquito derived cells *in vitro*. We also demonstrated correlations between the presence of these mutations and viral replication efficiency, viral loads, the induction of innate immune response genes and pathogenesis in a mouse model. These results should improve our understanding of the DENV-host cell interaction and contribute to the development of effective antiviral strategies.

Multiple lines of evidence indicate that immunopathological mechanisms play an important role in the development of DHF/DSS [7,16]. The prevalence of DHF is higher in patients experiencing secondary infection with a heterotypic dengue virus serotype, leading to the suggestion that severe disease may result from antibody dependent enhancement (ADE) [17–21]. However, severe disease is often observed after primary infections, indicating a role for individual strains of DENV, in addition to host factors related to previous infection in the development of severe dengue disease [22–25]. Disease severity is thus probably determined by the interplay of viral and host factors. Several mouse models of dengue disease have been described, but even those that faithfully reproduce some features of human disease, present limitations because they are based on the use of mouse-adapted viruses or genetically modified animals. Nevertheless, these models have provided insights into DENV pathogenesis.

Many studies have shown that mutations affecting the E protein, which covers the flavivirus surface, can alter flavivirus virulence. The E protein, a glycosylated dimeric membrane protein [26], interacts with receptors on the host cell surface [27–28], mediating virus binding and fusion to the host cell membrane [29–31] and conferring protective immune responses by eliciting antibody production [32–33].

Prestwood and coworkers [34] described a DENV-2 isolate that had been obtained by passing a clinical isolate in mosquitoes and mice, and that caused severe disease in AG129 mice. By reverse genetic techniques, they identified two mutations affecting the E protein (E<sub>124</sub> and E<sub>128</sub>) as responsible for an increase in virulence. The recombinant virus had a low affinity for heparin sulfate, reducing its binding to cells and increasing its half-life in the serum. This would potentially allow a larger number of viral particles to infect the visceral tissues thereby increasing disease severity in this mouse model.

NS3 protein is one of the most highly conserved proteins in flaviviruses. This multifunctional protein has at least three different activities [35]. It has a serine protease domain that catalyzes the cleavage of several viral proteins, an RNA helicase domain, and an RNA triphosphatase domain, which promotes dephosphorylation of the 5'UTR region during capping activities [36–46]. In the

course of human dengue infection, NS3 is a common target of T cells [47].

The helicase domain of NS3 (NS3<sub>hel</sub>), together with NS5, an RNA-dependent RNA polymerase, participates in viral RNA replication and it is essential for genome propagation. It has been demonstrated that the interaction between DENV NS3<sub>hel</sub> and NS4B triggers the dissociation of the helicase from single-stranded RNA thereby modulating viral replication. The enzymatic activities and role of NS3 proteins in viral replication and polyprotein processing have been studied for several members of the *Flaviviridae* family [48–50], but only a few studies have identified point mutations in NS3 modulating viral pathogenesis.

We previously described neurovirulent variants of DENV-1 that were generated by adapting viruses to cause lethal neurological disease in mice [51–52]. Comparisons of the sequences of parental and mouse-adapted strains identified mutations affecting positions 402 and 403 of E protein, and in the helicase domain of the non-structural protein NS3 (positions 209, 435 and 480), as potentially responsible for this neurovirulent phenotype [52–53]. We evaluated the viral molecular determinants putatively identified as contributing to DENV pathogenesis in a mouse model, by introducing each mutation, individually or in combination, into a non-neurovirulent infectious cDNA clone of DENV-1 and recovering genetically defined DENV-1 strains which were then used to determine the effect of these mutations *in vitro* and *in vivo*. These results build on previous demonstrations that multiple mutations in different regions of the genomes of dengue and other flaviviruses cooperate in the modulation of pathogenesis [54–56].

### Methods

#### Ethics statement

Animal experiments were approved by the ethics committee for animal experimentation of the Federal University of Parana (CEP/UFPR 23075-0429663/2007-97). The procedures using animals in this research project are specified in accordance with the ethical principles established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and requirements established in "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

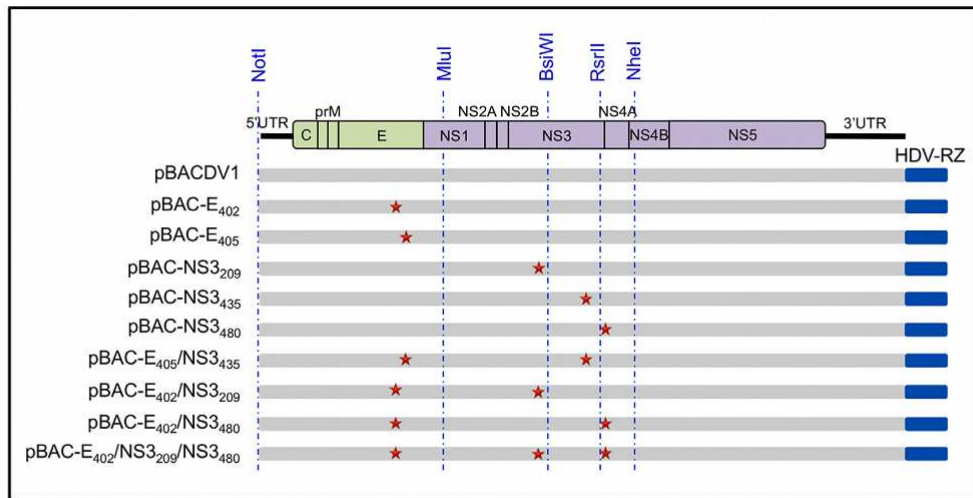
#### Cell cultures

*Aedes albopictus* cells (C6/36) were grown at 28°C in Leibovitz L-15 medium (Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY, USA) supplemented with 0.26% Tryptose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 25 µg/mL gentamicin (Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY, USA) and 5% fetal bovine serum (FBS) (Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Human hepatoma cells (Huh7.5) were grown in 37°C, under an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>, in Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) (Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY, USA) supplemented with 25 µg/mL gentamicin and 10% FBS. Neuroblastoma cells (Neuro-2a) were grown in 37°C, under an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>, in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY, USA) supplemented with 1x non essential amino acids (Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY, USA), 25 µg/mL gentamicin and 5% FBS.

#### Infectious cDNA clones

All clones were constructed using the backbone of the infectious genome-encoding plasmid pBACDV1 [57] (a bacterial artificial chromosome plasmid – pBAC). The pBACDV1 consists of the full-length cDNA of strain BR/90 (differing from the sequence deposited in GenBank (AF226685.2) by only 11 nucleotides, and





**Figure 1. Line diagrams representing the structure of recombinant genomes and the position of key viral elements.** Dotted lines show the positions of the restriction endonuclease sites used to insert fragments containing mutations (represented by stars) into pBACDV1. doi:10.1371/journal.pntd.0001624.g001

none of which results in an amino-acid substitution), a T7 RNA polymerase promoter sequence with a single-non-genomic G residue introduced immediately upstream from the first nucleotide of the 5'UTR (to ensure high levels of synthetic transcript production), and a hepatitis delta virus ribozyme sequence (HDV-RZ) followed by a unique restriction endonuclease site just after the last nucleotide of the 3'UTR, (to facilitate the production of templates for RNA synthesis) [57].

#### Construction of recombinant DENV clones

To construct the recombinant cDNA clones containing the mutations identified in the neurovirulent DENV-1 strains, overlapping polymerase chain reaction (PCR) amplifications to generate cDNA molecules containing specific mutations, except for the NS3<sub>435</sub> mutation, which was located very close to a naturally occurring restriction endonuclease site, making it possible to incorporate this mutation into the DENV-1 cDNA through the use of a single mutated oligonucleotide. All amplifications were carried out with the high fidelity enzymes of the TripleMaster System (Eppendorf, Westbury, NY, USA) or LongRange PCR (Qiagen, Valencia, CA, USA), following the manufacturer's protocols. In some cases, the fragments containing the desired mutations were initially inserted into the pGEM-T Easy Vector System (Promega, Madison, WI, USA), in accordance with manufacturer's instructions. The desired infectious cDNAs were reconstructed by using the corresponding fragments obtained either directly from the PCR amplicon, or from the pGEM-T clone to replace the parental fragments in the DENV-1 infectious genome in pBACDV1.

The fragments replaced for each mutation were: a NotI/MluI fragment for the E mutations (E<sub>402</sub> and E<sub>405</sub>), a BsiWI/RsrII fragment for the NS3<sub>435</sub> mutation, a MluI/BsiWI fragment for the NS3<sub>209</sub> mutation, and a BsiWI/NheI fragment for the NS3<sub>480</sub> mutation (Figure 1). The clones with individual mutations were named: pBAC-E<sub>402</sub>, pBAC-E<sub>405</sub>, pBAC-NS3<sub>209</sub>, pBAC-NS3<sub>435</sub> and pBAC-NS3<sub>480</sub>, respectively. Finally, for the construction of

the double and triple mutants, we combined the E-mutation with the NS3-mutation found in two independent neuroadapted strains (Table 1), generating the clones pBAC-E<sub>405</sub>/NS3<sub>435</sub>, pBAC-E<sub>402</sub>/NS3<sub>209</sub>, pBAC-E<sub>402</sub>/NS3<sub>480</sub> and pBAC-E<sub>402</sub>/NS3<sub>209</sub>/NS3<sub>480</sub>. Each construct was confirmed by submitting the replaced fragment for sequencing, at the Macrogen Sequencing Service (Seoul, South Korea).

#### RNA transcription and transfection

Infectious DENV RNAs were generated by linearizing the recombinant pBAC DNAs in an overnight digestion at 25°C with SmaI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), purifying the products by phenol extraction and ethanol precipitation and transcribing them *in vitro* with T7 RNA polymerase in the presence of an 7 mG(ppp)G RNA cap analog (Biolabs, Ipswich, MA, USA) with the T7 MEGAScript Transcription System (Ambion, Austin, TX, USA). Eight individual wells of C6/36 cells cultured at 28°C were transfected with RNA transcripts in the presence of Lipofectin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Supernatant samples were harvested in duplicate at 48, 72, 96 and 120 hours after transfection, and used for viral titration. The time points with the highest titers were used for subsequent viral amplification.

#### Titration

Viral titers were determined by the focus-forming unit technique in C6/36 cells (ffu<sub>C6/36</sub>), as previously described [58]. Foci were immunostained with purified supernatants of the *Flavivirus* group-specific mouse monoclonal antibody 4G2, and the bound antibodies were then decorated with goat anti-mouse immunoglobulin conjugated to alkaline phosphatase (Promega, Madison, WI, USA), which was detected by adding a solution of NBT (nitroblue tetrazolium chloride) and BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt) (Promega, Madison, WI, USA) as a substrate.

**Table 1.** Summary of amino-acid sequence differences between the vBACDV1 and the panel of DENV infectious cDNA clones containing the selected subset of substitutions in the E and/or NS3 proteins.

Coding region	Codon position <sup>a</sup>	FGA/89 <sup>b</sup>	FGA/d1d <sup>c</sup>	FGA/NA Pg <sup>d</sup>	vBAC DV1 <sup>e</sup>	vBAC-E402	vBAC-E405	vBAC-NS3209	vBAC-NS3435	vBAC-NS3480	vBAC-E402/NS3209	vBAC-E402/NS3480	vBAC-E402/NS3209/NS3480
E	402	F	F	L*	F	L*	F	F	F	F	L*	L*	L*
E	405	T	I*	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
NS3	209	V	V	I*	V	V	I*	V	V	V	I*	V	I*
NS3	435	L	S*	L	L	L	L	L	S*	L	L	L	L
NS3	480	L	L	S*	L	L	L	L	L	S*	L	S*	S*

<sup>a</sup>Position of codon change within the individual protein-encoding region.

<sup>b</sup>Parental strain from which the neuroadapted strains were derived (AF226686.2) [45–46].

<sup>c</sup>Neuroadapted strain (AF226686.1).

<sup>d</sup>Neuroadapted strain (EF122231.1).

<sup>e</sup>vBACDV1 differs from the original BR/99 GenBank-deposited sequence (AF226685.2) by only 11 synonymous nucleotide substitutions; both BR/99 and vBACDV1 are identical to the parental virus used for previous neuroadaptation studies (strain FGA689; [45–46]) for the 5 codons shown in this table (see Table S1).

<sup>\*\*</sup>Mutations studied.

doi:10.1371/journal.pntd.0001624.t001

### Viral amplification and purification

To increase viral titers and generate working stocks, two rounds of infection were performed with each of the recovered virus, using the time point with highest titer in RNA transfection experiments *in vitro*. The first round of amplification was performed in T25 flasks (TPP, Trasadingen, Switzerland) of C6/36 cells ( $5 \times 10^5$  cells/flask) at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01. The cell cultures were incubated at 28°C until cytopathogenic effects were observed or, in some cases, infection was confirmed by routine indirect immunofluorescence assays, six days after infection (data not shown). Virus yields for each sample were determined by titration, as described above. The second round of amplification was performed in T300 flasks (TPP, Trasadingen, Switzerland) ( $2 \times 10^7$  C6/36 cells/flask), under the same conditions as described above. Recombinant viruses were purified from the products of this second amplification by centrifugation on a sucrose gradient, as previously described [59]. A mock-infected control preparation was prepared from non-infected C6/36 cells by the same protocol.

### Complete genome sequencing

Viral RNA was purified from sucrose gradient stocks, using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). The resulting RNA was reverse transcribed with the Improm-II Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) in the presence of random primers (100 pmol/μL – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and the entire genome was amplified by PCR for nucleotide sequencing, which was carried out by the MacroGen Sequencing Service (Seoul, South Korea).

### In vitro kinetics analysis

Huh7.5 ( $4 \times 10^5$  cells/well) and C6/36 ( $2 \times 10^5$  cells/well) cells were infected in 24-multiwell plates (TPP, Trasadingen, Switzerland) with mock and recombinant viruses vBACDV1, vBAC-E402, vBAC-E405, vBAC-NS3209, vBAC-NS3435, vBAC-NS3480, vBAC-E402/NS3435, vBAC-E402/NS3209, vBAC-E402/NS3480 and vBAC-E402/NS3209/NS3480. A MOI of 5 was used to infect Huh7.5 cells by incubation for 1 h at 37°C under an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>, and a MOI of 1 was used to infect C6/36 cells by incubation for 1 h at 28°C. Cells were recovered at 24, 48, and 72 hours post infection (hpi). The number of cells infected was determined by flow cytometry, according to previously described protocols [61]. Cells were analyzed with a FACS Canto II system (Becton & Dickinson, San Jose, CA). FACS data were analyzed with FlowJo 2.2.8 software.

### Cell binding assays

To determine the binding affinity of the recombinant viruses for Neuro-2a cells, Amicon (Millipore, Billerica, MA, USA) concentrated recombinant vBACDV1, vBAC-E402, vBAC-E405 viruses and a mock-infected control were incubated with  $2 \times 10^5$  Neuro-2a cells at MOI of 100 for 1 h at 4°C. The cells were then washed three times with ice-cold PBS to remove unbound virus. They were lysed and viral RNA was extracted with the QIAamp Viral RNA mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), according to the manufacturer's protocols. The number of bound genome-containing particles per cell was then determined by RT/qPCR in three independent experiments, as previously described [60]. The murine gene encoding GAPDH was also included as a housekeeping gene in all analysis, for data normalization [62].

### Mouse studies

A 50% lethal dose (LD<sub>50</sub>) assay was performed with virus recovered from the pBACDV1 clone (vBACDV1), to determine



the optimum dose of recombinant viruses for the inoculation of mice. Individual litters of two-day-old *Swiss* mice were inoculated via intracerebral (i.c.) route with four ten-fold dilutions (corresponding to 100,000  $\text{flu}_{\text{C6/36}}$  to 100  $\text{flu}_{\text{C6/36}}$ ) of purified vBACDV1 virus or one dilution of purified mock-infected C6/36 culture fluid (equivalent to the highest tested concentration of vBACDV1). Animals were monitored for 21 days. We found that the  $\text{LD}_{50}$  was equivalent to 56,234  $\text{flu}_{\text{C6/36}}$  of vBACDV1. For comparative studies, 562  $\text{flu}_{\text{C6/36}}$  (corresponding to  $10^{-2}$   $\text{LD}_{50}$ ) aliquots of each of the recombinant viruses were compared side-by-side through the i.c. inoculation of three individual litters of two-day-old mice, replicating the methods originally described for DENV-1 neurovirulence in *Swiss* mice [51]. The animals were observed for 21 days to evaluate the morbidity and mortality. Eight days post infection (dpi), three animals were randomly selected from each litter, euthanized and their brains were harvested and pooled for the quantification of virus replication and gene induction. Ten dpi, one animal per group was euthanized, its brain was collected and fixed in a 10% buffered formalin solution for histological analysis. In addition, mouse brain and spine cord tissues were individually collected at 6, 8 and 10 dpi of animals infected with mock, vBACDV1 and vBAC-E<sub>402</sub>/NS3<sub>209</sub>/NS3<sub>480</sub> for RT/qPCR and virus titration analysis.

#### Quantification of DENV RNA levels by quantitative RT-PCR (RT-qPCR)

Total RNA was isolated from 30 mg of pooled 8 dpi mouse brain tissues infected with each DENV or the mock, with the RNEasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. For the quantification of viral RNA in the brain tissues by RT/qPCR, we subjected 2  $\mu\text{g}$  of each RNA sample to amplification with 400 nM specific DENV-1 oligonucleotides and 300 nM specific DENV-1 probe, with the MultiScribe Enzyme Plus RNase Inhibitor and TaqMan Universal RT-PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, IA, USA) in an ABI PRISM 7500 Detection System (Applied Biosystems, Foster City, IA, USA) as previously described [60]. The mouse GAPDH housekeeping gene was included in all analysis for data normalization as previously described [52].

#### Relative quantification of mRNA levels by quantitative PCR (qPCR)

The RNA isolated from DENV- and mock-infected mouse brain tissues (pooled from three individuals from each group, as described above) was used for the quantification of mRNA levels for seven genes (Irf1, Psm8, Usp18, C1r, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  and CCL5) selected on the basis of a previous study by Bordignon and coworkers [63]. For this purpose, 4  $\mu\text{g}$  of each RNA sample were reverse transcribed with ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) and oligo-dT primers (10  $\mu\text{M}$ ) according to the manufacturer's protocol. The resulting cDNAs were then diluted to a concentration of 2 ng/ $\mu\text{l}$  and used for amplification by qPCR, as previously described [63]. Melting curves were used to check product specificity. Levels of mRNA for each selected gene were recorded as gene mRNA/murGAPDH mRNA induced by dengue virus infection in the central nervous system (CNS) of mice.

#### Statistical analysis

The qPCR data are reported as means  $\pm$  standard deviation (SD) and were analyzed by one-way ANOVA with Bonferroni's or Dunn's correction for multiple comparisons. *In vitro* growth kinetics data are reported as means  $\pm$  standard deviation (SD)

and were analyzed using two-way ANOVA followed by a Bonferroni's test. The level of significance for the analyses was set at  $p \leq 0.05$ . Mortality data were analyzed by plotting Kaplan-Meier survival curves and carrying out Log-rank (Mantel-Cox) multiple comparison test. The analyses were performed with GraphPad Software (Prism 5 for Mac OS X – version 5.0c, San Diego, CA, USA).

## Results

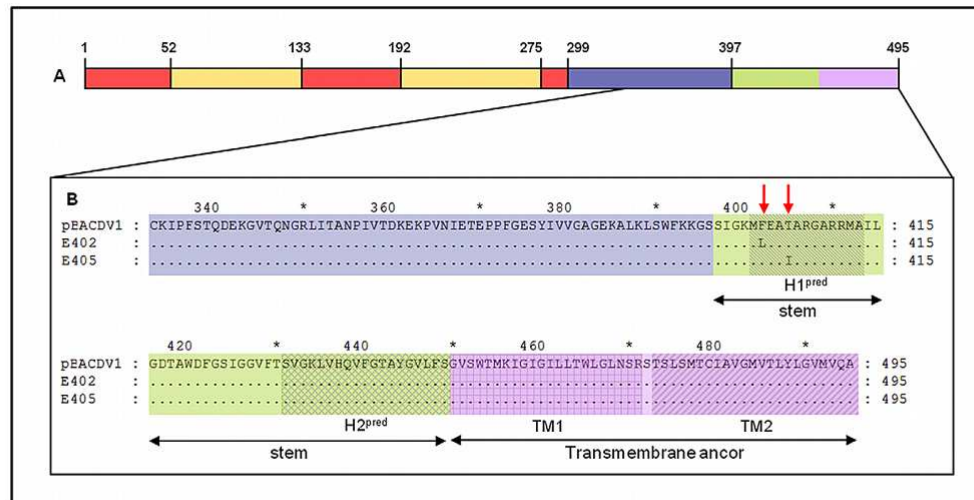
For identification of putative viral determinants on the phenotype of neuroadapted DENV-1 strains, we constructed a panel of DENV cDNA infectious clones containing a subset of mutations affecting the E and NS3 proteins selected in two separate studies of the neuroadaptation of the FGA/89 strain to newborn mice [51–52]. The mutations were introduced into a DENV-1 infectious clone not adapted to mice (pBACDV1, derived from the DENV-1 prototype strain (BR/90) – [57]). Comparisons of the sequences of the infectious clone, the neuroadapted isolates and the parental strain used to generate the neuroadapted strains (FGA/89) (Table S1), led us to focus on mutations at positions 402 and 405 in E and 209, 435, and 480 in NS3 for the studies described here (Table 1).

The mutations affecting E (E<sub>402</sub> and E<sub>405</sub>) acquired during adaptation were found to be located outside the parts of the protein used for structural determinations by X-ray crystallography. Both these mutations lie within the first of two predicted  $\alpha$ -helical structures H1<sup>prnd</sup> in the stem region of E just after the ectodomain [64] (Figure 2). This stem region seems to be involved in the formation of the E homotrimer, the interactions between E and prM, particle formation and intracellular retention [64–68].

The NS3 mutations acquired during neuroadaptation are located in the helicase domain, with the NS3<sub>209</sub> mutation in subdomain I, and mutations NS3<sub>435</sub> and NS3<sub>480</sub> in subdomain II [45] (Figure 3). The helicase domain of the NS3 protein appears to be responsible for supporting the initiation of (–)ssRNA synthesis, through the unfolding of RNA secondary structures, providing access to the replication machinery [36,69–70].

We investigated the effect of these mutations both individually and in combination on the *in vitro* and *in vivo* properties of DENV-1, by using infectious cDNAs harboring the mutations (Figure 1 and Table 1) as a source for *in vitro* RNA synthesis. The RNAs generated were then introduced into C6/36 cells for the recovery of viruses, which were amplified and purified as described in the Methods section. Analyses of the complete sequences of the genomes of all of the amplified viruses confirmed their identity with the pBACs used to generate them and showed that no adventitious mutations had been produced in the cloning steps or arisen during virus recovery and propagation.

To evaluate the role of each mutation in the neurovirulent phenotype in a mouse model, purified recombinant viruses were inoculated i.c. in newborn *Swiss* mice. Three litters of mice, each containing 5 to 11 animals, were used. All inoculations were performed with a single dose of virus (562  $\text{flu}_{\text{C6/36}}$ ), corresponding to 1/100  $\text{LD}_{50}$  for the parental cDNA clone-derived virus, vBACDV1 (see Methods, all viral genomes were resequenced before inoculation). The equivalent viral genomic RNA (GE) to FFU ratio (562  $\text{flu}_{\text{C6/36}}$ ) for each virus *inocula* was determined by RT/qPCR as previously described [61] to assure the comparability of viral infection doses (data not shown). Figure 4 shows the combined mortality data for three experiments. The animals inoculated with mock, FGA/89, vBACDV1, vBAC-E<sub>402</sub>, vBAC-E<sub>405</sub>, vBAC-NS3<sub>209</sub> and vBAC-E<sub>402</sub>/NS3<sub>209</sub> viruses survived for the entire 21-day observation period. Mice in the groups



**Figure 2. Location of Envelope mutations.** (A) Representation of the full-length Envelope protein with domain I in red, domain II in yellow and domain III in blue. The stem region is represented in green and the transmembrane anchor in purple. (B) Detailed view of amino acids 333–495 showing the predicted regions H1<sup>pred</sup> and H2<sup>pred</sup> of stem, and domains TM1 and TM2 of the transmembrane anchor. The red arrows indicate the positions of mutations.

doi:10.1371/journal.pntd.0001624.g002

inoculated with FGA/89, vBACDV1, vBAC-E<sub>402</sub> and vBAC-E<sub>402</sub>/NS<sub>3209</sub> behave normally throughout the observation period, whereas animals from the groups infected with vBAC-E<sub>405</sub> and vBAC-NS<sub>3209</sub> displayed mild signs of disease (Figure S1). However, all the animals inoculated with vBAC-NS<sub>3435</sub>, vBAC-NS<sub>3480</sub>, vBAC-E<sub>405</sub>/NS<sub>3435</sub>, vBAC-E<sub>402</sub>/NS<sub>3480</sub> or vBAC-E<sub>402</sub>/NS<sub>3209</sub>/NS<sub>3480</sub> displayed more severe signs of disease. Almost all of the animals in these groups displayed encephalitis and partial paralysis of the hind limbs (Figure S1). In the groups for which deaths were recorded, 29% of the animals inoculated with vBAC-NS<sub>3435</sub> died and the mortality rate was even higher (61%) for mice inoculated with vBAC-NS<sub>3480</sub>. These results highlight the importance of the NS<sub>3435</sub> and NS<sub>3480</sub> mutations for the acquisition of the viral neurovirulent phenotype. Furthermore, mortality reached 73% in the group of animals inoculated with the double-mutant virus, vBAC-E<sub>405</sub>/NS<sub>3435</sub>, and inoculation with vBAC-E<sub>402</sub>/NS<sub>3480</sub> and vBAC-E<sub>402</sub>/NS<sub>3209</sub>/NS<sub>3480</sub> viruses killed 100% of the animals (Figure 4).

Thus, viruses containing the E<sub>402</sub> and E<sub>405</sub> mutations alone were no more virulent than vBACDV1. However, when these mutations were combined with the NS<sub>3480</sub> and NS<sub>3435</sub> mutations respectively, the resulting viruses, each of which carried two of the mutations found in the neuroadapted derivatives (FGA/NA d1d and FGA/NA P6; Table 1), were neurovirulent.

To assess the ability of the recombinant viruses (vBACDV1, vBAC-E<sub>402</sub> and vBAC-E<sub>405</sub>) to interact with Neuro 2A cell receptors, binding assays were carried out (Figure S2). No significant difference in binding capacity was observed between these viruses.

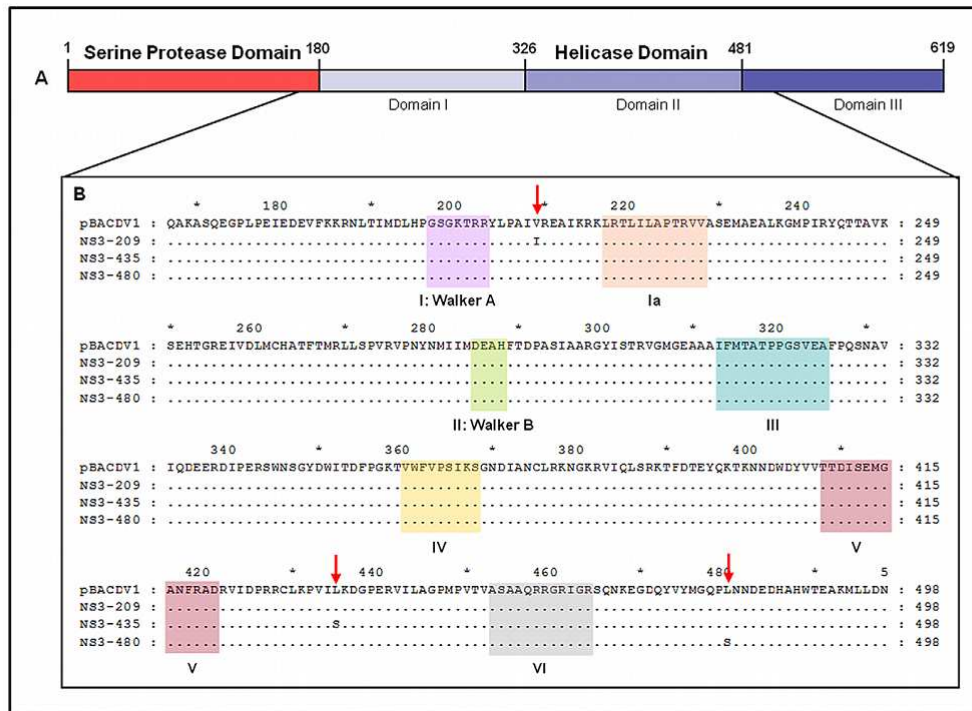
We previously showed that viral replication in the brains of mice inoculated with the FGA/89 and FGA/NA P6 strains of DENV-1 peaked nine days after inoculation [52]. To evaluate the replication properties of the recombinant viruses, brains of three

animals were collected from each group on the eight day after inoculation, before the onset of signs of disease and death. RT-qPCR analyses and viral titration performed on the brain tissues of animals inoculated with the panel of viruses showed that vBAC-E<sub>405</sub>/NS<sub>3435</sub>, vBAC-E<sub>402</sub>/NS<sub>3480</sub> and vBAC-E<sub>402</sub>/NS<sub>3209</sub>/NS<sub>3480</sub> produced the largest numbers of viral progeny and the highest levels of RNA synthesis (Figure 5) in the brain tissues of infected animals, consistent with the high frequency of encephalitis in these animals later in the incubation period (see Figure 4).

We investigated whether the neurovirulent phenotype resulted from an increase in viral fitness by carrying out *in vitro* growth kinetics studies on human and insect derived cells and quantifying protein synthesis. Levels of protein synthesis were significantly higher in Huh7.5 and C6/36 cells infected with vBAC-E<sub>405</sub>/NS<sub>3435</sub>, vBAC-E<sub>402</sub>/NS<sub>3480</sub> and vBAC-E<sub>402</sub>/NS<sub>3209</sub>/NS<sub>3480</sub> than in cells infected with vBACDV1 (Figure 6).

Results from a previous study ([63] and unpublished results) revealed that a number of innate immune response genes were differentially expressed in the brains of mice infected with avirulent and neurovirulent strains of DENV-1. Therefore, to analyze the influence of individual mutations on the ability of recombinant viruses to induce innate immunity genes, a subset of genes representing several major pathways [interferon signaling (Irf1 - interferon regulatory factor 1), interferon alpha and beta, antigen presentation (Psmβ8 - proteasome subunit beta type 8), protein ubiquitination pathway (Usp18 - ubiquitin specific protease 18), complement system (C1r - component 1, r subcomponent) and chemokine (CCL5 - chemokine ligand 5-C-C motif)] were selected for analyses. RNAs extracted from brain tissues obtained 8 days after infection, were subjected to amplification with specific primers for these genes, and the RT-qPCR signals obtained were normalized with respect to the signal for murGAPDH (Figure 7).





**Figure 3. Location of NS3 mutations.** (A) Representation of the full-length NS3 protein with the serine protease domain in red and the helicase domain in blue, with different shades of blue fused to represent the various subdomains. (B) Detailed view of amino acids 167–498, encompassing subdomains I and II of the helicase. Motifs conserved in helicase superfamily 2 are indicated in different colors and labeled. The red arrows indicate the positions of mutations.  
doi:10.1371/journal.pntd.0001624.g003

Consistent with the virulence (Figure 4) and viral load studies (Figure 5), levels of expression for all of the host genes shown in Figure 7 were significantly higher in animals infected with FGA/NA d1d, FGA/NA P6 (data not shown) or any of the recombinant viruses containing double and triple mutations (vBAC-E<sub>402</sub>/NS<sub>3480</sub>, vBAC-E<sub>405</sub>/NS<sub>3435</sub> and vBAC-E<sub>402</sub>/NS<sub>3209</sub>/NS<sub>3480</sub>) than in mock-infected or vBACDV1-infected animals.

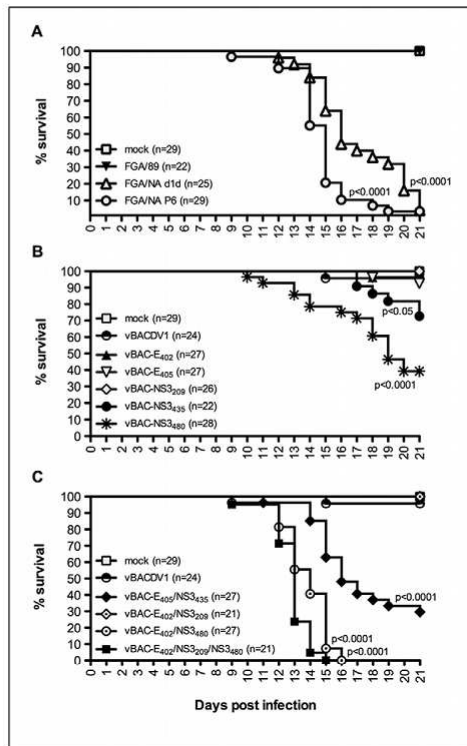
To discard an eventual mouse to mouse variation due to the outbred nature of the mice used in this study, and confirm the role of the critical residues responsible for increased viral load and pathogenesis, single animals were euthanized at various time points during infection (6, 8 and 10 dpi) and individual mouse CNS and spinal cord tissues were analyzed. Viral RNA synthesis, viral load curves and modulation of innate immune response genes were correlated with disease and death of the animals infected with vBAC-E<sub>402</sub>/NS<sub>3209</sub>/NS<sub>3480</sub> compared to mock-infected or vBACDV1-infected animals (Figure S3).

We also evaluate the target cells and the damage caused by virus infection in the CNS of these mice, by carrying out histological analyses of brain tissues. Brain tissue collected (10<sup>th</sup> dpi), from animals infected with neuroadapted (FGA/NA d1d and FGA/NA P6) or recombinant viruses, displayed moderate to severe men-

ingitis. The degree of tissue injury observed (data not shown) was consistent with viral RNA replication, viral load (Figure 5) and the severity of infection as determined by mortality rate (Figure 4).

## Discussion

Several studies have provided support for the hypothesis that viral virulence determinants play a role in dengue pathogenesis and vector transmissibility [71–73]. In this study we focused on determining how point mutations, acquired during the adaptation of DENV to mice increase viral fitness *in vitro* and *in vivo*, and exert their effects on mice neuropathogenesis. We used reverse genetics techniques to sample individual mutations found in two independently obtained newborn mouse-adapted isolates of DENV-1 [51–52]. Comparisons of the genomes of the parental (FGA/89) and neuroadapted variants of DENV-1 (FGA/NA d1d and FGA/NA P6) suggested that acquired mutations in the genes encoding E and NS3 might be responsible for the neurovirulence of these mouse-adapted strains. To test the role of these mutations in viral fitness and virulence, we created a panel of non-mouse adapted infectious clone-derived viruses with the E mutations (E<sub>402</sub> Phe to Leu and E<sub>405</sub> Thr to Ile) and NS3 mutations (NS<sub>3209</sub> Val to Ile, NS<sub>3435</sub> Leu



**Figure 4. Newborn mice survival after i.c. inoculation with DENV-1 variants.** (A) Comparison of mock, FGA/89 and neurovirulent strains, FGA/NA d1d and FGA/NA P6, (B) Comparison of mock, vBACDV1 and single-mutant recombinant viruses, (C) Comparison of mock, vBACDV1 and double- and triple-mutant recombinant viruses. Data from three independent experiments were pooled and plotted as Kaplan-Meier survival curves and then analyzed by log-rank (Mantel-Cox) multiple comparison tests, the *p* value for comparisons between FGA/89 and neuroadapted viruses, or vBACDV1 and the corresponding recombinant virus are indicated, and *n* is the total number of mice per group. doi:10.1371/journal.pntd.0001624.g004

to Ser and NS3<sub>480</sub> Leu to Ser) present separately, in paired or in group of three mutations, as in the empirically adapted isolates. Both of the E mutations studied mapped to the region outside the ectodomain and the three NS3 mutations studied here are located in the helicase region of NS3.

The positions of the mutations detected in the neuroadapted isolates (E<sub>402</sub> and E<sub>405</sub> – Figure 2) were not consistent with a change in affinity for the receptor. Indeed, the recombinant viruses carrying these mutations had the same binding affinity for Neuro2A cells as the infectious clone-derived virus. We therefore conclude that the mechanism by which E protein mutations increases virulence involves critical steps occurring after viral attachment (fusion/assembly/release).

Chen and coworkers [74] reported similar results concerning the effect of mutations affecting this domain of E protein on

neurovirulence in mice. They used chimeric DENV-4 carrying the C-prM-E genes of DENV-3 to show that a mutation at E<sub>406</sub> (substitution of a Lys for the WT Glu) increased the neurovirulence of a DENV-4/DENV-3 chimera.

Lin and coworkers [68], using site-directed mutagenesis and functional assays, demonstrate the involvement of the EH1 and EH2 domains of the E protein in DENV assembly and cell entry. Substitutions at positions E<sub>401</sub> (Met to Pro), E<sub>405</sub> (Thr to Pro), E<sub>408</sub> (Gly to Pro) and E<sub>412</sub> (Met to Pro) in the EH1 domain affected the assembly of DENV VLPs, probably due to interference with prM-E heterodimerization. The authors hypothesized that mutations mapping to the N-terminal EH1 domain affected the association of the stem region with the viral membrane altering curving and bending during the assembly in the ER.

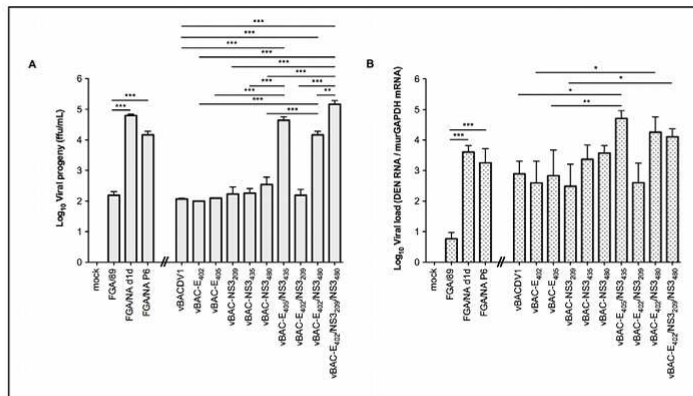
The NS3<sub>209</sub> mutation, which was co-selected with the NS3<sub>480</sub> in FGA/NA P6, had no apparent effect on virulence in our studies. The triple mutant recombinant virus (E<sub>402</sub>/NS3<sub>209</sub>/NS3<sub>480</sub>) gave higher viral RNA levels and virus titers in the mouse CNS 8 dpi than the double mutant (E<sub>402</sub>/NS3<sub>480</sub>), but both viruses killed 100% of the animals by days 15 and 16 post infection, respectively.

The recombinant viruses harboring mutations at residues NS3<sub>435</sub> and NS3<sub>480</sub>, located in the helicase subdomain 2, after motifs V and VI (Figure 3), respectively, displayed an alteration of replicative capacity (*in vitro* and *in vivo*) and were neurovirulent in mice. It has been reported that a substitution at position 249 (Thr to Pro) of the NS3<sub>hel</sub> in West Nile virus confers a highly virulent phenotype on strains usually only weakly virulent in American crows [75]. This region is involved in RNA binding and ATP hydrolysis and is required to drive the helicase along its nucleic acid substrate [76]. The presence of mutations in these regions may affect the activity of the helicase, increasing replication efficiency, through either a direct effect on helicase activity itself or through interaction with other viral or cellular proteins. Sampath and colleagues [46] carried out a structure-based mutational analysis and proposed an “inchworm” model of DENV NS3 translocation and unwinding activity. They suggested that the pocket next to DENV-2 NS3 Ile<sub>365</sub> (tip of domain II) would act as a “helix opener” disrupting hydrogen bonds at the fork. The basic concave face between domains II and III would act as “the translocator” in this model, by binding dsRNA ahead of the fork. The NS3<sub>480</sub> mutation maps to this concave face, the NS3<sub>435</sub> mutation maps to domain III, and both may therefore enhance dsRNA binding and modulate helicase activity.

Grant and coworkers [54] recently described a DENV-2 strain causing lethal infections in immunocompromised AG129 mice. One critical virulence determinant at the NS4B<sub>52</sub> protein had been identified. By reverse genetics, these authors demonstrated that the replacement of a Leu residue by a Phe residue, at this position, converted a non-virulent strain into a strain causing 80% lethality and increased viremia independently of the host type I interferon response. Physical interaction between NS4B (located in the ER lumen) and NS3 (located on the cytoplasmic face of the ER) is unlikely, but the authors hypothesized that a transient interaction could occur before polyprotein processing, thereby modulating DENV replication and implicating NS3 in this process. They also demonstrated that the NS4B<sub>52</sub> substitution enhances viral RNA synthesis in mammalian cells but not in C6/36 insect cells.

The non-mouse adapted infectious clone-derived viruses with only the E mutations identified in this study (E<sub>402</sub> and E<sub>405</sub>) had no higher binding affinity to Neuro2A cells receptor(s) or higher levels of viral RNA synthesis, viral load (*in vitro* and *in vivo*) and neurovirulence in mice than vBACDV1. However, the combination of these mutations with NS3<sub>hel</sub> mutations (E<sub>405</sub>/NS3<sub>435</sub>, E<sub>402</sub>/



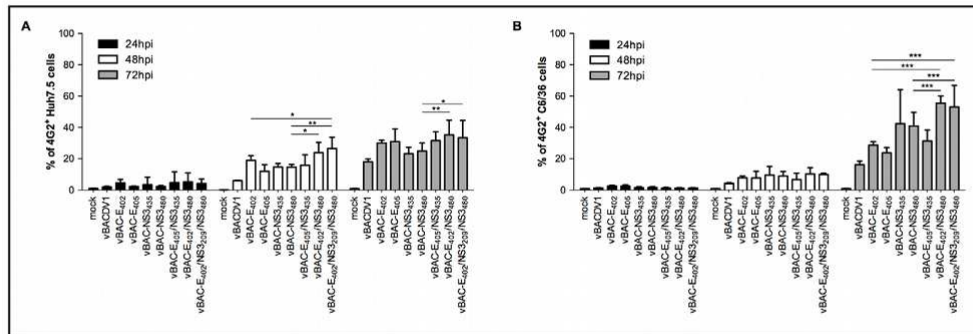


**Figure 5. DENV detection at 8 dpi in the brains of mice inoculated with DENV-1 variants.** (A) Viral progeny numbers in the mice CNS were determined by titration in C6/36 cells. (B) Viral RNA levels in the mouse CNS were determined by RT-qPCR with normalization against levels of murGAPDH mRNA. Data were log transformed and analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's correction for multiple testing and the values presented are the means  $\pm$  SD of three different experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ . A gap was inserted into the x axis to facilitate data interpretation, by grouping mouse-adapted strains and non mouse-adapted recombinant viruses and their corresponding controls. The significance bars correspond to comparisons between viruses with the mutations at same positions. doi:10.1371/journal.pntd.0001624.g005

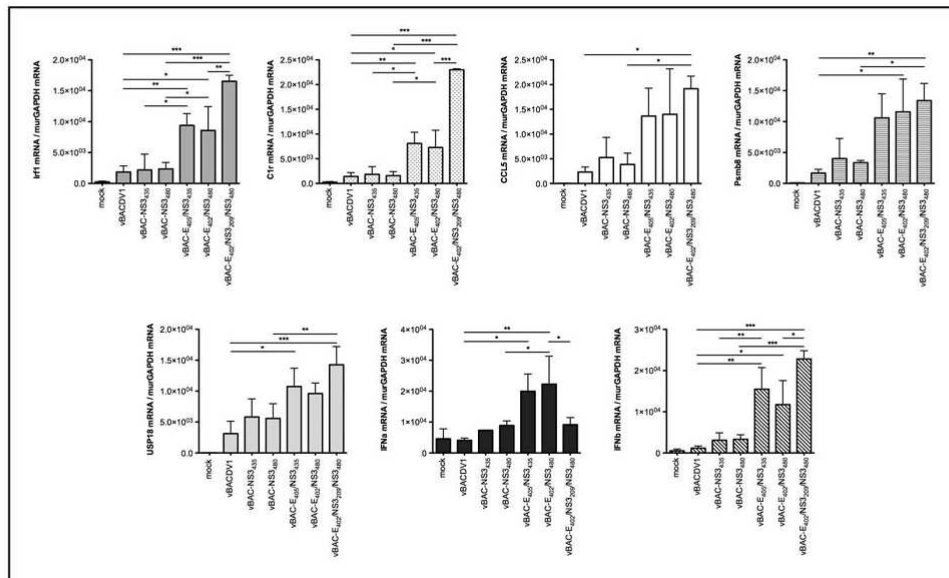
NS3<sub>480</sub> and E<sub>402</sub>/NS3<sub>209</sub>/NS3<sub>480</sub>, altered viral replicative capacity across other tissue (spinal cord) and cell types (Huh7.5 and C6/36 cells) and resulted in a highly neurovirulent phenotype in mice.

The pathological outcome of an infection is determined by the balance between the host response to infection and the ability of the infectious agent to escape from this response and multiply in the host. As part of this dynamic interaction, the host responses to some infections, including DENV infections, may contribute to the pathophysiology of disease. We have shown that high levels of replication of genetically defined DENV result in the upregulation of genes induced by type I IFN (IFN- $\alpha/\beta$ ), consistent with previous data from non human primates [77] and primary cultures of human cells [78].

In a previous study, we investigated the effect of DENV-1 infection on the transcription profile of CNS of mice. The Ube2l6 gene, which encodes an ubiquitin conjugate enzyme, was found to be up regulated in animals infected with the FGA/89 and with a neuroadapted derived strain FGA/NA a5c, with fold changes of 2.59 and 4.73, respectively, eight dpi ([63] and unpublished results). In a recent study based on the use of a high-throughput two hybrid assay, a human cellular protein, with a similar function, UBE2l (an ubiquitine conjugate enzyme), was found to interact with the DENV NS2B, NS4B and NS5 proteins, and siRNA targeting of this gene inhibited DENV replication [79]. As FGA/NA d1d and FGA/NA a5c differ by only three amino-acid substitutions in the E protein, we will investigate further the modulation of the Ube2l6 protein and its interaction with the



**Figure 6. In vitro growth kinetics on human and mosquito derived cells.** (A) Growth kinetics in Huh7.5 cells. (B) Growth kinetics in C6/36 cells. Infected cells were assessed by flow cytometry. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's correction for multiple testing and the values presented are the means  $\pm$  SD of three different experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ . doi:10.1371/journal.pntd.0001624.g006



**Figure 7. Levels of immunity genes mRNAs in mice brains collected 8 days after infection.** The x axis shows DENV-1 variants and the y axis shows the relative levels of mRNAs detected with respect to murGAPDH mRNA. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni correction and the values presented are the means  $\pm$  SD of three different experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ . The significance bars correspond to comparisons between viruses that recover the virulent phenotype. doi:10.1371/journal.pntd.0001624.g007

replication complex during infection with the recombinant viruses generated in this study. Transcript levels for Usp18, which functions as an ubiquitin cycle enzyme, were positively correlated with higher levels of replication in animals infected with the strains vBAC-E<sub>405</sub>/NS3<sub>435</sub>, vBAC-E<sub>402</sub>/NS3<sub>480</sub> and vBAC-E<sub>402</sub>/NS3<sub>209</sub>/NS3<sub>480</sub>.

We demonstrated here that single mutations in the DENV-1 E protein and NS<sub>3<sub>hel</sub></sub> domain increase viral fitness, both *in vitro* (human and mosquito-derived cells) and *in vivo*, facilitating early virus emergence during mouse infection consistent with a major role in DENV pathogenesis.

In a context of limited knowledge of the molecular basis of dengue pathogenesis, our results could contribute to the establishment of attenuation strains for vaccine development, and provide insights into virus/host interactions and new information about the mechanisms of dengue pathogenesis.

### Supporting Information

**Figure S1 Newborn mice morbidity after i.c. inoculation with DENV-1 variants.** The graphs show the cumulative signs of disease from three independent biological replicates. (A) Comparison of mock, FGA/89 and neurovirulent strains FGA/NA d1d and FGA/NA P6, (B) Comparison of mock, vBACDV1 and single-mutant recombinant viruses, (C) Comparison of mock, vBACDV1 and double- and triple-mutant recombinant viruses. (TIF)

**Figure S2 Assay of the binding of vBACDV1, vBAC-E<sub>402</sub> and vBAC-E<sub>405</sub> recombinant viruses to Neuro-2a cells.**

Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunn's multiple comparison test and values are expressed as means  $\pm$  SD of three different experiments. \*  $p < 0.05$ .

(TIF)

**Figure S3 *In vivo* growth kinetics in CNS and spinal cord tissues of individual mice after i.c. inoculation with mock, vBACDV1 and vBAC-E<sub>402</sub>/NS3<sub>209</sub>/NS3<sub>480</sub>.** (A) Viral progeny numbers in the CNS of individual mice were determined by titration in C6/36 cells. (B) Levels of mRNAs of innate immune genes from CNS of individual mice were determined by RT-qPCR with normalization against levels of murGAPDH mRNA. (C) Viral RNA levels in the spinal cord tissue of individual mice were determined by RT-qPCR with normalization against levels of murGAPDH mRNA. #1, #2 and #3 represent each individual animal collected for each respective time point (6, 8 and 10 dpi). (TIF)

**Table S1 Summary of amino acid sequence differences between vBACDV1 and the GenBank-deposited sequences of BR/90 (used to generate clone pBACDV1), FGA/89 (parental virus used for neuroadaptation), FGA/NA d1d and FGA/NA P6 (neuroadapted variants from FGA/89).**

(DOC)

### Acknowledgments

The authors would like to thank Ana Luiza P. Mosimann for fruitful discussion, Juliano Bordignon for critical reading of the manuscript,



Guilherme Ferreira Silveira for flow cytometry and statistical analyses, and Vanessa Stella and Giovanni A. C. A. Mazzarotto, from Instituto Carlos Chagas (ICC-FIOCRUZ/PR), for technical support and collaboration in cell culture and animal experiments, respectively. We also thank Ana Paula Camargo Martins and Marina Luise Viola de Azevedo, from Universidade Católica do Paraná (PUC/PR), for technical assistance with histological assays.

## References

- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM (1990) Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 44: 649–688.
- Rice CM (1996) Flaviviridae: the viruses and their replication. p. 931–960. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*, 3rd ed, Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.
- Khromykh AA, Meka H, Guyatt KJ, Westaway EG (2001) Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *J Virol* 75: 6719–6728.
- Alvarez DE, De Lella Ezcurra AL, Fucito S, Gamarnik AV (2005) Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology* 339: 200–212.
- Alvarez DE, Filomatori CV, Gamarnik AV (2008) Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3'UTRs. *Virology* 375: 223–235.
- Lodeiro MF, Filomatori CV, Gamarnik AV (2009) Structural and functional studies of the promoter element for dengue virus RNA replication. *J Virol* 83: 993–1008.
- Rothman AL, Ennis FA (1999) Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology* 257: 1–6.
- Kuno G (2003) Serodiagnosis of flaviviral infections and vaccinations in humans. *Adv Virus Res* 61: 3–65.
- Solomon T, Dung NM, Vaughn DW, Kneen R, Thao LT, et al. (2000) Neurologic manifestations of dengue infection. *Lancet* 355: 1053–1059.
- Nogueira RMR, Filippis AMB, Coelho JCO, Sequeira PC, Schatzmayr HG, et al. (2002) Dengue virus in Central Nervous System (CNS) in Brazil. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 33: 68–71.
- Dominguez RB, Kuster GW, Onuki-Castro FL, Souza VA, Levi JE, et al. (2007) Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. *J Neurol Sci* 267: 36–40.
- Ling LM, Wilder-Smith A, Leo YS (2007) Fulminant hepatitis in dengue haemorrhagic fever. *J Clin Virol* 38: 265–268.
- Webster DP, Farrar J, Rowland-Jones S (2009) Progress towards a dengue vaccine. *Lancet Infect Dis* 9: 678–87.
- Wilder-Smith A, Ooi EE, Vasudevan SG, Gubler DJ (2010) Update on dengue: epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development. *Curr Infect Dis Rep* 12: 157–64.
- Murphy BR, Whitehead SS (2011) Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annu Rev Immunol* 29: 587–619.
- Kurane I, Ennis FA (1994) Cytotoxic T lymphocytes in dengue virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 189: 93–108.
- Halstead SB, O'Rourke EJ (1977) Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leucocytes. *Nature* 265: 739–741.
- Halstead SB (1988) Pathogenesis of dengue: Challenges to molecular biology. *Science* 239: 46–481.
- Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL (2004) Dengue Viral Infections. *Postgrad Med J* 80: 588–601.
- Murphy BR, Whitehead SS (2011) Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annu Rev Immunol* 29: 587–619.
- Dejnirattai W, Jumnainsong A, Osirisakul N, Fitton P, Vasanaawathana S, et al. (2010) Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science* 328: 745–748.
- Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, et al. (1997) Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 230: 244–251.
- Mangada MNM, Igarashi A (1998) Molecular and *in vitro* analysis of eight dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. *Virology* 244: 458–466.
- Leimeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, et al. (1999) Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. *J Virol* 73: 4738–4747.
- Duarte Dos Santos CN, Rocha CF, Cordeiro M, Fragos SP, Rey F, et al. (2002) Genome analysis of dengue type-1 virus isolated between 1990 and 2001 in Brazil reveals a remarkable conservation of the structural proteins but amino acid differences in the non-structural proteins. *Virus Res* 90: 197–205.
- Kielian M (2006) Class II virus membrane fusion proteins. *Virology* 344: 38–47.
- Chen Y, Maguire T, Marks RM (1996) Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *J Virol* 70: 8765–8772.
- Huerta V, Chinae G, Fleitas N, Sarría M, Sánchez J, et al. (2008) Characterization of the interaction of domain III of the envelope protein of dengue virus with putative receptors from CHO cells. *Virus Res* 137: 225–234.
- Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC (1995) The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375: 291–298.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC (2004) Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427: 313–319.
- Stiasny K, Fritz R, Pangerl K, Heinz FX (2011) Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. *Amino Acids* 41: 1159–1163.
- Roehrig JT, Bolin RA, Kelly RG (1998) Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. *Virology* 246: 317–328.
- Wahala WM, Kraus AA, Haymore LB, Accavitti-Loper MA, de Silva AM (2009) Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody. *Virology* 392: 103–113.
- Prestwood TR, Prigozhin DM, Sharar KL, Zellweger RM, Shrestha S (2008) A Mouse-Passaged Dengue Virus Strain with Reduced Affinity for Heparan Sulfate Causes Severe Disease in Mice by Establishing Increased Systemic Viral Loads. *J Virol* 82: 8411–8421.
- Assenberg R, Mastrangelo E, Walter TS, Verma A, Milani M, et al. (2009) Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. *J Virol* 83: 12895–12906.
- Bollati M, Alvarez K, Assenberg R, Baronti C, Canard B, et al. (2010) Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Res* 87: 125–148.
- Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Binov VM (1989) Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res* 17: 4713–4729.
- Wengler G, Wengler G (1991) The carboxy-terminal part of the NS3 protein of the West Nile flavivirus can be isolated as a soluble protein after proteolytic cleavage and represents an RNA-stimulated NTPase. *Virology* 184: 707–715.
- Chen CJ, Kuo MD, Chien LJ, Hsu SL, Wang YM, et al. (1997) RNA protein interactions: involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of Japanese encephalitis virus genomic RNA. *J Virol* 71: 3466–73.
- Li H, Clum S, You S, Er KR, Padmanabhan R (1997) The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J Virol* 73: 3108–3116.
- Cui T, Sugrue RJ, Xu Q, Lee AK, Chan YC, et al. (1998) Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. *Virology* 246: 409–417.
- Khromykh AA, Sedlak PL, Westaway EG (1999a) transComplementation analysis of the flavivirus Kunjin NS5 gene reveals an essential role for translation of its N-terminal half in RNA replication. *J Virol* 73: 9247–9255.
- Khromykh AA, Sedlak PL, Guyatt KJ, Hall RA, Westaway EG (1999b) Efficient trans-complementation of the flavivirus Kunjin NS5 protein but not of the NS1 protein requires its coexpression with other components of the viral replicase. *J Virol* 73: 10272–10280.
- Lindénbach BD, Rice CM (2003) Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* 59: 235–289.
- Xu T, Sampath A, Chao A, Wen D, Nanao M, et al. (2005) Structure of the Dengue Virus Helicase/Nucleoside Triphosphatase Catalytic Domain at a Resolution of 2.4 Å. *J Virol* 79: 10278–10288.
- Sampath A, Xu T, Chao A, Luo D, Lescar J, et al. (2006) Structure-Based Mutational Analysis of the NS3 Helicase from Dengue Virus. *J Virol* 80: 6686–6690.
- Rothman AL (2011) Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol* 11: 532–543.
- Kapoor M, Zhang L, Ramachandra M, Kusukawa J, Eiber KE, et al. (1995) Association between NS3 and NS5 proteins of DENV2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *J Biol Chem* 270: 19100–19106.
- Westaway EG, Mackenzie JM, Khromykh AA (2003) Kunjin RNA replication and applications of Kunjin replicons. *Adv Virus Res* 59: 99–140.
- Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG (2006) Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol* 87: 2605–2614.
- Desprès P, Frenkiel MP, Ceccaldi PE, Duarte dos Santos CN, Deubel V (1998) Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent dengue viruses. *J Virol* 72: 823–829.
- Bordignon J, Strotman DM, Mosimann ALP, Probst CM, Stella V, et al. (2007) Dengue neurovirulence in mice: identification of molecular signatures in E and NS3 helicase domains. *J Med Virol* 79: 1506–1517.
- Duarte dos Santos CN, Frenkiel MP, Courageot MP, Rocha CF, Vazeille-Falcoz MG, et al. (2000) Determinants in the envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. *Virology* 274: 292–308.

54. Grant D, Tan GK, Qing M, Ng JK, Yip A, et al. (2011) A single amino acid in nonstructural NS4B protein confers virulence to Dengue virus in AG129 mice through enhancement of viral RNA synthesis. *J Virol* 85: 7775–7787.
55. Davis CT, Galbraith SE, Zhang S, Whiteman MC, Li L, et al. (2007) A combination of naturally occurring mutations in North American West Nile virus nonstructural protein genes and in the 3' untranslated region alters virus phenotype. *J Virol* 81: 6111–6116.
56. Engel AR, Rumyantsev AA, Maximova OA, Speicher JM, Heiss B, et al. (2010) The neurovirulence and neuroinvasiveness of chimeric tick-borne encephalitis/dengue virus can be attenuated by introducing defined mutations into the envelope and NS5 protein genes and the 3' non-coding region of the genome. *Virology* 405: 243–252.
57. Suzuki R, Borba L, Duarte dos Santos CN, Mason PW (2007) Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1: characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1. *Virology* 326: 374–383.
58. Desprès P, Frenkiel MP, Deubel V (1993) Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. *Virology* 196: 209–219.
59. Gould EA, Clegg JCS (1985) Growth, titration and purification of Togaviruses. In: Mahy BWJ editor, *Virology: a practical approach*, Irl press, Washington, DC, pp 43–78.
60. Poersch CPO, Pavoni DP, Queiroz MH, Borba L, Goldenberg S, et al. (2005) Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. *J Clin Virol* 4: 272–277.
61. Silveira GF, Meyer F, Delfraro A, Mosimann AL, Coluchi N, et al. (2011) Dengue virus type 3 isolated from a fatal case with visceral complications induces enhanced proinflammatory responses and apoptosis of human dendritic cells. *J Virol* 85: 5374–5383.
62. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and 2-DDCt methods. *Methods* 25: 402–408.
63. Bordignon J, Probst CM, Mosimann ALP, Pavoni DP, Stella V, et al. (2008) Expression profile of interferon stimulated genes in central nervous system of mice infected with dengue virus type-1. *Virology* 377: 319–329.
64. Allison SL, Stiasny K, Stadler K, Mandl CW, Heinz FX (1999) Mapping of functional elements in the stem-anchor region of tick-borne encephalitis virus envelope protein E. *J Virol* 73: 5605–5612.
65. Chang GJ, Hunt AR, Holmes DA, Springfield T, Chiu TS, et al. (2003) Enhancing biosynthesis and secretion of pre-membrane and envelope proteins by the chimeric plasmid of dengue virus type 2 and Japanese encephalitis virus. *Virology* 306: 170–180.
66. Purdy DE, Chang GJ (2005) Secretion of noninfectious dengue virus-like particles and identification of amino acids in the stem region involved in intracellular retention of envelope protein. *Virology* 333: 239–250.
67. Hsieh SC, Liu JJ, King CC, Chang GJ, Wang WK (2008) A strong endoplasmic reticulum retention signal in the stem-anchor region of envelope glycoprotein of dengue virus type 2 affects the production of virus-like particles. *Virology* 374: 338–350.
68. Lin SR, Zou G, Hsieh SC, Qing M, Tsai WY, et al. (2011) The helical domains of the stem region of dengue virus envelope protein are involved in both virus assembly and entry. *J Virol* 85: 5159–5171.
69. Takegami T, Sakamuro D, Furukawa T (1995) Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS3 has RNA binding and ATPase activities. *Virus Genes* 9: 105–112.
70. Matusan AE, Pryor MJ, Davidson AD, Wright PJ (2001) Mutagenesis of the Dengue virus type 2 NS3 protein within and outside helicase motifs: effects on enzyme activity and virus replication. *J Virol* 75: 9633–9643.
71. Barnes WJ, Rosen L (1974) Fatal hemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a Pacific island. *Am J Trop Med Hyg* 23: 493–506.
72. Blaney JE, Jr., Manipon GG, Firestone CY, Johnson DH, Hanson CT, et al. (2003) Mutations which enhance the replication of dengue virus type 4 and an antigenic chimeric dengue virus type 2/4 vaccine candidate in Vero cells. *Vaccine* 21: 4317–4327.
73. Whitehorn J, Simmons CP (2011) The pathogenesis of dengue. *Vaccine* 29: 7221–7228.
74. Chen W, Kawano H, Men R, Clark D, Lai CJ (1995) Construction of Intertypic Chimeric Dengue Viruses Exhibiting Type 3 Antigenicity and Neurovirulence for Mice. *J Virol* 69: 5186–5190.
75. Brault AC, Huang CY, Langevin SA, Kinney RM, Bowen RA, et al. (2007) A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. *Nat Genet* 39: 1162–1166.
76. Tuteja N, Tuteja R (2004) Unraveling DNA helicases: Motif, structure, mechanism and function. *Eur J Biochem* 271: 1849–1863.
77. Sariol CA, Muñoz-Jordán JL, Abel K, Rosado LC, Pantoja P, et al. (2007) Transcriptional Activation of Interferon-Stimulated Genes but Not of Cytokine Genes after Primary Infection of Rhesus Macaques with Dengue Virus Type 1. *Clin Vaccine Immunol* 14: 756–766.
78. Warke RV, Martín KJ, Giaya K, Shaw SK, Rothman AL, et al. (2008) TRAIL Is a Novel Antiviral Protein against Dengue Virus. *J Virol* 82: 555–564.
79. Khadka S, Vangeloff AD, Zhang C, Siddavatam P, Heaton NS, et al. (2011) A physical interaction network of dengue virus and human proteins. *Mol Cell Proteomics* 10: M111.012187.