

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA LUIZA PAMPLONA MOSIMANN

CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM REPLICON E CLONE INFECCIOSO
DE UMA CEPA BRASILEIRA DE DENGUE SOROTIPO 3
(BR DEN3 290-02)

CURITIBA
2009

ANA LUIZA PAMPLONA MOSIMANN

CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM REPLICON E CLONE INFECCIOSO
DE UMA CEPA BRASILEIRA DE DENGUE SOROTIPO 3
(BR DEN3 290-02)

Tese apresentada ao curso 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 Nunes Duarte dos Santos

CURITIBA
2009

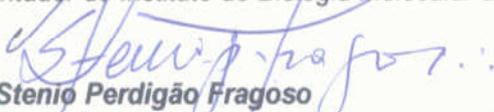
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

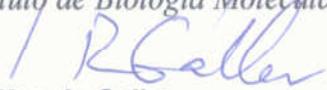
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

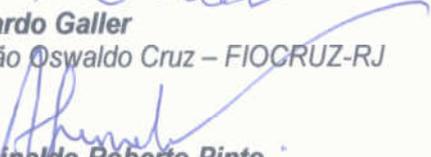
PARECER

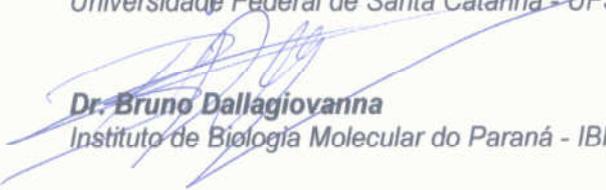
A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos
Orientador do Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP


Dr. Stenio Perdigão Fragoso
Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP


Dr. Ricardo Galler
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ-RJ


Dr. Aguinaldo Roberto Pinto
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC


Dr. Bruno Dallagiovanna
Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP

e tendo como suplentes,

Andréa Rodrigues Ávila
Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP

Dra. Sonia Mara Raboni
Universidade Federal do Paraná - UFPR

após argüir o(a) doutorando(a) **Ana Luiza Pamplona Mosimann**, em relação ao seu trabalho de tese intitulada: "**Construção e caracterização de um replicon e clone infeccioso de uma cepa brasileira de dengue sorotipo 3 (BR DEN3 290-02)**", é de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, dentro da área de concentração em **Biologia Celular e Molecular**.

A obtenção do título de Doutor está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste curso de pós-graduação.

Curitiba, 26 de maio de 2009


Silvio Sanches Veiga
Coordenador do Curso

Dedico este trabalho a meus pais, Léa e João, que com sua fé incondicional no meu potencial sempre me apoiam e não medem esforços para que eu possa realizar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Aos mestres

Agradeço à Doutora Claudia Nunes Duarte dos Santos, por ter aceitado me orientar, não desistindo frente aos obstáculos encontrados e envidando-se na viabilização do trabalho. Aos pesquisadores do Instituto Carlos Chagas, em especial aos Doutores Samuel Goldenberg, Marco Aurélio Krieger e Stenio Perdigão Fragoso por proporcionarem um ambiente de trabalho ideal para que a boa pesquisa seja realizada. Não tendo sido este meu projeto original, cabe a mim fazer um agradecimento especial às pessoas que deram início a esse projeto, sem as quais esse trabalho certamente não existiria e que confiaram em mim para dar seguimento ao mesmo. Meus sinceros agradecimentos à Doutora Claudia Nunes Duarte dos Santos, Luana de Borba e Doutor Peter W. Mason.

Aos colegas de trabalho

Agradeço a meus colegas de laboratório: Juliano Bordignon, Luana de Borba, Sonia M. Raboni, Vanessa Stella, Meri Bordignon Nogueira, Daisy M. Strottmann, Marina Reus Tassi de Araujo, Giovanny Camacho Antevêre Mazzarotto, Eleonora Campos, Suzana Carstensen, Guilherme Ferreira Silveira, Florencia Meyer, Federico Hoffmann, Meg C. de Castilho Costa, Mário Hüttener Queiroz, Camilla Nascimento da Costa, Aurélio Santo Zeferino, Paula Rodrigues Zanello, Lorena C. Pena, Micheli C. Coelho e Romine Bachmann Pigozzo pela amizade e ajuda prestada em diversos momentos, seja através de seu trabalho, conselhos, críticas, sugestões ou pela transmissão de seu conhecimento. Aos meus colegas do Instituto Carlos Chagas que compartilharam dessa jornada comigo e me ouviram e incentivaram quando precisei. Aos funcionários do setor de preparo, Nilson J. Fidencio, Vanessa Martins dos Santos, Tânia Rocio Schepainski e Rafael Ceolin Brito, por tornarem nossa vida mais fácil. Ao biólogo Paulo R. Clare Arauco, pela ajuda técnica no sequenciamento. Deixo também meu agradecimento aos funcionários da secretaria Luiz C. Casarotto, Edilaine Azevedo e Maria Cristina Prado Barreto e aos funcionários da manutenção Frederico Torres Martins e Leszek Gadja.

Aos amigos e familiares

Agradeço sobretudo ao meu marido, Juliano Bordignon, que certamente foi a pessoa mais presente e sem a qual eu jamais estaria aqui. Por fim, agradeço aos meus familiares e amigos, que souberam compreender minha ausência e sempre me apoiaram.

Aos órgãos de fomento

Agradeço à Capes, pelo auxílio financeiro.

“É impossível um homem aprender aquilo que ele acha que sabe”

Epictetus

RESUMO

Os vírus da dengue pertencem ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae* e são vírus ARN simples fita com um genoma de ~11kb. O seu genoma é flanqueado por regiões não codificadoras e codifica três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) as quais são traduzidas em uma poliproteína e processadas pela protease viral e proteases do hospedeiro. Atualmente a dengue constitui a arbovirose mais comum que afeta os seres humanos, no entanto até o presente não existem tratamento específico ou vacinas disponíveis. As manifestações clínicas abrangem desde estados assintomáticos até a dengue hemorrágica/síndrome do choque por dengue. Os mecanismos envolvidos na patogênese da doença não são bem compreendidos e ainda representam um desafio. O desfecho parece ser o resultado de uma combinação de fatores virais e do hospedeiro. Nesse contexto o uso do sistema subgenômico de replicon e do clone infeccioso representam instrumentos de pesquisa poderosos, pois permitem o estudo de marcadores de virulência podendo contribuir para um melhor entendimento da patogênese da dengue e eventualmente dirigir intervenções tais como terapias antivirais. Eles possibilitam definir o papel de mutações nas proteínas virais, estudar o processo de replicação viral e inclusive testar drogas antivirais. Nosso objetivo foi gerar e caracterizar biologicamente o replicon e o clone infeccioso de um isolado clínico recente de dengue sorotipo 3. A fim de alcançar nosso objetivo primeiramente clonamos diferentes segmentos do genoma viral amplificados por RT-PCR em um vetor pGEM[®]-T-easy. Todos os clones foram sequenciados e utilizados na montagem do replicon e clone infeccioso em vetores de baixa cópia (pBAC e pAC) contendo o promotor da T7 ARN polimerase e uma sequência de ribozima. A maioria dos procedimentos de clonagem foi realizada na cepa Top10 de *E. coli*. Após a obtenção de um clone estável do replicon, esse foi utilizado na transcrição *in vitro* e transfecção de células C6/36 de mosquito. As células foram analisadas por imunofluorescência indireta com o uso de anticorpos policlonais anti-dengue 3 em diferentes tempos (48, 72, 96 e 120h) pós-transfecção. Os resultados mostraram que o replicon foi eficientemente transfectado e replicou nas células. Também foi possível observar que proteínas virais foram reconhecidas pelo anticorpo policlonal, no entanto nenhuma partícula viral foi produzida. Infelizmente nós ainda não tivemos sucesso na montagem do clone infeccioso, porém esse trabalho assim como a inserção de marcadores moleculares no sistema de replicon ainda estão em progresso.

Palavras chave: *Flavivirus*. *Vírus da Dengue sorotipo 3*. Replicon. Clone infeccioso.

ABSTRACT

Dengue viruses belong to the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae* and are single stranded RNA viruses with a genome of ~11kb. Its genome is flanked by non-coding regions and codes for three structural (C, prM and E) and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5) which are translated into a polyprotein and processed by viral and host proteases. Currently dengue is considered the most common arboviral disease afflicting men, however there are no specific treatment or efficient vaccines available yet. The clinical manifestations can range from asymptomatic to dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome. The mechanisms involved in the disease pathogenesis are not well understood and are still a challenge. The outcome seems to be the result of a combination of viral and host factors. In this context the use of the subgenomic replicon system and the infectious clone system represent powerful research instruments as they allow the study of molecular markers of virulence, contributing to a better understanding of dengue pathogenesis and eventually directing interventions such as antiviral therapy. They can be used: to define the role of mutations in the viral proteins, to study viral replication and even to test antiviral drugs. Our objective was to generate and characterize biologically a replicon and infectious clone from a recent clinical isolate of dengue virus serotype 3. To achieve our objective we first cloned different RT-PCR fragments from the viral genome in the pGEM[®]-T-easy vector. All clones were sequenced and used to assemble the replicon and the infectious clone in low copy vectors (pBAC and pAC) containing a T7 RNA polymerase promoter and a ribozyme sequence. Most cloning procedures were done using Top10 *E. coli* strain. After the generation of a stable replicon clone, it was used for *in vitro* transcription and transfection in C6/36 mosquito cells. Cells were analyzed by indirect immunofluorescence using anti-dengue 3 polyclonal antibodies at different time points (48, 72, 96 and 120h) posttransfection. The results showed that the replicon was efficiently transfected and replicated in the cells. We also observed that the viral proteins could be recognized by the polyclonal antibody, but no virus particle was produced. Unfortunately we have not yet succeeded to assemble the infectious clone, but this as well as the insertion of molecular markers in the replicon system, are works still in progress.

Key words: *Flavivirus*. *Dengue virus serotype 3*. Replicon. Infectious clone.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação esquemática da organização do genoma do vírus da dengue.....	17
FIGURA 2 - Representação esquemática da topologia da poliproteína do vírus da dengue na membrana do retículo endoplasmático.....	18
FIGURA 3 - Resposta imune à infecção com vírus dengue e período de coleta de amostras de sangue sugerido para realização do isolamento viral e sorologia.....	24
FIGURA 4 - Mapa ilustrando a distribuição mundial da dengue e <i>Aedes aegypti</i> em 1998.....	25
FIGURA 5 - Ciclos de transmissão da dengue.....	26
FIGURA 6 - Estratégia de amplificação utilizada para montagem do replicon e do clone infeccioso da cepa BR DEN3 290-02.....	37
FIGURA 7 - Representação esquemática dos vetores de baixa cópia utilizados nos procedimentos de clonagem: #49pAC (A) e #50pBAC (B).....	39
FIGURA 8 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose da amplificação por RT-PCR dos diferentes segmentos genômicos da cepa BR DEN3 290-02.....	48
FIGURA 9 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose dos clones positivos minipreparados e de sua digestão (⊗) com as endonucleases SacI e SacII.....	49
FIGURA 10 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose mostrando as etapas envolvidas na obtenção do clone pBAC+D3/290NheI/SphI.....	51
FIGURA 11 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose das etapas para a obtenção do clone pAC+D3/290SphI/Clal.....	52
FIGURA 12 - Representação esquemática dos clones intermediários no processo para obtenção do clone pBAC+D3/290NheI/Clal.....	53
FIGURA 13 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose das etapas para a obtenção do clone pBAC+D3/290NheI/Clal.....	54
FIGURA 14 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose das etapas para a obtenção do clone pAC+D3/290XmaI/NheI.....	55
FIGURA 15 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose das etapas para a obtenção do clone pAC+D3/290BspTI/NheI.....	56
FIGURA 16 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose das etapas para a obtenção dos clones pAC+D3/290MluI/449/NheI e Replicon BR DEN3 290-02.....	57
FIGURA 17 - Representação esquemática dos clones intermediários no processo de obtenção do clone pAC+D3/290MluI/449/D3.29.....	59
FIGURA 18 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose das etapas para a obtenção dos clones pAC+D3/290MluI/449/D3.29 e Replicon BR DEN3 290-02.....	60
FIGURA 19 - Representação esquemática dos clones intermediários no processo de obtenção do clone do Replicon BR DEN3 290-02.....	61
FIGURA 20 - Preparação do clone do replicon para transfecção.....	62
FIGURA 21 - Imunofluorescência 48h pós-transfecção.....	63
FIGURA 22 - Imunofluorescência 72h pós-transfecção.....	63
FIGURA 23 - Imunofluorescência 96h pós-transfecção.....	64
FIGURA 24 - Imunofluorescência 120h pós-transfecção.....	64
FIGURA 25 - Titulação pela técnica de formação de focos de infecção dos sobrenadantes das células transfectadas recolhidos 48h, 72h, 96h e 120h pós-transfecção.....	65
FIGURA 26 - Imunofluorescência 120h pós-transfecção.....	66
FIGURA 27 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose das etapas para a obtenção do clone pAC+D3/290MluI/BspTI.....	68
FIGURA 28 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose das etapas para a obtenção do clone pAC+D3/290BspTI/D3.29.....	69
FIGURA 29 - Representação esquemática da construção dos clones pAC+D3/290MluI/BspTI e pAC+D3/290BspTI/D3.29.....	70
FIGURA 30 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose das etapas para a obtenção do clone pAC+D3/290MluI/D3.48.....	72
FIGURA 31 - Representação esquemática das digestões (⊗) que precedem o passo de ligação <i>in vitro</i> para recuperação do clone infeccioso.....	73
FIGURA 32 - Preparação do clone infeccioso para transfecção.....	73
FIGURA 33 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose das etapas para a obtenção do clone pAC+D3/290MluI/D3.29.....	74

FIGURA 34 - Representação esquemática da construção do clone pAC+D3/290Mlul/D3.29.. 75

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - CLONES INFECCIOSOS DE VÍRUS DO GÊNERO <i>FLAVIVÍRUS</i>	30
QUADRO 2 - REPLICONS DE VÍRUS DO GÊNERO <i>FLAVIVÍRUS</i>	31
QUADRO 3 - TAMANHO ESPERADO DOS FRAGMENTOS LIBERADOS PELA DIGESTÃO COM SACI E SACII.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -D3	- anticorpos policlonais anti-dengue sorotipo 3
ADE	- aumento dependente de anticorpos (<i>antibody-dependent enhancement</i>)
ADN	- ácido deoxiribonucléico
α -E	- anticorpo monoclonal anti-proteína de envelope
α -mouse FITC	- anticorpo anti-camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína
α -mouse PA	- anticorpo anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina
α -NS1	- anticorpo monoclonal anti-proteína NS1
ARN	- ácido ribonucléico
ATCC	- coleção americana de culturas (<i>American type culture collection</i>)
ATPase	- adenosina trifosfatase (<i>adenosine triphosphatase</i>)
BCIP	- p-toluidina 5-bromo-4-cloro-indolilfosfato (<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, p-toluidine</i>)
BLAST	- <i>Basic local alignment search tool</i>
C	- capsídeo
CA	- Califórnia
Cat. No.	- número de catálogo
cDNA	- ADN complementar (<i>complementary desoxiribonucleic acid</i>)
CMV	- <i>Citomegalovírus</i>
CMVmp	- promotor mínimo de citomegalovírus (<i>minimal cytomegalovirus promoter</i>)
CS	- sequência conservada (<i>conserved sequence</i>)
d.C.	- depois de Cristo
DAPI	- 4',6'-diamidino-2 fenilindol (<i>4'-6-diamidine-2-phenyl indole</i>)
dATP	- 2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	- 2'-deoxicitidina 5'-trifosfato
DE	- Delaware
DEAE-dextran	- dietilaminoetil-dextran
DENV	- <i>vírus da Dengue (Dengue virus)</i>
dGTP	- 2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato
dNTP	- deoxinucleotídeos trifosfatados (<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>)
dTTP	- 2'-deoxitimidina 5'-trifosfato
E	- envelope
EUA	- Estados Unidos da América
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	- ensaio imunoenzimático (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FHD	- febre hemorrágica da dengue
GFP	- proteína fluorescente verde (<i>green fluorescent protein</i>)
GVCC	- genoma viral completo clonado
HDV	- <i>vírus da Hepatite delta (Hepatitis delta virus)</i>
HPA	- antígeno plaquetário humano (<i>human platelet antigens</i>)
HSP	- proteína de choque térmico (<i>heat shock protein</i>)
IA	- Iowa
IFI	- imunofluorescência indireta

IFN	- interferon
IPTG	- isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
IRES	- sítio de entrada interna do ribossomo (<i>internal ribosome entry site</i>)
JEV	- <i>vírus da Encefalite japonesa (Japanese encephalitis virus)</i>
KUNV	- <i>vírus Kunjin (Kunjin virus)</i>
L-15	- Leibovitz
LIV	- ligação <i>in vitro</i>
M	- membrana
MA	- Massachusetts
MBL	- lectina ligante de manose (<i>manose-binding lectin</i>)
MD	- Maryland
MO	- Missouri
MS	- Ministério da Saúde
MVEV	- <i>vírus da Encefalite de Murray Valley (Murray Valley encephalitis virus)</i>
NBT	- cloreto de nitroazul de tetrazólio (<i>nitro blue tetrazolium</i>)
NS	- não-estrutural
NTPase	- nucleotídeo trifosfatase (<i>nucleotide triphosphatase</i>)
NY	- Nova York
OH	- Ohio
OMS	- Organização Mundial da Saúde
ON	- Ontário
PCR	- reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	- potencial hidrogeniônico
prM	- precursora de membrana
qPCR	- PCR quantitativo (<i>quantitative PCR</i>)
RNC	- região não codificadora
rpm	- rotações por minutos
RT-PCR	- reação em cadeia da polimerase acoplada à transcrição reversa (<i>reverse transcription associated to polymerase chain reaction</i>)
RV	- região variável
SCD	- síndrome do choque da dengue
SDS	- dodecil sulfato de sódio (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SL	- estrutura em forma de grampo de cabelo (<i>stem-loop</i>)
TAP	- transportador associado com o processamento de antígenos (<i>transporter associated with antigen processing</i>)
TBEV	- <i>vírus da Encefalite transmitida por carrapatos (Tick borne encephalitis virus)</i>
TNF α	- fator de necrose tumoral alfa (<i>tumor necrose factor alpha</i>)
TX	- Texas
UAR	- a montante do AUG (<i>upstream AUG region</i>)
UTR	- região não codificadora (<i>untranslated region</i>)
VLPs	- partículas semelhantes a vírus (<i>virus-like particles</i>)
WI	- Wiscosin
WNV	- <i>vírus do Oeste do Nilo (West Nile virus)</i>
X-Gal	- 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo
YFV	- <i>vírus da Febre amarela (Yellow fever virus)</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 DENGUE.....	14
1.1.1 Histórico.....	14
1.1.2 O vírus.....	15
1.1.3 Ciclo do vírus da dengue.....	19
1.1.4 Apresentações clínicas da dengue.....	20
1.1.5 Patogênese da dengue.....	22
1.1.6 Diagnóstico da dengue.....	23
1.1.7 Epidemiologia.....	24
1.2 CLONES INFECCIOSOS E REPLICONS NO GÊNERO <i>FLAVIVÍRUS</i> ..	26
2 OBJETIVOS	32
2.1 OBJETIVO GERAL.....	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3 JUSTIFICATIVA	34
4 METODOLOGIA	35
4.1 SOLUÇÕES E MEIOS.....	35
4.2 RT-PCR.....	35
4.3 CLONAGEM.....	37
4.4 TRANSFORMAÇÃO DAS LIGAÇÕES E TRIAGEM DOS POTENCIAIS CLONES.....	39
4.5 MINIPREPARAÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES E VERIFICAÇÃO DO TAMANHO DO INSERTO.....	41
4.6 SEQUENCIAMENTO DOS CLONES POSITIVOS.....	42
4.7 CONSTRUÇÃO DO REPLICON E DO CLONE INFECCIOSO DA CEPA BR DEN3 290-02.....	43
4.8 TRANSCRIÇÃO <i>IN VITRO</i>	43
4.9 TRANSFEÇÃO.....	44
4.10 IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	45
4.11 TITULAÇÃO.....	46
5 RESULTADOS	48
5.1 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS SEGMENTOS DA CEPA BR DEN3 290-02 EM VETORES DE ALTA CÓPIA.....	48
5.2 CONSTRUÇÃO DO REPLICON DA CEPA BR DEN3 290-02.....	50
5.3 REAÇÕES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DAS CÉLULAS E TITULAÇÃO DO SOBRENADANTE DAS CULTURAS TRANSFECTADAS COM O REPLICON BR DEN3 290-02.....	62
5.4 CONSTRUÇÃO DO CLONE INFECCIOSO DA CEPA BR DEN3 290- 02.....	67
6 DISCUSSÃO	76
7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	86
REFERÊNCIAS	88
APÊNDICE A	106
APÊNDICE B	108
ANEXO A	112
ANEXO B	117

1 INTRODUÇÃO

1.1 DENGUE

1.1.1 Histórico

O registro mais antigo de uma doença que pode ser reconhecida como dengue consta de uma enciclopédia Chinesa publicada durante a Dinastia Chin (265 a 420 d.C.). Surtos de uma doença que assolou a Martinica em 1635 e o Panamá em 1699 apresentavam aspectos clínicos que poderiam ser relacionados com dengue (CAREY, 1971; GUBLER, 1998). No entanto, são do século dezoito os primeiros relatos mais detalhados sobre uma epidemia de uma doença semelhante à dengue, em 1780 na Filadélfia (EUA) (GUBLER, 1998; LAI; PUTNAK, 2007).

Em 1907, Ashburn e Craig relataram sua descoberta de que o agente etiológico da doença deveria ser de tamanho ultramicroscópico, pois era capaz de passar por um filtro que retinha organismos de até 0,05 μ . No início do século XX Siler, Hall e Hitchens (1926) confirmaram que mosquitos desempenhavam um papel importante na transmissão da doença e posteriormente Simmons, St. John e Reynolds (1931) identificaram o *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* como espécies transmissoras do vírus da dengue. Todavia, foi só em 1943 que o vírus foi isolado pela primeira vez (HOTTA, 1952) e logo em seguida reconhecida a existência de diferentes sorotipos (SABIN, 1952). Desde então, houve várias tentativas de se desenvolver uma vacina para doença (SABIN; SCHLESINGER, 1945; CAUFOUR *et al.*, 2001; GUIRAKHOO *et al.*, 2002; EDELMAN *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2003; RAVIPRAKASH *et al.*, 2003; SUN *et al.*, 2003; GUIRAKHOO *et al.*, 2004; PUTNAK *et al.*, 2005; DURBIN *et al.*, 2006; GUIRAKHOO *et al.*, 2006; KITCHENER *et al.*, 2006; SUN *et al.*, 2006; BLANEY JR. *et al.*, 2007; HOLMAN *et al.*, 2007; KHANAM *et al.*, 2007; MATEU *et al.*, 2007).

A partir da segunda guerra mundial, o aumento do deslocamento humano e a urbanização não planejada, devido ao aumento de habitantes em áreas urbanas, constituíram instrumentos eficientes de disseminação dos mosquitos vetores e

consequentemente da dispersão dos vírus da dengue, levando à hiperendemicidade que culminou com a emergência de formas mais graves da doença. Os primeiros casos de dengue hemorrágica (FHD) foram descritos no sudeste da Ásia nos anos de 1953 e 1954 (HAMMON; RUDNICK; SATHER, 1960; GUBLER; TRENT, 1993; GUBLER, 1998; LAI; PUTNAK, 2007).

Em 1947 a Organização Pan-Americana da Saúde lançou um programa de erradicação do *Aedes aegypti* e obteve a adesão da maioria dos países do continente americano. Anos depois, com a descontinuação desse programa e a re-infestação desses países com o mosquito vetor, além das mudanças sociais supracitadas, a dengue que nessas regiões era até então infrequente, passou a ser considerada um problema de saúde pública. Aos poucos os sorotipos dos vírus dengue foram re-introduzidos nas Américas: em 1953 dengue sorotipo 2 (DENV2), em 1963 dengue sorotipo 3 (DENV3), em 1971 dengue sorotipo 1 (DENV1) e em 1981 dengue sorotipo 4 (DENV4). Também em 1981 foram notificados os primeiros casos de FHD nas Américas. Atualmente a situação na região é de hiperendemicidade com a cocirculação de mais de um sorotipo em vários países do continente americano, inclusive no Brasil (GUBLER; TRENT, 1993; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2007).

1.1.2 O vírus

O vírus da Dengue está classificado no gênero *Flavivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*, que engloba outros dois gêneros: *Pestivirus* e *Hepacivirus*. O nome *Flavivirus* (do latim *flavus* = amarelo) deriva de um dos sintomas clássicos da febre amarela, vírus protótipo da família, a icterícia. Existem quatro sorotipos de dengue: DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4. O genoma viral é constituído de ácido ribonucléico (ARN) de fita simples de polaridade positiva, e, portanto infeccioso, com uma fase aberta de leitura de aproximadamente 11000 nucleotídeos flanqueada por regiões não codificadoras (RNCs) 5' e 3' de tamanho variável (CHAMBERS *et al.*, 1990). Na extremidade 5' apresenta um *cap*, porém não é poliadenilado na 3'RNC, apresentando estruturas secundárias conservadas em forma de grampo de cabelo (*hairpin/stem-loop* - SL) nas duas extremidades: 5'SL e 3'SL. O *cap* juntamente com

estruturas secundárias presentes na 3'RNC parecem ser responsáveis por conferir estabilidade ao ARN viral, além de desempenharem um papel importante na regulação da síntese de moléculas de ARN e na expressão das proteínas virais (CHIU; KINNEY; DREHER, 2005). Já foi demonstrado que a enzima ARN polimerase dependente de ARN de Flavivírus interage com o 5'SL e que essa estrutura é crítica para que o processo de replicação ocorra (DONG; ZHANG; SHI, 2008). Além disso, embora as extremidades não sejam traduzidas, elas apresentam regiões de sequências conservadas (*conserved sequences*, CSs) (HAHN *et al.*, 1987) que parecem desempenhar papéis importantes na replicação do genoma viral. São elas: 5'CS, 3'CS, 5'UAR, 3'UAR, CS2 e RCS2, sendo que 5'CS, localizada na região que codifica a porção aminoterminal da proteína C, é complementar a 3'CS, situada no 3'RNC e 5'UAR por sua vez, localizada a montante do AUG que codifica o primeiro aminoácido da poliproteína, é complementar a 3'UAR, situada no 3'SL (FIGURA 1) (ALVAREZ *et al.*, 2005b; VILLORDO; GAMARNIK, 2009). Essa complementaridade, associada aos resultados de estudos recentes que mostram que as regiões 5'CS, 3'CS, 5'UAR e 3'UAR são essenciais para a replicação viral em cultura celular (BREDENBEEK *et al.*, 2003; LO *et al.*, 2003; ALVAREZ *et al.*, 2005b, ALVAREZ *et al.*, 2005a), corroboram com a hipótese de que a circularização do ARN é necessária em alguma fase do ciclo replicativo. Essa teoria é sustentada ainda por evidências de um estudo que utilizou um sistema subgenômico de replicon associado à microscopia de força atômica no qual foi possível visualizar a interação física dessas regiões (ALVAREZ *et al.*, 2005a). Além do papel que as RNCs parecem exercer na replicação viral postula-se um papel para as mesmas no processo de regulação da transição entre as fases de tradução e replicação do genoma viral (HOLDEN; HARRIS, 2004; CHIU; KINNEY; DREHER, 2005).

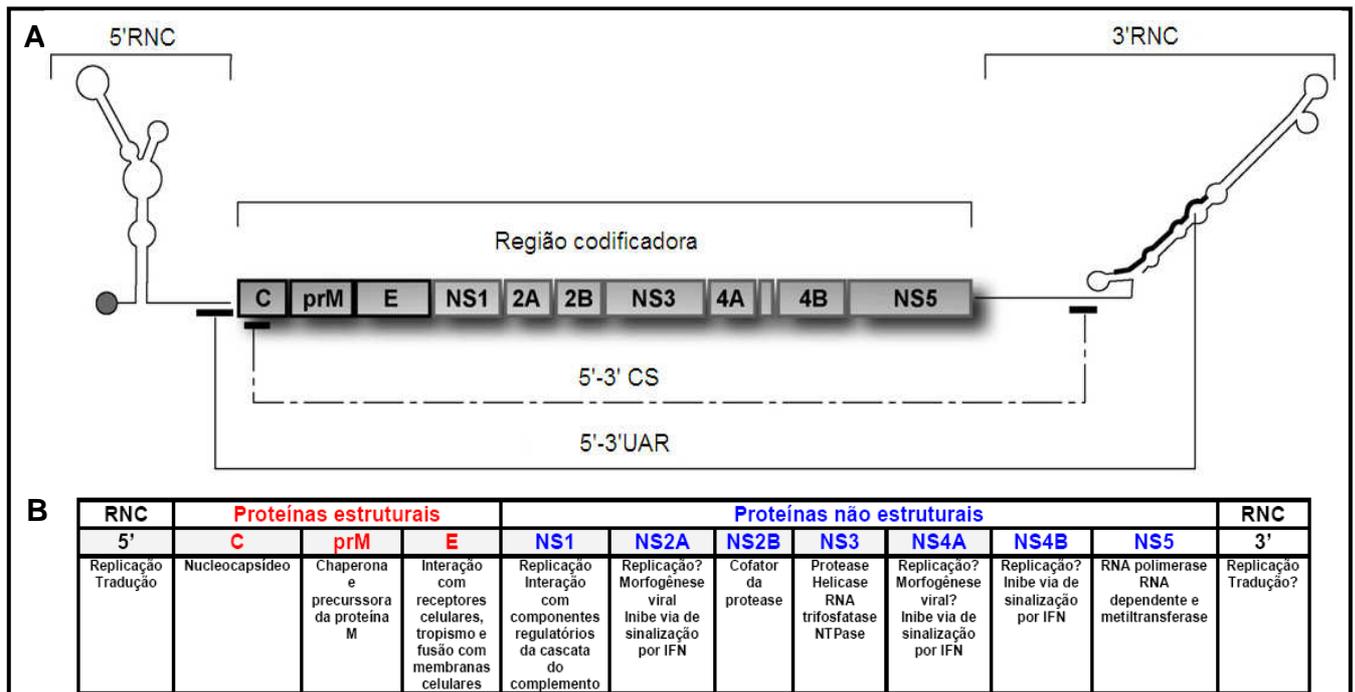


FIGURA 1 - Representação esquemática da organização do genoma do vírus da dengue (modificado de VILLORDO; GAMARNIK, 2009) (A) e função das proteínas estruturais, não-estruturais e regiões não codificadoras (RNCs) (B).

O genoma viral possui apenas uma fase aberta de leitura que é transcrita em uma poliproteína precursora de aproximadamente 3390 aminoácidos, sendo que as três proteínas virais estruturais: capsídeo (C), envelope (E) e precursora de membrana (prM) e as sete não-estruturais (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, são originadas por clivagens cotraducionais tanto pela protease viral, codificada na porção 5' da proteína NS3 associada ao cofator, situado na porção hidrofóbica da proteína NS2B, assim como por proteases do hospedeiro como ilustrado na FIGURA 2 (LEUNG *et al.*, 2001).

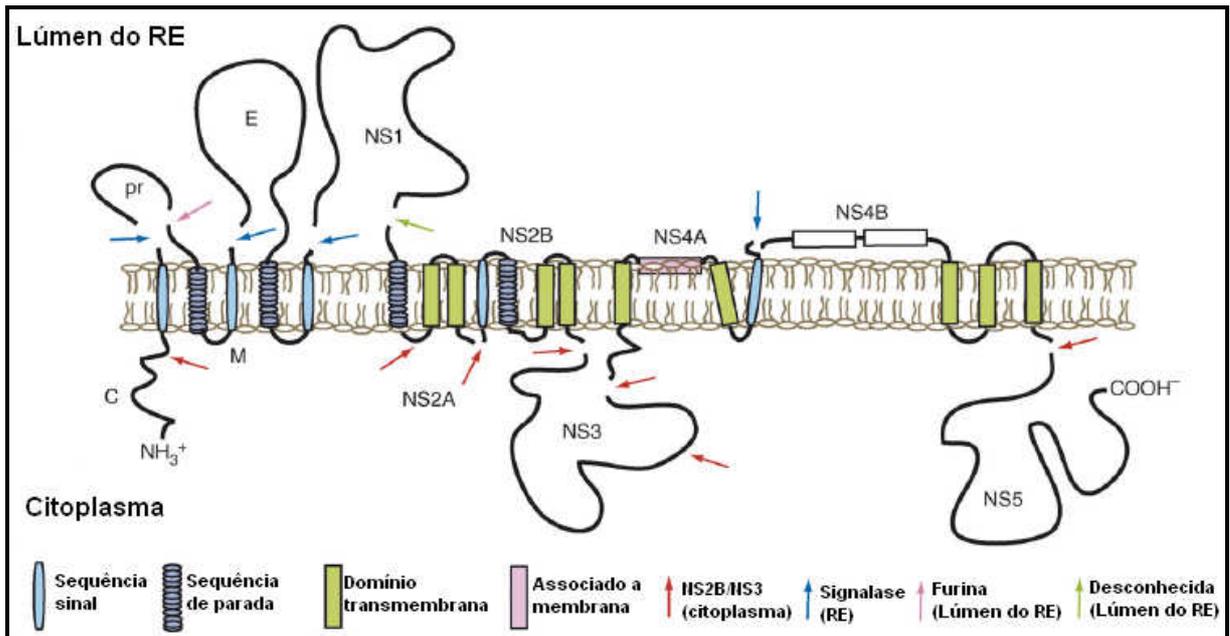


FIGURA 2 - Representação esquemática da topologia da poliproteína do vírus da dengue na membrana do retículo endoplasmático (RE). Os sítios de clivagem da poliproteína pela protease viral (setas vermelhas) e proteases expressas pela célula hospedeira (setas azuis, rosa e verde) estão assinalados por setas (modificado de PERERA; KUHN, 2008).

A proteína C está envolvida em interações com o ARN viral constituindo o nucleocapsídeo. A proteína precursora de membrana (prM) atua como uma chaperona para proteína E, garantindo seu dobramento correto e protegendo o domínio de fusão durante o trânsito pelos compartimentos ácidos do retículo endoplasmático (RE) e complexo de Golgi, evitando assim fusão da mesma antes da liberação da partícula viral madura (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; MURRAY; JONES; RICE, 2008; PERERA; KUHN, 2008). Além disso, foi recentemente demonstrado que a interação de prM com a adenosina trifosfatase (*adenosine triphosphatase, ATPase*) vacuolar é essencial para que ocorra a secreção de partículas virais (DUAN *et al.*, 2008). A proteína E é o principal antígeno viral e responsável por importantes funções tais como: interação das partículas virais com receptores celulares, tropismo e fusão com membranas celulares (CHAMBERS *et al.*, 1990). Além disso, muitos estudos têm relacionado diferentes graus de virulência e eficiência de replicação viral de determinadas cepas com mutações na proteína de envelope (KAWANO *et al.*, 1993; SÁNCHEZ; RUIZ, 1996; GUALANO *et al.*, 1998; BORDIGNON *et al.*, 2007).

A função das proteínas não-estruturais ainda não foi totalmente elucidada. Sabe-se que a proteína NS1 induz a produção de anticorpos (VALDÉS *et al.*, 2000) e pode estar associada ou não a célula, sendo secretada no hospedeiro vertebrado

(CHAMBERS *et al.*, 1990). Essa proteína parece desempenhar um papel importante na replicação (MUYYLAERT; GALLER; RICE, 1997; LINDENBACH; RICE, 1997; WESTAWAY; MACKENZIE; KHROMYKH, 2003; SUZUKI *et al.*, 2007) além de interagir com moléculas regulatórias da cascata do complemento (KUROSU *et al.*, 2007). Quanto a NS2A, sabe-se que constitui importante componente do complexo de replicação (WESTAWAY; MACKENZIE; KHROMYKH, 2003), além de existirem evidências de que desempenhe papéis importantes na incorporação de ARN às partículas nascentes e de que sua interação com a proteína NS3 seria essencial no processo de morfogênese (KÜMMERER; RICE, 2002). A NS3 é a proteína não-estrutural mais estudada dos Flavivírus, uma vez que desempenha funções essenciais no ciclo dos mesmos e constitui um alvo potencial de terapias antivirais. Sabe-se que ela é multifuncional e que além da atividade de serina-protease codificada pelos 180 aminoácidos iniciais, desempenha outras três atividades: a de helicase, ARN trifosfatase (CHAMBERS *et al.*, 1990) e nucleotídeo trifosfatase (*nucleotide triphosphatase*, NTPase) (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006). Ainda não existem dados definitivos com relação à função das proteínas NS4A e NS4B, no entanto a NS4A tem sido implicada como tendo um papel no rearranjo de membranas intracelulares que facilitaria a síntese do ARN e montagem da partícula viral (PERERA; KUHN, 2008). Já a NS4B interagiria com a proteína NS3, desempenhando um papel na replicação além de potencialmente bloquear a transdução de sinal induzida por interferon alfa ou beta e gama ($IFN\alpha/\beta$ e γ) (PERERA; KUHN, 2008), assim como a NS2A e a NS4A em menor grau (MUÑOZ-JORDÁN *et al.*, 2003; CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006). A NS5 por sua vez, é a proteína mais conservada entre os Flavivírus e apresenta um motivo GDD em sua extremidade C-terminal, característico de ARN polimerase dependente de ARN (CHAMBERS *et al.*, 1990), além de um motivo metiltransferase na sua extremidade N-terminal, responsável juntamente com a ARN trifosfatase da NS3 pela síntese do *cap* viral (EGLOFF *et al.*, 2002).

1.1.3 Ciclo do vírus da dengue

A entrada das partículas virais na célula hospedeira parece ocorrer através

de endocitose mediada por receptor, porém ainda não estão totalmente definidas quais proteínas de superfície celular estariam envolvidas nessa ligação vírus-célula hospedeira. São candidatos a receptor: 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, L-SIGN e DC-SIGN (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006). Uma vez no endossomo, o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma da célula mediante fusão da proteína de envelope viral com as membranas celulares. Essa fusão ocorre devido a uma mudança conformacional da proteína E proporcionada pelo pH ácido do endossomo (MODIS *et al.*, 2004). Após a liberação do capsídeo no citoplasma tem início a tradução do material genético associada ao retículo endoplasmático rugoso, seguida da replicação do mesmo. O primeiro evento do processo replicativo do ARN viral é a síntese de fitas complementares de polaridade negativa que servirão como moldes para síntese de novas fitas de ARN de polaridade positiva. Essas, por sua vez, são utilizadas na síntese de novas fitas de polaridade negativa e na tradução de proteínas virais, além de serem utilizadas na montagem das partículas nascentes (CLEAVES; RYAN; SCHLESINGER, 1981). A morfogênese viral acontece em associação com membranas intracelulares no interior das quais se completa o processo de maturação das proteínas, culminando com a liberação de novas partículas virais da célula hospedeira. Acredita-se que a clivagem da proteína prM por uma protease tipo furina, seja o evento de maturação mais tardio, ocorrendo exatamente antes da liberação para o meio extracelular de partículas virais maduras (STADLER *et al.*, 1997; CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

O virion mede cerca de 50 nm e é constituído pelo nucleocapsídeo, de forma icosaédrica, envolto por uma dupla membrana lipídica originária da célula hospedeira, onde se encontram ancoradas as proteínas E na forma de 90 homodímeros formando uma superfície lisa sob a qual se encontram as proteínas de membrana (M) (PERERA; KUHN, 2008).

1.1.4 Apresentações clínicas da dengue

A dengue é uma doença infecciosa, não contagiosa, cujas apresentações

clínicas variam desde uma doença febril inaparente, até quadros graves com manifestações hemorrágicas e choque hipovolêmico. As formas leve, em especial, e moderada da doença são de difícil diagnóstico, pois a sintomatologia não é característica se confundindo com a de outras doenças infecciosas cocirculantes (BRASIL. Ministério da Saúde, 2005).

A febre clássica da dengue é caracterizada por febre de início súbito, cefaléia, dor retro-orbitária, fotofobia, bradicardia, exantema maculopapular, artralgia, mialgia, dor nos ossos, náusea, vômitos e fraqueza generalizada. Pequenas manifestações hemorrágicas também podem ser observadas em alguns casos. Existem relatos de manifestações neurológicas (GUBLER; TRENT, 1993; MIAGOSTOVICH *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2005; MISRA *et al.*, 2006) e hepatite (LING; WILDER-SMITH; LEO, 2007) em pacientes com dengue. Esses casos que não se enquadram na classificação tradicional da doença são atualmente classificados pelo Ministério da Saúde do Brasil como dengue com complicações (BRASIL. Ministério da Saúde, 2005). O período de incubação varia de 3 a 14 dias e a febre pode durar de 2 a 7 dias, podendo ocorrer um curto período de queda da temperatura (12-24h) após o qual pode haver novo aumento de temperatura (*saddleback fever*). A piora dos sintomas em geral coincide com essa queda de temperatura para valores normais ou inferiores (GUBLER; TRENT, 1993; LAI; PUTNAK, 2007). A FHD é caracterizada pela presença de petéquias, púrpura, equimoses e sangramentos em locais de picada de agulha. Um teste do laço positivo indica o aumento da fragilidade capilar. Além disso, no hemograma observa-se trombocitopenia e hemoconcentração. A síndrome do choque da dengue (SCD) por sua vez é caracterizada por taquicardia, ascite, efusão pleural, hipotensão e choque. Dor abdominal aguda e vômitos persistentes são uma boa indicação de que a doença está progredindo para o choque. Muitas vezes essas duas síndromes cursam juntas (BRASIL. Ministério da Saúde, 2005; LAI; PUTNAK, 2007).

Apesar de existirem orientações da Organização Mundial da Saúde (OMS) para classificação e manejo da dengue de acordo com quatro graus de severidade, isso vem se tornando cada vez mais complicado para os clínicos à medida que novas formas de manifestação da doença surgem (FERES *et al.*, 2006; RIGAU-PÉREZ, 2006; DEEN *et al.*, 2006).

1.1.5 Patogênese da dengue

A patogênese da dengue ainda não é bem compreendida e nenhum dos quatro sorotipos está diretamente relacionado com um grau de severidade maior da doença apesar de alguns genótipos (genótipo do sudeste asiático de DENV2 e genótipo III de DENV3) terem sido apontados como mais virulentos (RICO-HESSE *et al.*, 1997; WATTS *et al.*, 1999; COLOGNA; RICO-HESSE, 2003; MESSER *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2008). Inicialmente foram formuladas duas hipóteses básicas para explicar o desenvolvimento das formas mais graves da doença. Segundo a teoria do aumento dependente de anticorpo (*antibody-dependent enhancement*, ADE), uma infecção secundária com um sorotipo diferente de dengue é considerada o maior fator de risco isolado para o desenvolvimento de FHD/SCD. Essa teoria, que nada mais é que uma derivação da teoria do pecado original antigênico (FAZEKAS DE ST GROTH; WEBSTER, 1966), postula que uma infecção primária com um determinado sorotipo de dengue estimula a produção de anticorpos neutralizantes contra esse sorotipo e de anticorpos que apresentam reação cruzada em títulos não neutralizantes contra os demais sorotipos. Esses anticorpos por sua vez, por ocasião de uma infecção secundária com um sorotipo heterólogo, promoveriam um aumento da infecção por facilitarem a entrada do vírus em células que possuam o receptor $Fc\gamma$ (HALSTEAD; CHOW; MARCHETTE, 1973; HALSTEAD; O'ROURKE, 1977). Existem estudos sugerindo que a nível de resposta celular algo similar também ocorre, onde populações de células T estimuladas por uma infecção primária e que possuem baixa afinidade para o sorotipo secundário seriam responsáveis por um atraso e uma diminuição no controle da viremia e por um aumento nas respostas pró-inflamatórias (MONGKOLSAPAYA *et al.*, 2003). Uma segunda teoria aponta para diferenças de virulência entre cepas dos vírus como sendo a responsável pelo desenvolvimento das formas mais graves da doença, uma vez que muitos casos de FHD/SCD ocorrem após infecções primárias (ROSEN, 1977). Além disso, raça e algumas doenças crônicas já foram relacionadas como fatores de risco. Segundo estudos realizados em Cuba, indivíduos de origem caucasóide em oposição aos negróides (HALSTEAD *et al.*, 2001; SIERRA *et al.*, 2006; SIERRA; KOURÍ; GUZMÁN, 2007) e portadores de anemia falciforme, asma brônquica ou diabetes (BRAVO; GUZMÁN; KOURÍ, 1987) apresentariam maior risco de desenvolver a

forma hemorrágica da doença. Também têm sido realizados estudos que procuram associar características da genética do hospedeiro humano ao desenvolvimento da FHD/SCD. Nesse sentido, foram identificados polimorfismos genéticos no receptor $Fc\gamma$ e no receptor da vitamina D que apresentam uma correlação negativa com o desenvolvimento de formas graves da doença. Em contrapartida, polimorfismos no promotor do fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrose factor alpha*, $TNF\alpha$), em antígenos plaquetários humanos (*human platelet antigens*, HPAs) e em transportadores associados com o processamento de antígenos (*transporter associated with antigen processing*, TAPs) foram correlacionados positivamente com o desenvolvimento dessas formas da doença (COFFEY *et al.*, 2009). Apesar de alguns estudos não terem encontrado relação entre polimorfismos no gene da lectina ligante de manose (*manose-binding lectin*, MBL) e o desenvolvimento de formas graves da doença, um polimorfismo nesse gene foi negativamente associado ao desenvolvimento de trombocitopenia em pacientes com dengue (ACIOLISANTOS *et al.*, 2008). Atualmente, nenhuma das teorias acima apresenta por si só uma relação direta de causa e efeito. Assim sendo, o desfecho clínico parece ser o resultado de uma combinação de fatores tanto virais quanto do hospedeiro (KOURÍ; GUZMÁN; BRAVO, 1987; CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

1.1.6 Diagnóstico da dengue

O diagnóstico da dengue pode ser feito por isolamento viral, detecção do antígeno, de anticorpos específicos ou ainda do material genético. O isolamento do vírus pode ser realizado em cultura celular (C6/36, AP61, Vero, LL-CMK2), por inoculação no cérebro de camundongos recém nascidos ou em mosquitos (*Toxorhynchites*, machos de *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus*). O isolamento viral associado à técnica de imunofluorescência indireta (IFI), permite a identificação do antígeno viral e conseqüentemente a sorotipagem. Técnicas sorológicas como o ensaio imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), teste de neutralização, inibição da hemaglutinação e fixação do complemento permitem a mensuração relativa de anticorpos específicos. Existem também testes no formato ELISA para identificação de antígenos virais, dentre esses um que identifica a

proteína NS1 e que tem sido apontado não só como ferramenta diagnóstica como também prognóstica de gravidade da infecção. A identificação do ARN viral, por sua vez, pode ser feita pela reação em cadeia da polimerase precedida por uma etapa de transcrição reversa (*reverse transcription associated to polymerase chain reaction*, RT-PCR) ou pela hibridização do material genético com sondas marcadas. Por fim, a imunohistoquímica pode ser utilizada para identificação do antígeno nos casos fatais em que as outras técnicas não puderam ser executadas ou os resultados não foram conclusivos (GUBLER, 1998; GUZMÁN; KOURÍ, 2004). Além disso, o hemograma e testes de coagulação sanguínea, apesar de inespecíficos, podem auxiliar o clínico no diagnóstico e manejo do paciente (BRASIL. Ministério da Saúde, 2005).

Para que as ferramentas diagnósticas disponíveis possam trazer as respostas desejadas, é importante atentar para o período de coleta das amostras que é crítico para o isolamento viral e no caso da sorologia para que se possa fazer uma distinção entre infecção primária e secundária (FIGURA 3).

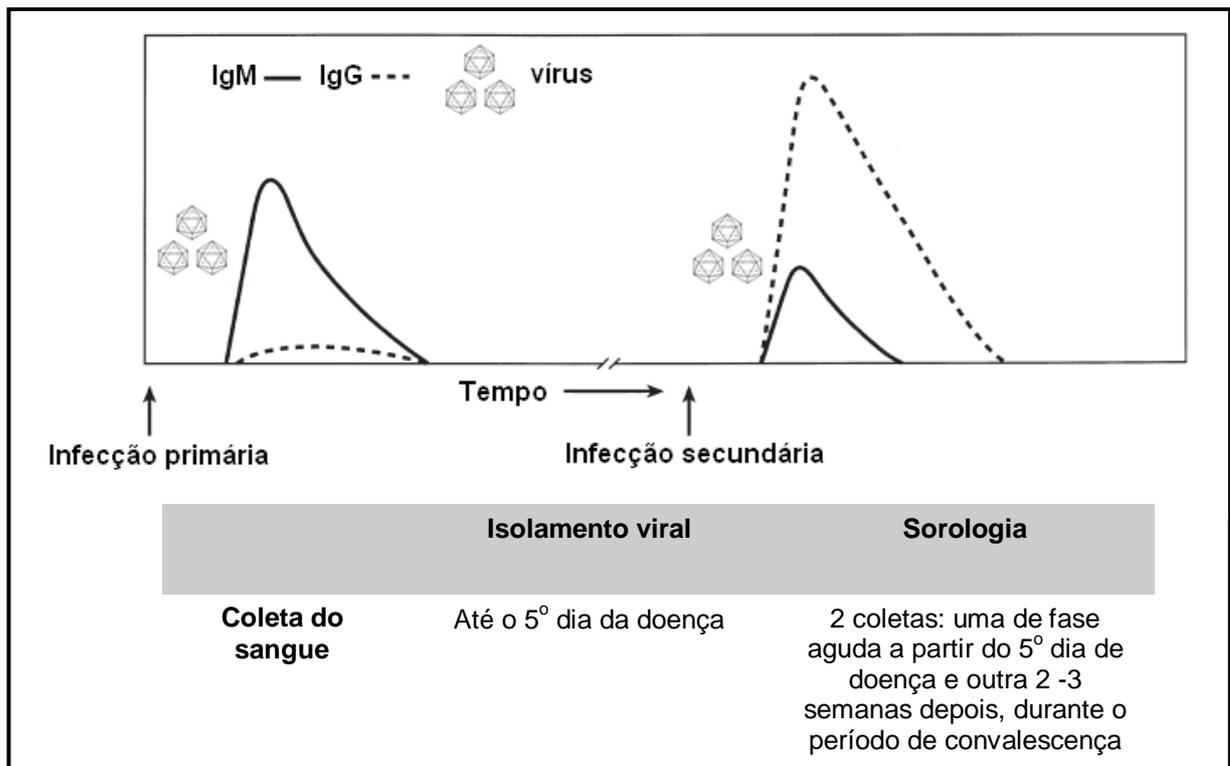


FIGURA 3 - Resposta imune à infecção com vírus dengue e período de coleta de amostras de sangue sugerido para realização do isolamento viral e sorologia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997; BRASIL. Ministério da Saúde, 2002).

1.1.7 Epidemiologia

Como pode ser constatado na FIGURA 4, a distribuição global da doença nas zonas tropicais e subtropicais (35°N a 35°S) é um claro reflexo da distribuição do principal vetor. A OMS estima que ocorrem 50 milhões de casos de dengue no mundo anualmente resultando em aproximadamente 22000 mortes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009b). De acordo com dados de 2005 o Brasil foi o país mais atingido pela doença e contabilizou 1,6 vezes mais casos do que o segundo país mais afetado, a Indonésia. Em contrapartida, na Indonésia o número de fatalidades supera em 50 vezes o Brasil (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009a). Levantamentos epidemiológicos mais recentes referentes apenas ao continente americano mostram que no ano de 2008 ocorreram 865697 casos de dengue com 238 mortes, sendo que 84% desses casos foram identificados no Brasil (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2008).

Atualmente o Brasil vive uma situação de hiperendemicidade com a circulação de três sorotipos do vírus: 1, 2 e 3. Apesar de um grupo de pesquisadores do norte do país ter relatado a ocorrência de três casos autóctones pelo sorotipo 4 (FIGUEIREDO *et al.*, 2008), ainda existem questionamentos quanto a origem dos mesmos e o Ministério da Saúde não reconhece a presença desse sorotipo no Brasil (BRASIL. Ministério da Saúde, 2008b).

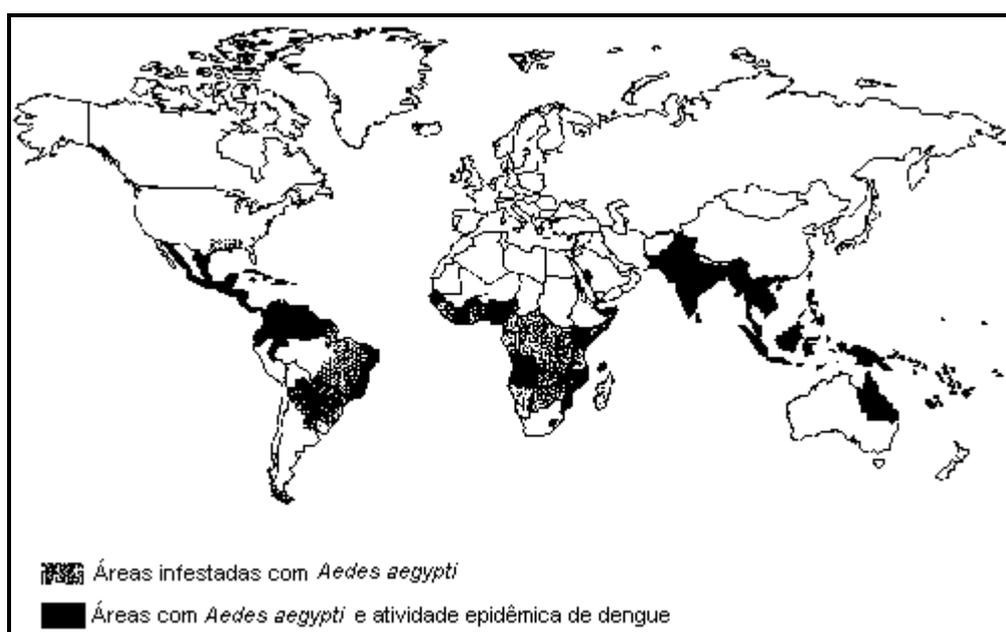


FIGURA 4 - Mapa ilustrando a distribuição mundial da dengue e *Aedes aegypti* em 1998 (modificado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009c).

O vírus da dengue é mantido em dois ciclos de transmissão na África e Ásia: o ciclo urbano e o silvestre (Floresta/Enzoótico), sendo o primeiro o mais importante do ponto de vista de saúde pública. Em alguns casos pode ser identificado um ciclo intermediário (Rural/Epidêmico). Nesses ciclos ele alterna entre hospedeiros primatas humanos ou não, que são os amplificadores, e mosquitos do gênero *Aedes* (FIGURA 5) (GUBLER, 1998). Até o momento não foi descrito um ciclo silvestre na região das Américas (MONATH, 1994). No entanto, estudos sorológicos realizados na Guiana Francesa envolvendo diferentes espécies de animais vertebrados indicam sua suscetibilidade à infecção pelo vírus da dengue, deixando em aberto questões quanto ao papel dos mesmos nos ciclos de transmissão (THOISY; DUSSART; KASANJI, 2004).

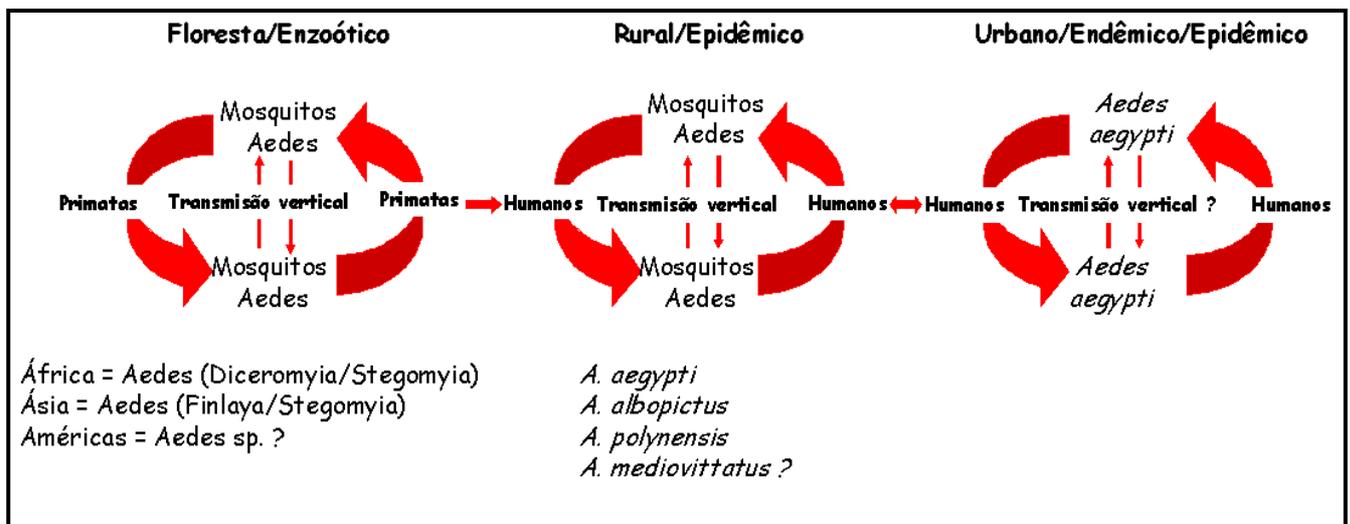


FIGURA 5 - Ciclos de transmissão da dengue (GUBLER, 1998).

1.2 CLONES INFECCIOSOS E REPLICONS NO GÊNERO *FLAVIVÍRUS*

Os clones infecciosos, de não-retrovírus, cujo genoma é constituído de ARN simples fita de polaridade positiva, são o resultado da combinação da sequência completa do vírus na forma de ADN com sequências que permitem a sua transcrição *in vitro* ou *in vivo*. O ARN assim gerado é infeccioso e possui as mesmas propriedades do ARN viral sendo capaz de gerar novas partículas (RICE *et al.*, 1989; MEYERS; THIEL; RÜMENAPF, 1996; RUGGLI; RICE, 1999). Replicons por sua vez,

possuem todos os elementos necessários para replicação de seu material genético nas células, porém não contam com as sequências codificadoras de proteínas estruturais e, portanto não são capazes de gerar novas partículas virais (JONES; PATKAR; KUHN, 2005).

A clonagem do genoma viral em um vetor é vantajosa, pois permite a propagação fácil de um material de composição homogênea (RUGGLI; RICE, 1999) em oposição às amostras biológicas onde o ARN viral se apresenta naturalmente sob a forma de *quasispecies* (HOLMES, 2003; LIN *et al.*, 2004). Essa característica faz dos clones infecciosos ferramentas indispensáveis para o estudo do efeito de mutações no genoma viral permitindo que sejam exploradas questões ainda não desvendadas acerca do papel de determinadas proteínas no ciclo de vida dos vírus e sua relação com a patogênese das doenças. Além disso, seu uso como ponto de partida para fabricação de lotes semente na produção de vacinas de vírus atenuados apresenta a vantagem de diminuir o risco do aparecimento de cepas virais com fenótipos revertantes (RICE *et al.*, 1989; RUGGLI; RICE, 1999).

A maior vantagem dos sistemas subgenômicos de replicons é o fato de permitirem aos pesquisadores analisar com maior profundidade as variáveis que estão envolvidas no processo de replicação viral, pois isolam as proteínas não-estruturais das estruturais que estão mais relacionadas aos processos de montagem da partícula viral (KHROMYKH; WESTAWAY, 1997).

Várias abordagens já foram utilizadas na construção de clones infecciosos. Para montagem do primeiro clone infeccioso de *Flavivírus* foi utilizada uma estratégia de ligação *in vitro* que envolvia dois vetores, seguida de transcrição *in vitro* (RICE *et al.*, 1989). Essa estratégia tem se mostrado como uma boa alternativa em casos em que a clonagem de todo genoma viral em um único vetor não pode ser alcançada em função da instabilidade desses clones nos vetores bacterianos (SUMIYOSHI; HOKE; TRENT, 1992; KAPOOR *et al.*, 1995; MANDL *et al.*, 1997; GRITSUN; GOULD, 1998). Uma alternativa que também tem sido utilizada em casos em que foi observada instabilidade do inserto do ADN de interesse em sistemas bacterianos, é o uso de vetores de levedura associado a técnicas de recombinação homóloga (POLO *et al.*, 1997; PURI *et al.*, 2000). Outra estratégia envolve a amplificação de todo genoma viral por RT-PCR utilizando um oligonucleotídeo iniciador que hibridize com a porção 5'RNC e possua a sequência de um promotor a montante (GRITSUN; GOULD, 1995). Ao omitir o passo de clonagem essa

estratégia possui a desvantagem de dar origem a uma população de ARNs heterogêneos (SHI *et al.*, 2002). As estratégias acima descritas fazem uso de promotores virais do tipo T3, T7 ou SP6 que viabilizam a transcrição do ADN *in vitro* e posterior transfecção do ARN em células alvo. No entanto, o uso de promotores que são reconhecidos pela ARN polimerase II de eucariotos como o do citomegalovírus (CMV), que permitem a transcrição do ADN clonado pela maquinaria da própria célula alvo também já foi descrito (MISHIN; COMINELLI; YAMSHCHIKOV, 2001; YAMSHCHIKOV; MISHIN; COMINELLI, 2001).

Existem clones infecciosos descritos para vários vírus do gênero *Flavivírus*, como pode ser observado no QUADRO 1. Eles têm sido utilizados na construção e avaliação de potenciais vacinas (CAUFOUR *et al.*, 2001; PLETNEV, 2001; GUIRAKHOO *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2003; GUIRAKHOO *et al.*, 2004; BLANEY JR. *et al.*, 2004a; BLANEY JR. *et al.*, 2004b; GUIRAKHOO *et al.*, 2006; DURBIN *et al.*, 2006; BLANEY JR. *et al.*, 2007; MATEU *et al.*, 2007), para desvendar o papel de mutações na poliproteína (KINNEY *et al.*, 1997; GUALANO *et al.*, 1998; VAN DER MOST; CORVER; STRAUSS, 1999; CAMPBELL; PLETNEV, 2000; LEE; LOBIGS, 2000; KÜMMERER; RICE, 2002; COLOGNA; RICO-HESSE, 2003; VLAYCHEVA *et al.*, 2004; HAYASAKA *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2005; PIERRO *et al.*, 2006; SUZUKI *et al.*, 2007), de deleções ou mutações no 5'RNC e 3'RNC do genoma dos Flavivírus (PLETNEV, 2001; SHI *et al.*, 2002; BREDENBEEK *et al.*, 2003; TAJIMA *et al.*, 2006) e como potenciais vetores para expressão de proteínas heterólogas (YUN *et al.*, 2003; BONALDO *et al.*, 2007).

O número de replicons descritos para vírus do gênero *Flavivírus* não é tão expressivo quanto o de clones infecciosos, mas as perguntas que vêm sendo respondidas através do uso dessa ferramenta são igualmente relevantes. Existem replicons descritos para DENV2 (PANG; ZHANG; DAYTON, 2001; ALVAREZ *et al.*, 2005b; JONES *et al.*, 2005; HOLDEN *et al.*, 2006; NG *et al.*, 2007), DENV1 (SUZUKI *et al.*, 2007), *vírus da Febre amarela* (CORVER *et al.*, 2003; JONES; PATKAR; KUHN, 2005), *vírus Kunjin* (KHROMYKH; WESTAWAY, 1997), *vírus da Encefalite transmitida por carrapatos* (GEHRKE *et al.*, 2003), *vírus da Febre hemorrágica de Omsk* (YOSHII; HOLBROOK, 2009), *vírus da Encefalite japonesa* (YUN *et al.*, 2007) e *vírus do Oeste do Nilo* (YAMSHCHIKOV *et al.*, 2001; SHI; TILGNER; LO, 2002; SCHOLLE *et al.*, 2004; ROSSI *et al.*, 2005) (QUADRO 2). O uso desses sistemas subgenômicos tem permitido explorar questões relativas à importância de estruturas

presentes nas regiões 5' e 3' não codificadoras nos processos de replicação e tradução (CORVER *et al.*, 2003; LO *et al.*, 2003; ALVAREZ *et al.*, 2005b; HOLDEN *et al.*, 2006), o papel de mutações em proteínas não-estruturais (SUZUKI *et al.*, 2007), vias de escape da resposta imune relacionadas com as proteínas não-estruturais (JONES *et al.*, 2005) e o papel de proteínas não-estruturais no ciclo dos vírus (JONES; PATKAR; KUHN, 2005). Além disso, se apresentam como um sistema bastante interessante e promissor para triagem de antivirais (ROSSI *et al.*, 2005; NG *et al.*, 2007) e desenvolvimento de vacinas baseadas em RNA não infeccioso auto-replicativo, através da expressão de genes heterólogos ou expressão parcial dos genes estruturais (prM-E) (VARNAVSKI; KHROMYKH, 1999; KOFLER *et al.*, 2004; ISHIKAWA *et al.*, 2008; WIDMAN *et al.*, 2008).

Vírus	Molde para transcrição	Vetor(Vetor de origem)	Cepa Bacteriana/Levedura	Promotor	Nucleotídeos extras em 5' ou 3'	Célula transfectada	Transferência	Referência
YFV	LIV	X	X	SP6(+G)	Sim (5')	BHK-21	Lipofectina	RICE <i>et al.</i> , 1989.
DENV4	GVCC	pBR322	DB1528	SP6(+G)	Sim (5' e 3')	LLCMK2	Lipofectina	LAI <i>et al.</i> , 1991.
JEV	LIV	pBR322	HB101	T7	Sim (5')	BHK-21	Lipofectina	SUMIYOSHI; HOKE; TRENT, 1992.
KUNV	GVCC	pBR322	DH5 α	SP6(+G)	Sim (5' e 3')	BHK-21	DOTAP e Lipofectina	KHROMYCK; WESTAWAY, 1994.
DENV2	LIV	pUC18 e pBR322	X	T7	X	BHK-21 e Vero	Lipofectina	KAPOOR <i>et al.</i> , 1995.
TBEV	PCR longo	X	X	SP6	X	Inoculação intra-cerebral de camundongos		GRITSUN; GOULD, 1995.
DENV2	GVCC	pBR322	XL1-Blue e TB-1	T7	Sim (3')	BHK-21	Eletroporação	KINNEY <i>et al.</i> , 1997.
TBEV	GVCC & LIV	pBR322	HB101	T7(+G)	Sim (5')	BHK-21	Eletroporação	MANDL <i>et al.</i> , 1997.
DENV2	GVCC	pRS424 e YAC	STBL2/YPH857	SP6(+G)	Sim (5' e 3')	LLCMK2	Lipofectina e eletroporação	POLO <i>et al.</i> , 1997.
TBEV	GVCC, LIV & PCR longo	pBR322	Able-K	SP6	X	PS	Lipofectina	GRITSUN; GOULD, 1998.
DENV2	GVCC	pWSK29	DH5 α	T7(+G)	Sim (5' e 3')	BHK-21	Eletroporação	GUALANO <i>et al.</i> , 1998.
MVEV	GVCC	pMC18	DH5 α	T7(+G)	Sim (5' e 3')	BHK-21	Eletroporação	HURRELBRINK; NESTOROWICZ; MCMINN, 1999.
YFV	GVCC	pBelobAC11	X	SP6	X	BHK-21	Lipofectamine	VAN DER MOST; CORVER; STRAUSS, 1999.
DENV1	GVCC	pRS424	STBL2/YPH857	SP6	Sim (3')	LLCMK2	Eletroporação	PURI <i>et al.</i> , 2000.
TBEV	GVCC	X	BD1528	SP6(+G)	Sim (5' e 3')	BHK-21, Vero e LLCMK2	Lipofectamine e DOTAP	CAMPBELL; PLETNEV, 2000.
MVEV	GVCC	pBR322	MC1061.1	T7	Sim (3')	BHK-21 e C6/36	Eletroporação e lipofectina	LEE; LOBIGS, 2000.
DENV2	GVCC	pBluescriptyl II e pGEM3Z	DH5 α F e STBL2	SP6	X	BHK-21 e C6/36	Lipofectina	SRIBURI <i>et al.</i> , 2001.
JEV	GVCC	pBR322	HB101	T7 e CMV#	Sim (5' e 3')	BHK-21	SuperFect e Fugene6	YAMSHCHIKOV; MISHIN; COMINELLI, 2001.
WNV	GVCC	pBR322	HB101	SP6(+G)	Sim (5' e 3' ou só 5')	BHK-21	Eletroporação	YAMSHCHIKOV <i>et al.</i> , 2001.
JEV	PCR longo	X	X	T7	X	BHK-21	Lipofectamine	ZHANG <i>et al.</i> , 2001.
JEV	GVCC	pBR322	HB101	CMVmp	X	Inoculação intra-cerebral de camundongos	Superfect	MISHIN; COMINELLI; YAMSHCHIKOV, 2001.
WNV	GVCC	pBR322	HB101	T7(+G)	Sim (5')	BHK-21	Eletroporação	SHI <i>et al.</i> , 2002.
YFV	GVCC	pACNR1181(pACYC177)	Sure	SP6(+G)	Sim (5' e 3')	SW-13	Lipofectina	BREDENBEEK <i>et al.</i> , 2003.
JEV	GVCC	pBAC(SV)(pBelobAC11)	DH10B	T7(+G) ou SP6(+G)	Sim (5' e 3' ou só 5')	BHK-21	Eletroporação	YUN <i>et al.</i> , 2003.
TBEV	GVCC	pBR322	Able-K e HB101	SP6	X	BHK-21	Eletroporação	HAYASAKA <i>et al.</i> , 2004.
DENV3	GVCC	pBR322	X	SP6	X	Vero e C6/36	X	BLANEY JR. <i>et al.</i> , 2004a.
DENV2	GVCC	pBR322	X	SP6(+G)	Sim (5' e 3')	C6/36	X	BLANEY JR. <i>et al.</i> , 2004b.
WNV	GVCC	pACNR(pACYC177)	X	T7	X	BHK-21, Vero e Huh7	Eletroporação	ROSSI <i>et al.</i> , 2005.
YFV	GVCC	pACNR1181(pACYC177)	X	SP6(+G)	X	BHK-21	Eletroporação	MCELROY <i>et al.</i> , 2005.
JEV	GVCC	pMW118(pSC101)	X	T7	X	Vero	Eletroporação	ZHAO <i>et al.</i> , 2005.
DENV1	GVCC	pMW119	STBL2	T3	X	Vero	DMRIE-C	TAJIMA <i>et al.</i> , 2006.
DENV2	GVCC	pBelobac11	XL1-Blue	T7	Sim (3')	BHK-21, Vero e C6/36	Eletroporação	PIERRO <i>et al.</i> , 2006.
DENV1	GVCC	pACNR(pACYC177) e pBelobac11	X	T7(+G)	Sim (5')	BHK-21 e C7/10	Lipofectina e eletroporação	SUZUKI <i>et al.</i> , 2007.

X = não se aplica ou dados que não constam na referência; GVCC = genoma viral completo clonado (full-length); LIV = ligação *in vitro* de segmentos clonados ou amplificados por PCR longo; CMV = citomegalovírus; CMVmp = promotor mínimo de citomegalovírus (minimal cytomegalovirus promoter); DENV = vírus da Dengue (Dengue virus); JEV = vírus da Encefalite japonesa (Japanese encephalitis virus); KUNV = vírus Kunjin (Kunjin virus); MVEV = vírus da Encefalite de Murray Valley (Murray Valley encephalitis virus); TBEV = vírus da Encefalite transmitida por carrapatos (Tick-borne encephalitis virus); WNV = vírus do Oeste do Nilo (West Nile virus); YFV = vírus da Febre amarela (Yellow fever virus); # Transfecção do plasmídeo e presença de introns

QUADRO 1 - CLONES INFECCIOSOS DE VIRUS DO GÊNERO FLAVIVIRUS

Vírus	Vetor	Promotor	Nucleotídeos extras em 5' e 3'	5'C	3'E	Ribozima	Estrutura do gene marcador/Gene de resistência (localização)	Efeito citopático	Célula	Referências
	Cepa bacteriana ou de levedura								Introdução do RNA	
KUNV	pBR322	SP6(+G)	Sim (5' e 3')	321 nt ou 60 nt	66 nt	Não	IRES-CAT ou IRES-NEO (3'RNCΔ76)	Não	BHK-21	KHROMYCK; WESTAWAY, 1997.
	DH5α								Eletroporação	
WNV	pBR322	SP6(+G)	Sim (5' e 3')	69 nt	X	Não	Não	Sim	BHK-21	YAMSHCHIKOV <i>et al.</i> , 2001.
	HB101								Eletroporação	
DENV2	pBR424	SP6 ou CMV	X	363 nt ou 60 nt	72 nt	Sim/Não	Não	X	LLC-MK2	PANG; ZHANG; DAYTON, 2001.
	STBL2 e YPH857								Eletroporação	
WNV	pBR322	T7(+G)	Não	93 nt	90 nt	Não	IRES-GFP ou IRES-NEO (3'RNC)	Não	BHK-21	SHI; TILGNER; LO, 2002.
	HB101								Eletroporação	
TBEV	pBR322	T7(+G)	Sim (5')	300 nt ou 81 nt	69 nt	Não	Não	Não	BHK-21	GEHRKE <i>et al.</i> , 2003.
	HB101								Eletroporação	
YFV	pBeloBAC11	SP6	X	291 nt, 150 nt ou 60 nt	X	Não	Não	X	BHK-21	CORVER <i>et al.</i> , 2003.
	X								Lipofectamine	
WNV	X	T7	X	93 nt	X	Não	IRES-tat-2A-NEO ou IRES-GFP-2A-NEO (3'RNC)	X	BHK-21	SCHOLLE <i>et al.</i> , 2004.
	X								Eletroporação	
WNV	pACNR	T7	Sim (3')	X	X	Sim	IRES-tat-2A-NEO, IRES-LUC-2A-NEO ou IRES-GFP-2A-NEO (3'RNC)	X	BHK-21, Vero e Huh7	ROSSI <i>et al.</i> , 2005.
	X								Eletroporação	
YFV	pACNR	SP6(+G)	Sim (5' e 3')	63 nt	72 nt	Não	IRES-GFP, IRES-LUC ou IRES-NEO (3'RNC)/GFP-2A or LUC-2A (C-ssNS1)	Não ou pouco	BHK-15	JONES; PATKAR; KUHN, 2005.
	X								Eletroporação	
DENV2	pBR322	T7	Sim (3')	102 nt	72 nt	Não	LUC-2A (C-ssNS1)	X	BHK-21 e C6/36	ALVAREZ <i>et al.</i> , 2005b.
	X								Lipofectamine	
DENV2	pWSK29	T7(+G)	Sim (5' e 3')	81 nt	72 nt	Não	PAC-2A (C-ssNS1)	X	k562 e THP-1	JONES, <i>et al.</i> , 2005.
	DH5α								X	
DENV2	pBR322	T7	Não	72 nt	90 nt	Sim	LUC-2A (C-ssNS1)	X	BHK-15	HOLDEN <i>et al.</i> , 2006.
	X								Lipofectamine	
DENV1	pACNR e pBeloBAC11	T7(+G)	Sim (5')	X	X	Sim/Não	Não ou IRES-LUC (3'RNCΔ169)	X	BHK-21	SUZUKI <i>et al.</i> , 2007.
	X								Eletroporação	
DENV2	pWSK29	T7(+G)	Sim (5' ou 5' e 3')	66 nt	72 nt	Sim/Não	PAC-2A-GFP, IRES ou PAC-2A-LUC-IRES (C-ssNS1)	X	BHK-21	NG <i>et al.</i> , 2007.
	Top10								Eletroporação	
JEV	pBeloBAC11	SP6(+G)	Sim (5')	X*	X*	Não	IRES-LUC, IRES-LacZ ou IRES-GFP (3'RNC)	X	BHK-21	YUN <i>et al.</i> , 2007.
	X								Eletroporação	
OHFV	pACNR	T7(+G)	Sim (5')	81 nt	69 nt	Sim	GFP-2A ou LUC-2A (C-ssNS1)	Não	BHK-21	YOSHI; HOLBROOK, 2009.
	X								TransIT-mRNA	

* Esses autores deletaram apenas as regiões codificadoras dos ectodomínios das proteínas estruturais e mantiveram parte ou todos os domínios transmembrana. X = informação não disponível na referência; 5'C = número de nucleotídeos da porção 5' da proteína C que foram mantidos; 3'E = número de nucleotídeos da porção 3' da proteína E que foram mantidos; nt = nucleotídeos; 3'RNC = inserção do gene em 3'RNC; C-ssNS1 = inserção do gene na junção entre a porção de C que foi mantida e da sequência sinal da NS1; Δ = deleção; DENV = *vírus da Dengue (Dengue virus)*; JEV = *vírus da Encefalite japonesa (Japanese encephalitis virus)*; KUNV = *vírus Kunjin (Kunjin virus)*; OHFV = *vírus da Febre hemorrágica de Omsk (Omsk hemorrhagic fever virus)*; TBEV = *vírus da Encefalite transmitida por carapatos (Tick-borne encephalitis virus)*; WNV = *vírus do Oeste do Nilo (West Nile virus)*; YFV = *vírus da Febre amarela (Yellow fever virus)*; 2A = peptídeo autoproteolítico do vírus da febre aftosa; CAT = cloranfenicol acetiltransferase; GFP = proteína fluorescente verde; IRES = sítio de entrada interna do ribossomo; LacZ = β-galactosidase; LUC = luciferase; NEO = neomicina fosfortransferase; PAC = puromicina n-acetiltransferase.

QUADRO 2 - REPLICONS DE VÍRUS DO GÊNERO FLAVIVÍRUS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Atualmente ainda existem muitos pontos a serem desvendados com relação à patogênese da dengue e até mesmo com relação a questões mais básicas como o papel desempenhado pelas diferentes proteínas virais durante a morfogênese e a interação potencial com outras proteínas virais ou do hospedeiro. Os clones infecciosos e replicons constituem ferramentas bastante interessantes que podem ser úteis para elucidar algumas dessas questões.

Com o objetivo de colaborar para o preenchimento dessas lacunas e tendo em vista a inexistência de um clone infeccioso ou replicon de uma cepa de DENV3 genótipo III, sorotipo cuja circulação tem predominado no Brasil nos últimos anos, tivemos como meta construir um replicon e clone infeccioso da cepa brasileira BR DEN3 290-02 (NOGUEIRA *et al.*, 2008).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar os diferentes segmentos correspondentes a totalidade do genoma da cepa BR DEN3 290-02 do vírus dengue sorotipo 3 por RT-PCR;
- Purificar, caracterizar e clonar os segmentos amplificados em plasmídeos de alta cópia;
- Determinar a sequência nucleotídica dos clones obtidos;
- Clonar todo genoma da cepa BR DEN3 290-02 do vírus dengue sorotipo 3, bem como, apenas os genes das proteínas não-estruturais, em vetores de baixa cópia com a finalidade de gerar o clone infeccioso e o replicon, respectivamente;
- Determinar a sequência nucleotídica dos clones do replicon e do clone infeccioso;

- Realizar a caracterização biológica em culturas de células do clone infeccioso e do replicon, após a transfecção dos ARNs gerados por transcrição *in vitro*;
- Determinar a sequência nucleotídica do genoma da progêne viral obtida a partir dos ensaios de transfecção de células C6/36 (*Aedes albopictus*) com o clone infeccioso;
- Inserir marcadores como a luciferase ou a proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein*, GFP) no replicon e fazer a caracterização do sistema.

3 JUSTIFICATIVA

Atualmente a dengue constitui a arbovirose mais comum que afeta os seres humanos, no entanto até o presente não existe tratamento específico e as tentativas de se desenvolver uma vacina eficiente não apresentaram os resultados esperados. As manifestações clínicas abrangem desde estados assintomáticos até a FHD/SCD. Os mecanismos envolvidos na patogênese da doença não são bem compreendidos e ainda representam um desafio, sendo que o desfecho parece ser o resultado de uma combinação de fatores virais e do hospedeiro. Nesse contexto o uso do sistema subgenômico de replicon e de um clone infeccioso representam instrumentos de pesquisa poderosos, pois permitem o estudo de marcadores de virulência, podendo contribuir para um melhor entendimento da patogênese da dengue e eventualmente dirigir intervenções tais como terapias antivirais.

Assim sendo, uma abordagem baseada no uso desses sistemas pode contribuir para um avanço significativo no conhecimento sobre diferentes etapas do ciclo viral. Esperamos que o desenvolvimento de tais ferramentas de pesquisa possa, através de sua aplicação, contribuir para uma melhor compreensão da infecção e patogênese pelos vírus da dengue.

4 METODOLOGIA

4.1 SOLUÇÕES E MEIOS

- TBE: 89mM Tris-base, 89mM ácido bórico, 2mM EDTA (pH 8.0);
- PBS: 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM Na₂HPO₄ .7H₂O, 1,5mM KH₂PO₄;
- PBS/glicerol: PBS, 10% glicerol;
- STE: 10mM Tris-HCl, 100mM NaCl , 1mM EDTA (pH 8);
- Solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico: 25 volumes de fenol (pH 7, 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 2,5mM de cada desoxiribonucleotídeo trifosfatado (dATP, dCTP, dGTP e dTTP);
- Tampão da Fosfatase Alcalina (*AP-BUFFER*): 100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂ (pH 9,5);
- Meio SOC: 2% bactotripton, 0,5% extrato de levedura, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM glicose;
- Meio LB (Meio de cultura "*Luria Broth*" para *E.coli*): 10g/L bactotripton, 5g/L extrato de levedura, 5g/L NaCl;
- Meio LB sólido: 10g/L bactotripton, 5g/L extrato de levedura, 5g/L NaCl, 15g/L agar;
- Meio TB (*Terrific broth*): 11,8g/L bactotripton, 23,6g/L extrato de levedura, 9,4g/L K₂HPO₄ e 2,2g/L KH₂PO₄;
- Meio TB sólido: 11,8g/L bactotripton, 23,6g/L extrato de levedura, 9,4 g/L K₂HPO₄, 2,2g/L KH₂PO₄ e 15g/L agar.

4.2 RT-PCR

O nosso primeiro passo foi amplificar os diferentes segmentos do genoma da cepa BR DEN3 290-02 (NOGUEIRA *et al.*, 2008), cuja sequência está depositada no GenBank sob o número EF629369, utilizando enzimas de alta fidelidade e seguindo a estratégia ilustrada na FIGURA 6. O ARN viral para esse fim foi extraído do sobrenadante de culturas de células C6/36 (*Aedes albopictus*) infectadas com a quarta passagem dessa cepa e purificado conforme descrito por Gould *et al.* (1985) com as seguintes modificações: o sobrenadante foi precipitado com 7% (p/v) de Polietilenoglicol (PEG) 8000 (Cat. No. 19959, USB, Cleveland, OH, EUA) e 2,3% (p/v) de NaCl (Cat. No. 1.06404.1000, Merck, Darmstadt, Alemanha). Após a clarificação o sedimento foi ressuspensão em tampão STE e purificado em gradiente descontínuo de 30% - 60% sacarose (Cat. No. S-0389, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Para extração do ARN viral foi utilizado o *QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit* (Cat. No. 52906, QIAGEN, Valencia, CA, EUA) conforme instruções do fabricante. A etapa de transcrição reversa para síntese do ADN complementar (cDNA) foi realizada com o *ImProm-IITM Reverse Transcription System* (Cat. No. A3800, Promega, Madison, WI, EUA) utilizando 12,5µM de oligonucleotídeos iniciadores randômicos (Cat. No. 48190-011, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 3mM de MgCl₂, conforme protocolo sugerido pelo fabricante. Nas reações de amplificação do cDNA (*polymerase chain reaction*, PCR) foram utilizados *Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Cat. No. 11304-011, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e *QIAGEN[®] LongRange PCR System* (Cat. No. 206402, QIAGEN, Valencia, CA, EUA) segundo as instruções do fabricante. Foi utilizado também o *TripleMaster[®] PCR System* (Cat. No. 954140261, Eppendorf, Westbury, NY, EUA) com as seguintes modificações: 5µL de cDNA foram misturados com 2µL de 10x *HighFidelity Buffer* com Mg²⁺, 337,5µM de deoxinucleotídeos (*deoxyribonucleotide triphosphate*, dNTPs), 1,5U de *TripleMaster Polymerase Mix* e água ultra-pura em quantidade suficiente para completar um volume final de 20µL. Os parâmetros de ciclagem foram: 94°C por 3 minutos 1 vez; 94°C por 30 segundos, 50-60°C por 30 segundos, 68°C por minuto por kilobase de produto, 35-40 vezes. A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados pode ser consultada no APÊNDICE A. O tamanho dos fragmentos de ADN amplificados foi verificado por eletroforese em gel 0,8% de agarose (Cat. No. 15510-027, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) contendo 0,2mg/mL de brometo de etídeo em

tampão TBE 1x. Para visualização do ADN foi utilizado um *UV Transilluminator Model M-26* (Ultra-Violet Products Ltd., Cambridge, Reino Unido) e as fotos foram tiradas e digitalizadas utilizando um *Electrophoresis Documentation and Analysis System 120* e o software *Kodak 1D v.2.0.3* (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EUA). Conforme o perfil de amplificação, se banda única ou não, os produtos foram purificados utilizando o *High Pure PCR Product Purification Kit* (Cat. No. 11732676001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) ou ainda o *QiaQuick® Gel Extraction Kit* (Cat. No. 28106, QIAGEN, Valencia, CA, EUA) seguindo protocolos dos fabricantes.

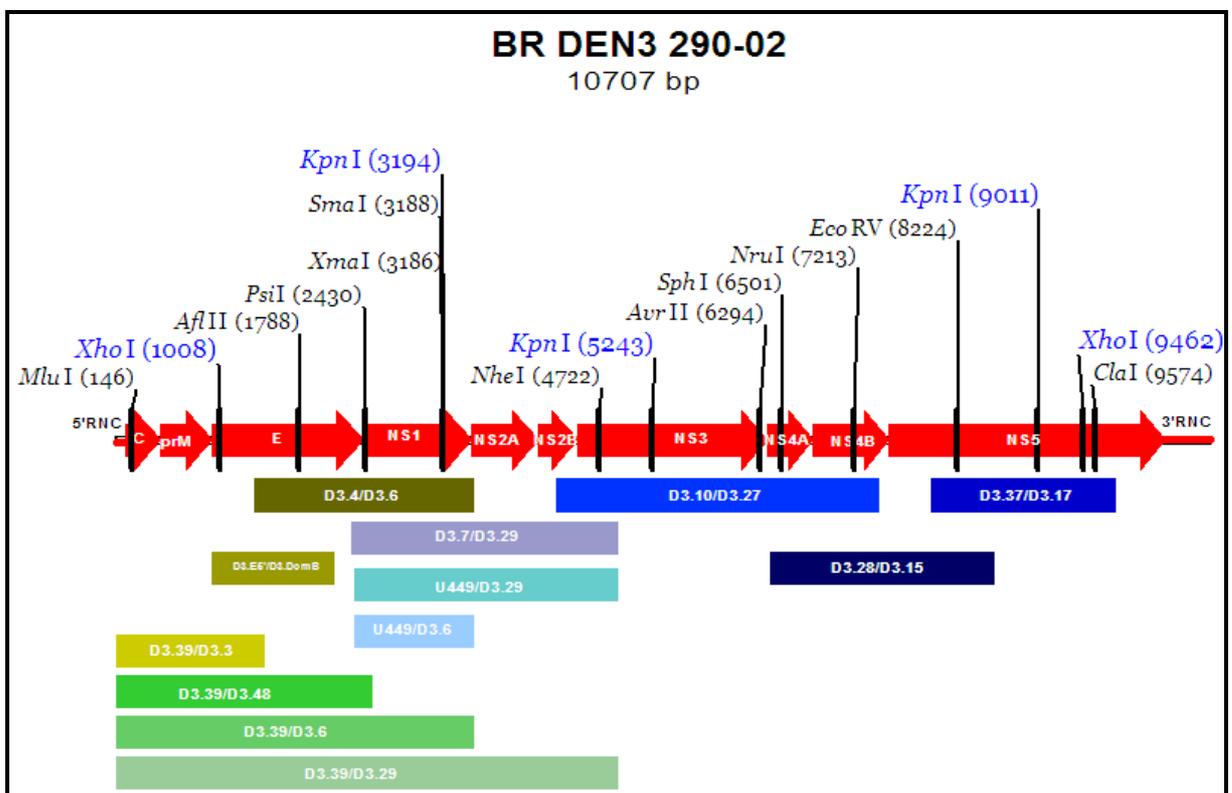


FIGURA 6 - Estratégia de amplificação utilizada para montagem do replicon e do clone infeccioso da cepa BR DEN3 290-02. Em vermelho está representado esquematicamente o genoma da cepa BR DEN3 290-02. Abaixo estão representados, os diferentes segmentos do genoma amplificados por RT-PCR em diferentes tons de azul e verde. Os segmentos foram nomeados de acordo com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para sua amplificação (oligonucleotídeo iniciador de polaridade positiva/oligonucleotídeo iniciador de polaridade negativa). Acima estão representados apenas os sítios de restrição que foram utilizados nos procedimentos de clonagem. O número entre parênteses indica sua posição no genoma viral e a cor indica se a enzima corta uma (preto) ou mais vezes (azul) o genoma viral (desenhado com o software Vector NTI do pacote Vector NTI Advance 10.3.1, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

4.3 CLONAGEM

Após a amplificação dos diferentes segmentos de ADN representando o genoma da cepa BR DEN3 290-02 procedeu-se a inserção dos mesmos em vetores de alta cópia através de procedimentos padrão de clonagem. Os vetores utilizados foram o pGEM[®]-T (Cat. No. A3600, Promega, Madison, WI, EUA) e o pGEM[®]-T-Easy (Cat. No. A1360, Promega, Madison, WI, EUA) seguindo protocolo de ligação sugerido pelo fabricante. Alguns segmentos foram clonados, após digestão com as enzimas apropriadas, diretamente nos vetores de baixa cópia #49pAC e #50pBAC. Nesses casos, foi utilizada a T4 ADN ligase (Cat. No. 70005Y, USB, Cleveland, OH, EUA ou Cat. No. M0202L, New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) segundo protocolo do fabricante. Os vetores foram gentilmente cedidos pelo Dr. Peter W. Mason (University of Texas Medical Branch), sendo que o vetor #49pAC (FIGURA 7A) é derivado do vetor pACNR (RUGGLI *et al.*, 1996) e o vetor #50pBAC (FIGURA 7B) é derivado do vetor pBeloBAC11 (SHIZUYA *et al.*, 1992). Esses vetores já haviam sido modificados previamente no laboratório do Dr. Mason pela adição de um sítio múltiplo de clonagem (NotI, BamHI, XhoI, Swal) entre os dois sítios NotI do pBeloBAC11 (pBACDV1poly) e de outro (NotI, BspTI, BspEI, NgoMIV, PshAI, PmlI and XhoI) no pACNR (pACDV1poly) (SUZUKI *et al.*, 2007). Posteriormente foram utilizados os sítios BamHI/Swal no pACDV1poly e NotI/Swal no pBACDV1poly para inserção de um cassete sintético (Bio Basic Inc., Markham, ON, Canadá) contendo um sítio NotI, o promotor da T7 ARN polimerase mais um G adicional, o 5'RNC, os 56 primeiros nucleotídeos que codificam a proteína C, um sítio múltiplo de clonagem contendo sítios para MluI, XhoI, AflII/BspTI, XmaI/SmaI, NheI, AvrII, SphI, NruI, EcoRV e ClaI, os 693 nucleotídeos que codificam a porção C-terminal da proteína NS5, o 3'RNC, a sequência da ribozima do vírus da hepatite delta (*Hepatitis delta vírus*, HDV) e um sítio Swal. As sequências dos vetores podem ser consultadas no ANEXO A. Todos os procedimentos de ligação foram realizados considerando a princípio uma razão molar vetor:inserto de 1:3 como ideal.

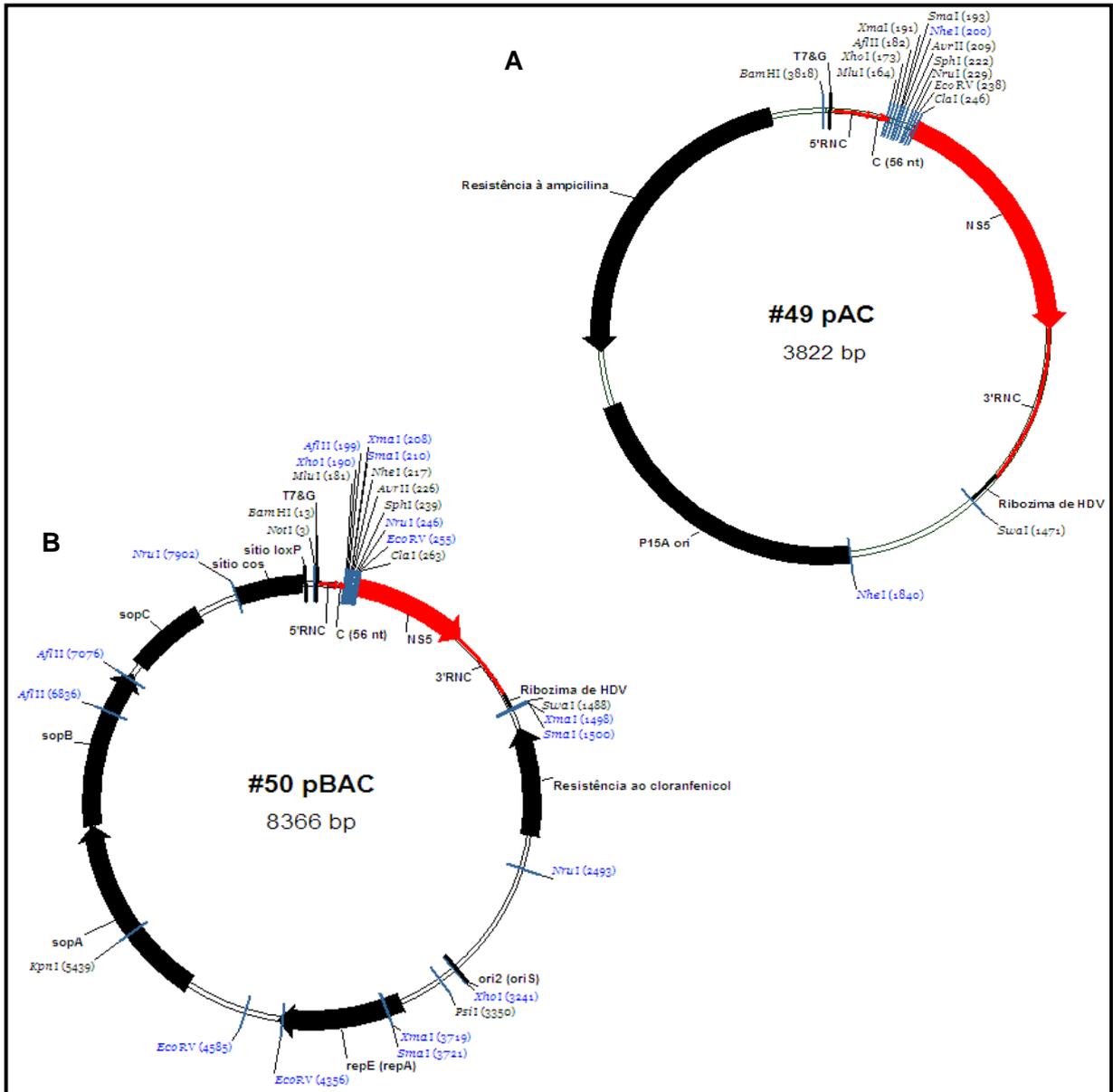


FIGURA 7 - Representação esquemática dos vetores de baixa cópia utilizados nos procedimentos de clonagem: #49pAC (A) e #50pBAC (B). Em preto estão representados componentes do vetor e em vermelho os segmentos do genoma da cepa BR DEN3 290-02. Estão representados apenas os sítios de restrição que foram utilizados nos procedimentos de clonagem para montagem do replicon e do clone infeccioso. O número entre parênteses indica sua posição no vetor e a cor indica se a enzima corta o mesmo uma (preto) ou mais vezes (azul) (desenhado com o software Vector NTI do pacote Vector NTI Advance 10.3.1, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

4.4 TRANSFORMAÇÃO DAS LIGAÇÕES E TRIAGEM DOS POTENCIAIS CLONES

As cepas de *Escherichia coli* utilizadas nesse trabalho foram: Top 10 e Top10F' quimio-competentes (CaCl₂) preparadas em nosso laboratório a partir de estoques em 50% glicerol segundo protocolo de Mandel e Higa (1970) modificado. O

genótipo das linhagens bacterianas pode ser consultado no ANEXO B. Para transformação as bactérias competentes foram descongeladas em banho de gelo e todo volume da ligação adicionado a 100 μ L da bactéria. Essa mistura era mantida em gelo por 30 minutos e depois submetida a um choque térmico por 40 segundos (Top10) ou 2 minutos (Top10F') a 42°C e 40 segundos (Top10) ou 2 minutos (Top10F') em gelo novamente. Por fim, eram adicionados 250 μ L (Top10) ou 900 μ L (Top10F') de meio SOC e a mistura mantida sob agitação (200rpm) a 37°C por uma hora para recuperação das células transformadas. Após este período alíquotas ou todo volume das bactérias transformadas eram semeadas em placas contendo meio TB ou LB sólido contendo o antibiótico apropriado (100 μ g/mL de ampicilina, 15 μ g/mL de cloranfenicol ou 50 μ g/mL de ampicilina) dependendo do vetor utilizado na clonagem (pGEM[®]-T/pGEM[®]-T-easy, #50pBAC ou #49pAC, respectivamente). No caso das transformações com vetores pGEM[®]-T ou pGEM[®]-T-easy foram utilizadas placas de meio LB sólido que além do antibiótico apropriado continham 80 μ g/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo (X-Gal) e 0,5mM isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG), uma vez que esse vetor possui uma sequência codificadora de β -lactamase (lacZ) que é interrompida na presença do inserto, o que permite a triagem preliminar dos clones positivos (colônias brancas) pela cor das colônias. As placas eram incubadas a 37°C/16h (clonagem em vetores de alta cópia) ou a 30°C/24h (clonagem em vetores de baixa cópia). Após a verificação da presença de possíveis colônias recombinantes na placa, era feita uma placa mãe para a identificação de cada eventual clone. Esta placa mãe consistia do mesmo meio descrito acima, com um papel quadriculado numerado colado no fundo. Cada clone candidato era transferido da placa de crescimento para um quadrado numerado da placa mãe com o auxílio de um palito de dente e a placa era incubada durante a noite a 37°C ou 30°C. Este procedimento permitia a análise das possíveis colônias recombinantes de forma inequívoca.

A triagem dos clones em potencial foi realizada a partir da placa mãe pela técnica de palitagem (BARNES, 1977) ou pela técnica de PCR de colônia, dependendo do tamanho final do plasmídeo (vetor+inserto). A técnica de palitagem consiste em passar cada uma das colônias bacterianas contendo potenciais clones com auxílio de um palito de dente estéril para um microtubo numerado ao qual são adicionados 20 μ L de um tampão de lise (5mM NaOH, 5% Glicerol, 0,5% dodecil

sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*, SDS), 5mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) contendo uma pitada de azul de bromofenol). Essa mistura é incubada a 65°C por 10 minutos e as amostras são então aplicadas em gel 0,8% de agarose em paralelo a uma amostra do vetor nativo. Para visualização das bandas de ADN plasmidial, o gel é incubado em solução de 0,5µg/mL de brometo de etídeo. Os clones recombinantes são identificados pela diferença de massa molecular com relação ao vetor nativo. Para a PCR de colônia, colônias bacterianas com os clones em potencial também eram transferidas para um microtubo numerado com o auxílio de um palito de dente estéril onde eram esgotados em 15µL de H₂O ultra-pura. Em seguida, os microtubos eram incubados a 94°C por 5 minutos, centrifugados a velocidade máxima (12100g) por 30 segundos e 1µL do sobrenadante era adicionado a 14µL de mistura para PCR preparada de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante da *Taq DNA polymerase* (Cat. No. 10342-020, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Os parâmetros de ciclagem utilizados foram: 95°C por 3 minutos 1 vez; 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 68°C por minuto por kilobase de produto, 35 vezes.

As colônias contendo os prováveis clones recombinantes eram inoculadas em 3-20mL de meio terrific líquido contendo o antibiótico específico, e crescidas a 37°C ou 30°C por 16-24 horas sob agitação constante (200 rpm). Esses inóculos eram utilizados na minipreparação dos plasmídeos recombinantes e na preparação de estoques em 25% de glicerol estéril que eram armazenados a -80°C.

4.5 MINIPREPARAÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES E VERIFICAÇÃO DO TAMANHO DO INSERTO

Para a minipreparação dos plasmídeos recombinantes foi utilizado o *Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Cat. No. A1460, Promega, Madison, WI, EUA) segundo as recomendações do fabricante.

A fim de confirmar a identidade do inserto foram realizadas digestões com enzimas que flanqueiam o mesmo para que seu tamanho pudesse ser verificado. No caso das clonagens utilizando os vetores pGEM[®]-T ou pGEM[®]-T-easy foram

utilizadas sempre as enzimas SacII (Cat. No. R0157S, New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) e SacI (Cat. No. E1078Y, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido) que digerem o plasmídeo em 2 sítios que flanqueiam o inserto e o genoma da cepa BR DEN3 290-02 em apenas um ponto (SacII, nucleotídeo 5868).

4.6 SEQUENCIAMENTO DOS CLONES POSITIVOS

Os clones positivos foram sequenciados para confirmar sua identidade com a da cepa BR DEN3 290-02. O sequenciamento foi realizado a partir da minipreparação dos plasmídeos recombinantes ou a partir de PCRs do inserto. As sequências nucleotídicas foram determinadas utilizando o *BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Cat. No. 4336917, Applied Biosystems, Foster City, IA, EUA) em um *ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, IA, EUA). Na reação de sequenciamento foram utilizados até 5,3µL de ADN, 0,7µL de primer (5pmol/µL), 2µL de *Dye Terminator* e 2µL de tampão *Save Money* (200mM Tris-HCl pH9, 5mM MgCl₂). A quantidade de ADN utilizada na reação foi estabelecida de acordo com o recomendado pelo fabricante do kit. Os parâmetros de ciclagem utilizados foram: 96°C por 2 minutos 1 vez; 96°C por 20 segundos, 50-58°C por 20 segundos, 60°C por 4 minutos, 30-35 vezes. As reações foram purificadas através da precipitação com 10% de 750mM acetato de amônio e 5 volumes de etanol absoluto. Após 20 minutos a temperatura ambiente as reações foram centrifugadas por 30 minutos a 2130g e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado com 150µL de 70% etanol e submetido à nova centrifugação (2130g/15 minutos). O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento seco por centrifugação invertida seguida de incubação a 37°C por 20 minutos. Por fim o ADN foi ressuspenso em 10µL de *Hi-Di[™] Formamide* (Cat. No. 4311320, Applied Biosystems, Foster City, IA, EUA). As sequências nucleotídicas foram analisadas utilizando o pacote de programas phred/Phrap/Consed (www.phrap.org) (EWING *et al.*, 1998; EWING; GREEN, 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998; GORDON; DESMARAIS; GREEN, 2001) e quando necessário o alinhamento nucleotídico foi feito utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (ALTSCHUL *et al.*, 1990). Alternativamente as sequências foram enviadas para empresa Macrogen (Seoul, Korea) onde foram sequenciadas em um *Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, IA, EUA).

4.7 CONSTRUÇÃO DO REPLICON E DO CLONE INFECCIOSO DA CEPA BR DEN3 290-02

Para construção tanto do replicon quanto do clone infeccioso da cepa BR DEN3 290-02 foi necessário unir através de sucessivas reações de digestão e ligação os diferentes segmentos do genoma viral que haviam sido clonados individualmente. No processo de construção, cada vez que um novo fragmento era acrescentado nos vetores de baixa cópia procuramos re-sequenciar esse fragmento conforme descrito no item anterior. As enzimas de restrição utilizadas nas diferentes etapas do processo foram: Mlul (Cat. No. R0198L), XhoI (Cat. No. R0146S), ClaI (Cat. No. R0197S), XmaI (Cat. No. R0180L), NheI (Cat. No. R0131L), AvrII (Cat. No. R0174S), SphI (Cat. No. R0182L), NruI (Cat. No. R0192S) (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA), EcoRV (Cat. No. E1042Y), SpeI (Cat. No. E1086Y) (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido), AaNI (ER2061) e BspTI (ER0831) (Fermentas, Glen Burnie, MD, EUA). Em todos os casos procurou-se seguir as recomendações do fabricante. Para purificação dos produtos de digestão foram utilizados os mesmos procedimentos utilizados para purificação dos produtos de PCR mencionados no item 4.2.

4.8 TRANSCRIÇÃO *IN VITRO*

O plasmídeo recombinante do clone estável do replicon purificado conforme descrito no item 4.6, foi linearizado através de digestão com a enzima de restrição SwaI (Cat. No. R0604S, New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) e posteriormente purificado pela adição de 24% de 1M NaCl, 2% de 10ng/mL de glicogênio de ostra,

2% de 0,1g/mL SDS, 4% de 0,5M EDTA e 1,2 volumes de solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. Essa mistura foi misturada em vórtex e centrifugada a 16100g por 2 minutos. O sobrenadante foi passado para um novo microtubo ao qual se adicionou o mesmo volume de solução de clorofórmio:álcool isoamílico. Essa mistura foi novamente misturada em vórtex e centrifugada a 16100g por 2 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo ao qual foram adicionados 3,4 volumes de etanol 100% e mantido a -20°C por 16h. Após esse tempo a mistura foi centrifugada a 16100g por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 4 volumes de 70% etanol para retirar traços de sal. Foi realizada nova centrifugação a 16100g por 10 minutos, e o sobrenadante foi novamente descartado. O sedimento foi deixado a temperatura ambiente até secar sendo ressuspenso com 5µL de água livre de nuclease. Nos passos acima descritos foram utilizados reagentes, microtubos e ponteiras livres de RNase e as porcentagens (v/v) e volumes são referentes ao volume final da digestão com SwaI. O ADN purificado e linearizado serviu de molde para reação de transcrição *in vitro* que foi realizada com o *MEGAscript® T7 High Yield Transcription Kit* (Cat. No. AM1333, Ambion, Austin, TX, EUA). Na transcrição *in vitro* foram utilizados 3,5µL de ADN previamente linearizado com a endonuclease SwaI, 1 µL de 75mM dATP, 75mM dCTP e 75mM dTTP, 0,5µL de 75mM dGTP, 1µL de 40mM *RNA Cap structure analog* m⁷G(5')ppp(5')G (Cat. No. S1404S, New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) e 1µL de T7 ARN polimerase, que foram incubados a 38°C por 3h. A integridade e tamanho do ARN transcrito foram verificados por eletroforese em gel 0,8% de agarose sob condições livre de RNase. O ARN transcrito foi armazenado a -80°C até o momento da transfecção.

4.9 TRANSFECÇÃO

No procedimento de transfecção foram utilizados o ARN sintetizado na reação de transcrição *in vitro* descrita no item anterior e um ARN viral como controle positivo. Esse ARN foi extraído a partir do sobrenadante de cultura de uma infecção

em células C6/36 com a terceira passagem da cepa BR DEN3 290-02 (ARN 290 P4), previamente purificado em gradiente de sacarose conforme descrito no item 4.2.

Para a transfecção das células, misturou-se a lipofectina (Cat. No. 18292-011, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) ao meio Opti-MEM (Cat. No. 51985-034, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) numa proporção de 1:8 (40 μ L:280 μ L) e a mistura foi mantida a temperatura ambiente por 30 minutos. A seguir essa mistura foi adicionada na proporção de 1:1 (80 μ L:80 μ L) ao meio contendo o ARN (ARN transcrito *in vitro* ou ARN 290 P4) a ser transfectado ou ao meio sem ARN (controle negativo, *mock*). Após a adição de mais 1mL de meio Opti-MEM, as três misturas de transfecção foram adicionadas (4 x 290 μ L de cada mistura) a uma placa de cultura que havia sido semeada no dia anterior com $5,8 \cdot 10^4$ C6/36/cm². Cada poço havia sido previamente lavado com meio Opti-MEM. As placas foram mantidas a 28°C por 3h, período após o qual as misturas de transfecção foram descartadas e substituídas por meio Leibovitz (L-15) (Cat. No. 41300-039, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cat. No. 12657-029, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), 0,26% de triptose (Cat. No. T-9157, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 25 μ g/mL de gentamicina (Cat. No. 15710-064, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY, EUA). As placas foram novamente incubadas a 28°C e em diferentes pontos pós-transfecção (48, 72, 96 e 120h) os sobrenadantes foram recolhidos e o tapete celular fixado com uma mistura 1:1 de metanol acetona a -20°C até seu processamento para imunofluorescência.

4.10 IMUNOFLUORESCÊNCIA

As placas com as culturas de células C6/36 que haviam sido fixadas após diferentes tempos pós-transfecção, foram incubadas com anticorpos policlonais anti-dengue sorotipo 3 (α -D3) ou monoclonais anti-proteína de envelope (α -E, 4G2) (GENTRY *et al.*, 1982) ou anti-proteína NS1 (α -NS1, 7E11) (MASON *et al.*, 1990) para se verificar a expressão das proteínas virais. Para isso a solução de fixação foi descartada e as placas secas a temperatura ambiente. Em seguida foram incubadas a 37°C por 45 minutos com os anticorpos na diluição apropriada, lavadas três vezes

com PBS, incubadas por mais 45 minutos a 37°C com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (α -mouse FITC) (Cat. No. F0257-ML, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído 1:100 contendo 0,3% (v/v) de 10mg/mL azul de Evans. Por fim, foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos com uma solução de 0,5 μ g/mL de 4',6'-diamidino-2 fenilindol (4'-6'-diamidine-2-phenyl indole, DAPI), lavadas cinco vezes com PBS e após estarem secas foi adicionada uma solução de PBS/glicerol.

As imagens das imunofluorescências foram captadas com um microscópio Nikon Eclipse TE300 (Nikon, Tokyo, Japão) acoplado a uma câmera CoolSNAPTM-Pro_{cf} (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA). A visualização e edição foi realizada com auxílio do software Image-Pro[®] PLUS v.4.5.1.29 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA).

4.11 TITULAÇÃO

Os títulos virais foram determinados através da técnica de formação de focos de infecção em culturas de células C6/36, modificada de Dèspres, Frenkiel e Deubel (1993). Brevemente, uma monocamada de células C6/36 ($5,8 \cdot 10^4$ células/cm²) foi infectada com diferentes diluições do vírus a ser titulado em meio L-15 suplementado com 0,26% triptose e 25 μ g/mL gentamicina. Após 1h de incubação o meio de infecção foi substituído por uma mistura 1:1 (v/v) de meio L-15 suplementado com 10% SFB, 0,26% triptose e 25 μ g/mL gentamicina e uma solução de carboximetilcelulose 3,2% (Cat. No. C-4888, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As placas foram incubadas a 28°C por 7 dias até sua revelação. Para tal, as células foram lavadas com tampão PBS, fixadas e permeabilizadas com uma solução de 3% paraformaldeído (Cat. No. P-6148, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 0,5%, triton X-100 (Cat. No. X-100, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), respectivamente. A imuno-marcação foi realizada após incubação das culturas com o anticorpo α -D3 diluído 1:200 e anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina (α -mouse PA) (Cat. No. S372B, Promega, Madison, WI, EUA) diluído 1:10000. A revelação da reação foi realizada pela adição de 6,6% de 50mg/mL

cloreto de nitroazul de tetrazólio (*nitro blue tetrazolium*, NBT) (Cat. No. S380C, Promega, Madison, WI, EUA) e 3,3% de 50mg/mL p-toluidina 5-bromo-4-cloro-indolilfosfato (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, p-toluidine*, BCIP) (Cat. No. S381C, Promega, Madison, WI, EUA) diluídos em tampão da fosfatase alcalina.

5 RESULTADOS

5.1 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS SEGMENTOS DA CEPA BR DEN3 290-02 EM VETORES DE ALTA CÓPIA

O primeiro passo, conforme explicado no item 4.2, consistiu na amplificação por RT-PCR dos diferentes segmentos da cepa BR DEN3 290-02. Todos os segmentos foram amplificados com sucesso e possuíam o tamanho esperado. Na FIGURA 8 está ilustrado o perfil eletroforético em gel de agarose da amplificação de todos os segmentos de ADN conforme estratégia ilustrada na FIGURA 6.

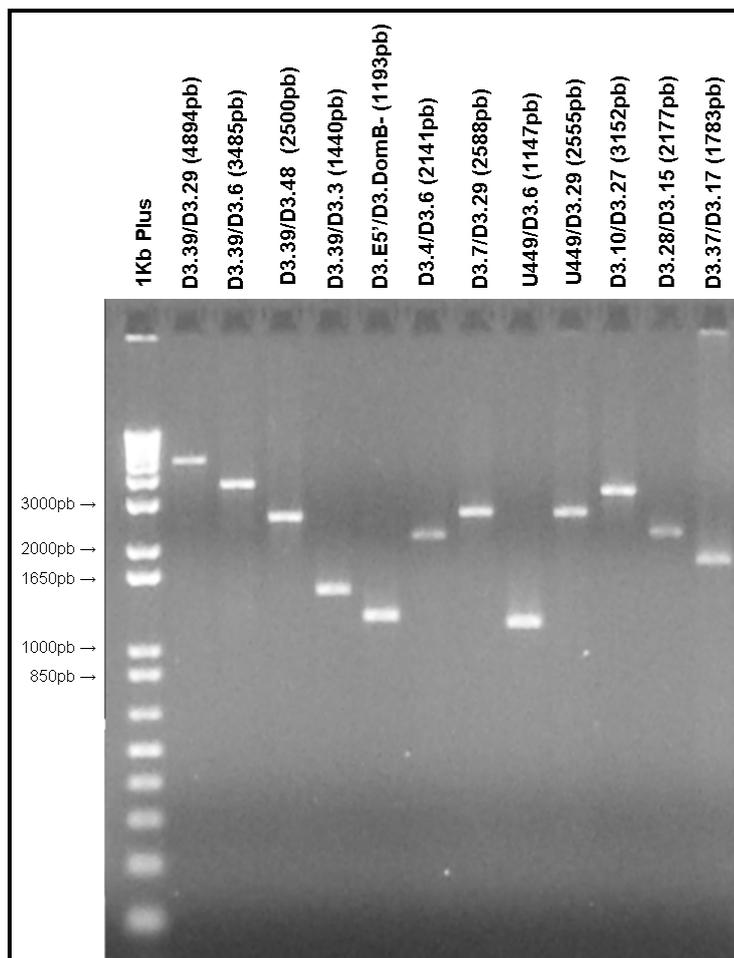


FIGURA 8 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose da amplificação por RT-PCR dos diferentes segmentos genômicos da cepa BR DEN3 290-02. Os segmentos foram nomeados de acordo com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para sua amplificação (oligonucleotídeo iniciador de polaridade positiva/oligonucleotídeo iniciador de polaridade negativa). Entre parênteses se encontra o tamanho esperado de cada segmento em pares de base (pb). Foram aplicados aproximadamente 20ng de cada produto de RT-PCR purificado e 250ng do marcador de massa molecular *1Kb Plus DNA Ladder* (Cat. No. 10787-018, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

O passo seguinte foi a inserção dos segmentos D3.39/D3.29, D3.39/D3.6, D3.39/D3.48, D3.E5'/D3.DomB-, D3.4/D3.6, D3.7/D3.29, D3.10/D3.27, D3.28/D3.15 e D3.37/D3.17 em vetores de alta cópia (pGEM[®]-T e pGEM[®]-T-easy). Apesar de várias tentativas, não tivemos sucesso na inserção dos segmentos D3.39/D3.29 e D3.39/D3.6. Os segmentos D3.39/D3.48 e D3.4/D3.6 apresentaram-se como segmentos de difícil clonagem. Para conseguir sua inserção, o procedimento de ligação foi realizado a 4°C por 16h, como recomendado pelo fabricante para obtenção de maior número de transformantes, e as bactérias transformadas, depois de plaqueadas, foram incubadas a 30°C e não a 37°C, como é padrão. Mesmo utilizando esses procedimentos o número de colônias e de clones positivos identificados após a triagem era sempre pequeno. Os demais segmentos foram clonados sem maiores problemas. A triagem dos clones foi realizada pela técnica de palitagem conforme descrito no item 4.4. Os clones positivos foram minipreparados como descrito no item 4.5 e digeridos com as endonucleases SacI e SacII para que o tamanho do inserto fosse verificado e a positividade do clone confirmada. Na FIGURA 9 podemos ver o perfil eletroforético em gel de agarose dos clones positivos em sua forma nativa e após a liberação do inserto por digestão com as enzimas SacI e SacII.

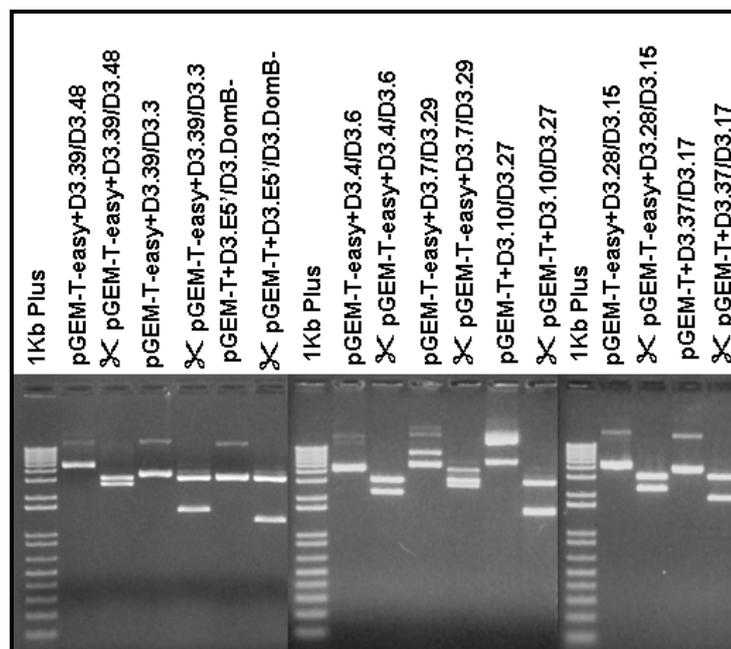


FIGURA 9 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose dos clones positivos minipreparados e de sua digestão (X) com as endonucleases SacI e SacII. Foram aplicados 250ng do marcador de massa molecular 1Kb Plus DNA Ladder e aproximadamente 200ng de cada minipreparação, sendo que a mesma quantidade foi utilizada na digestão.

Como podemos verificar pela comparação dos dados do QUADRO 3 e da FIGURA 9, todos os clones continham insertos do tamanho esperado.

Nome do clone	Tamanho esperado dos fragmentos liberados por digestão com SacI e SacII (pb)
pGEM-T-easy+D3.39/D3.48	2500
pGEM-T-easy+D3.39/D3.3	1440
pGEM-T+D3.E5'/D3.DomB-	1193
pGEM-T-easy+D3.4/D3.6	2141
pGEM-T-easy+D3.7/D3.29	2588
pGEM-T+D3.10/D3.27	1566 e 1585
pGEM-T-easy+D3.28/D3.15	2177
pGEM-T+D3.37/D3.17	1783

FONTE: O autor (2009)

QUADRO 3 - TAMANHO ESPERADO DOS FRAGMENTOS LIBERADOS PELA DIGESTÃO COM SACI E SACII

Todos esses clones foram posteriormente sequenciados e apenas os que não possuíam mutações que implicassem em uma modificação na composição aminoacídica da poliproteína foram utilizados nos passos seguintes.

5.2 CONSTRUÇÃO DO REPLICON DA CEPA BR DEN3 290-02

Em seguida, procedeu-se a montagem do replicon e do clone infeccioso através da subclonagem dos fragmentos acima descritos nos vetores de baixa cópia (#49pAC e #50pBAC). O primeiro passo consistiu na passagem da porção entre os sítios NheI e SphI para o vetor #50pBAC, a partir da digestão desse e do clone pGEM-T-easy+D3.10/D3.27 (FIGURA 9) com as enzimas de restrição NheI e SphI. Os passos envolvidos na obtenção do clone pBAC+D3/290NheI/SphI estão ilustrados na FIGURA 10 e a representação esquemática do clone na FIGURA 12.

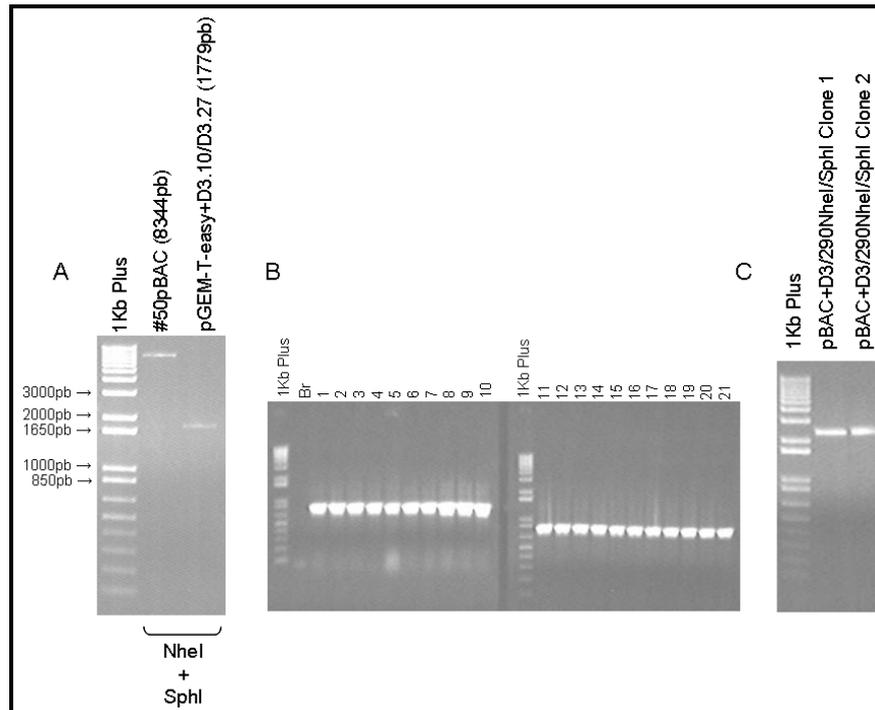


FIGURA 10 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose mostrando as etapas envolvidas na obtenção do clone pBAC+D3/290NheI/SphI. (A) Perfil eletroforético das reações de digestão do vetor #50pBAC e do clone pGEM-T-easy+D3.10/D3.27 com as enzimas NheI e SphI após purificação. Entre parênteses encontra-se o tamanho esperado do fragmento liberado pela digestão. Foram aplicados 6% e 10% do volume das reações de digestão purificadas do vetor #50pBAC e do clone pGEM-T-easy+D3.10/D3.27, respectivamente. (B) Triagem dos clones candidatos através de PCR de colônia com os oligonucleotídeos iniciadores D3.28 e D3.25 cujo produto possui um tamanho esperado de 813pb. Foram aplicados 67% do volume da PCR de colônia. (C) Produtos de PCR purificados utilizados para o sequenciamento nucleotídico. As PCRs foram realizadas usando como molde o plasmídeo minipreparado de dois clones positivos, com os oligonucleotídeos iniciadores D3.39 e U448 cujo produto possui um tamanho esperado de aproximadamente 2263pb. Foram aplicados 10% do volume das PCRs purificadas. Em todos os géis foram aplicados 250ng do marcador de massa molecular *1Kb Plus DNA Ladder*.

Em paralelo foi realizada a passagem do fragmento de ADN, localizado entre os sítios de clivagem das endonucleases EcoRV e ClaI, para o vetor #49pAC pela digestão do mesmo e do clone pGEM-T+D3.37/D3.17 (FIGURA 9) com essas enzimas, dando origem ao clone pAC+D3/290EcoRV/ClaI (FIGURA 12). Esse por sua vez, juntamente com o clone pGEM-T-easy+D3.28/D3.15 (FIGURA 9), foi digerido com as enzimas SphI e EcoRV para inserção do fragmento situado entre esses dois sítios no clone pAC+D3/290EcoRV/ClaI, resultando na obtenção do clone pAC+D3/290SphI/ClaI (FIGURAS 11 e 12).

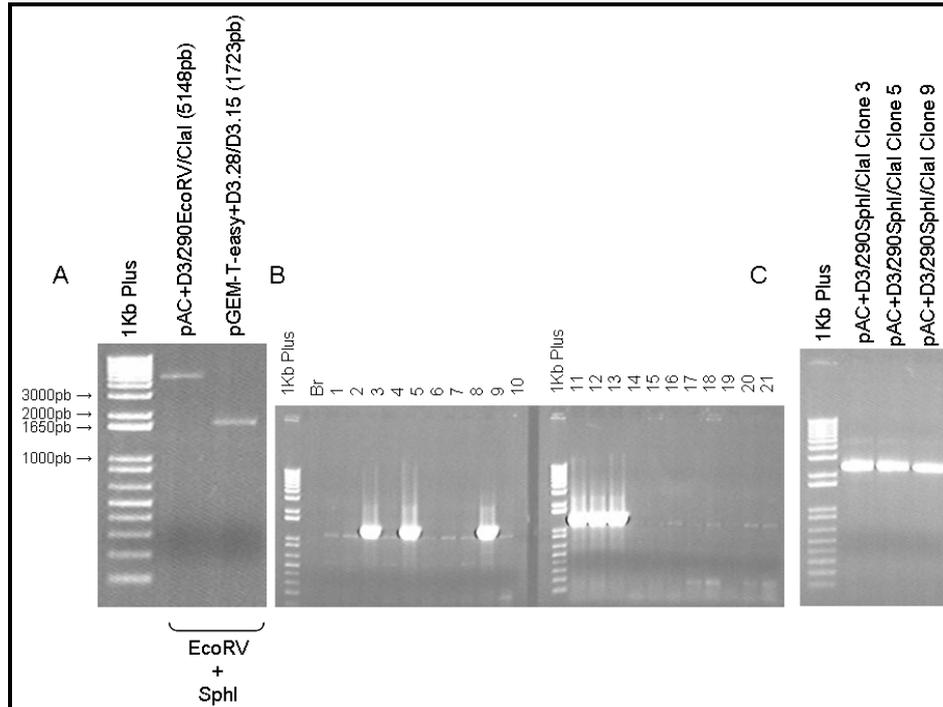


FIGURA 11 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose das etapas para a obtenção do clone pAC+D3/290SphI/ClaI. (A) Perfil eletroforético das reações de digestão purificadas dos clones pAC+D3/290EcoRV/ClaI e pGEM-T-easy+D3.28/D3.15 com as enzimas EcoRV e SphI. Entre parênteses encontra-se o tamanho esperado do fragmento liberado pela digestão. Foram aplicados 10% do volume das reações de digestão purificadas. (B) Triagem dos clones candidatos através da técnica de PCR de colônia com os oligonucleotídeos iniciadores D3.37 e D3.23 cujo produto possui um tamanho esperado de 1347pb. Foram aplicados 67% do volume da PCR de colônia. (C) Produtos de PCR purificados utilizados para o sequenciamento nucleotídico. As reações de PCR foram feitas a partir do plasmídeo minipreparado de três clones positivos utilizando os oligonucleotídeos iniciadores D3.39 e D3.15 cujo produto possui um tamanho esperado de aproximadamente 2226pb. Foram aplicados 4% do volume das PCRs purificadas. Em todos os géis foram aplicados 250ng do marcador de massa molecular *1Kb Plus DNA Ladder*.

A seguir os clones pAC+D3/290SphI/ClaI e pBAC+D3/290NheI/SphI foram digeridos com as enzimas SphI e ClaI para que a porção do genoma da cepa BR DEN3 290-02 compreendida entre esses dois sítios de restrição fosse inserida no clone pBAC+D3/290NheI/SphI. O clone obtido através desse procedimento foi nomeado pBAC+D3/290NheI/ClaI (FIGURAS 12 e 13).

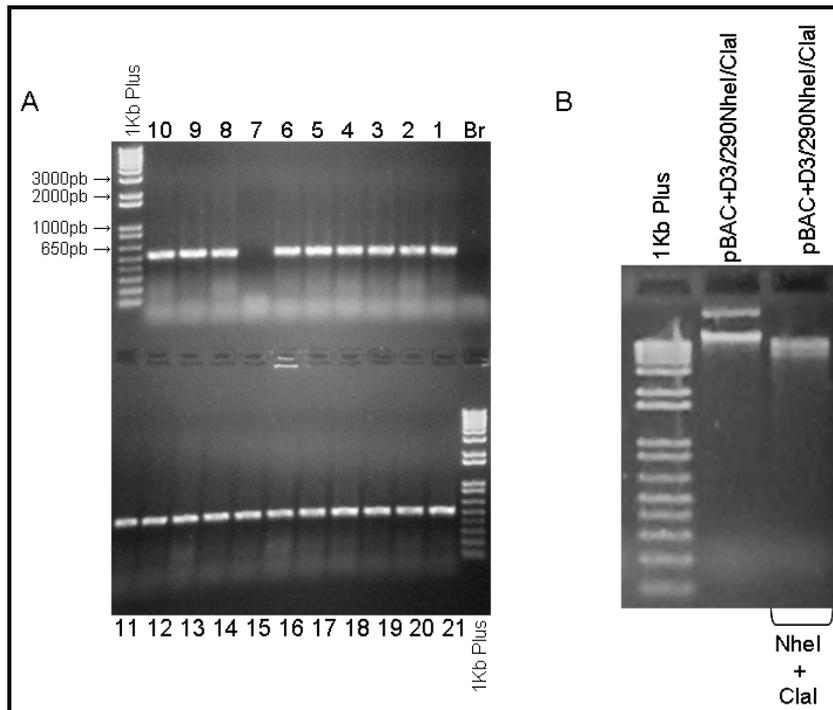


FIGURA 13 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose das etapas para a obtenção do clone pBAC+D3/290NheI/ClaI. (A) Triagem dos clones candidatos através de reações de PCR de colônia com os oligonucleotídeos iniciadores D3.28 e D3.13 cujo produto possui um tamanho esperado de 536pb. Foram aplicados 67% do volume da PCR de colônia. (B) Confirmação da identidade de um dos clones positivos na PCR de colônia por digestão do plasmídeo minipreparado com as enzimas NheI e ClaI. Os tamanhos esperados dos fragmentos liberados são 8320pb e 4852pb. Foram aplicados 4% do volume do plasmídeo minipreparado e todo volume da digestão da mesma quantidade de plasmídeo. Em todos os géis foram aplicados 250ng do marcador de massa molecular *1Kb Plus DNA Ladder*.

A porção do clone pBAC+D3/290NheI/ClaI compreendida entre os sítios NheI e ClaI teve sua sequência nucleotídica inteiramente determinada e quando comparada ao genoma da cepa BR DEN3 290-02 apresentou apenas uma mutação não sinônima no nucleotídeo 7867 (A → G).

O produto da reação de PCR U449/D3.29 foi clonado diretamente no #50pBAC pela digestão do vetor e do fragmento de ADN da PCR com as enzimas MluI e NheI (pBAC+D3/290MluIU449/D3.29). Quatro dos clones obtidos pela ligação desse fragmento ao vetor foram sequenciados e todos possuíam mais de uma mutação não-sinônima. Porém, um desses clones não apresentava nenhuma mutação no segmento entre os sítios XmaI e NheI. Assim sendo, passamos essa porção do genoma da cepa BR DEN3 290-02 para o vetor #49pAC, digerindo esse clone e o vetor com as endonucleases XmaI e SphI (FIGURA 14).

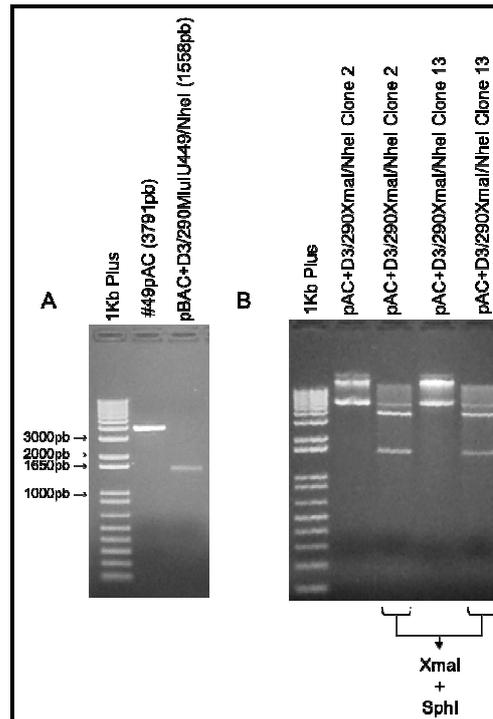


FIGURA 14 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose das etapas para a obtenção do clone pAC+D3/290XmaI/NheI. (A) Perfil eletroforético das reações de digestão purificadas do clone pBAC+D3/290MluI/449/NheI e do vetor #49pAC com as enzimas XmaI e SphI. Entre parênteses encontra-se o tamanho esperado do fragmento liberado pela digestão. Foram aplicados 13% e 8% do volume das reações de digestão purificadas do clone pBAC+D3/290MluI/449/NheI e do vetor #49pAC, respectivamente. (B) Confirmação da identidade de dois clones positivos pela técnica de palitagem (foto não mostrada) por digestão dos plasmídeos minipreparados com as enzimas XmaI e SphI. Os tamanhos esperados dos fragmentos liberados são 1558pb e 3791pb. Foram aplicados 4% do volume do plasmídeo minipreparado e todo volume da digestão de 2% do volume do plasmídeo minipreparado. Em todos os géis foram aplicados 250ng do marcador de massa molecular *1Kb Plus DNA Ladder*.

O clone denominado pAC+D3/290XmaI/NheI cuja construção foi descrita no parágrafo anterior, foi digerido com as enzimas XmaI e BspTI em paralelo à digestão do clone pGEM-T-easy+D3.4/D3.6 (FIGURA 9). A porção do genoma situada entre esses dois sítios de restrição foi então adicionada ao clone pAC+D3/290XmaI/NheI, originando o clone pAC+D3/290BspTI/NheI (FIGURA 15).

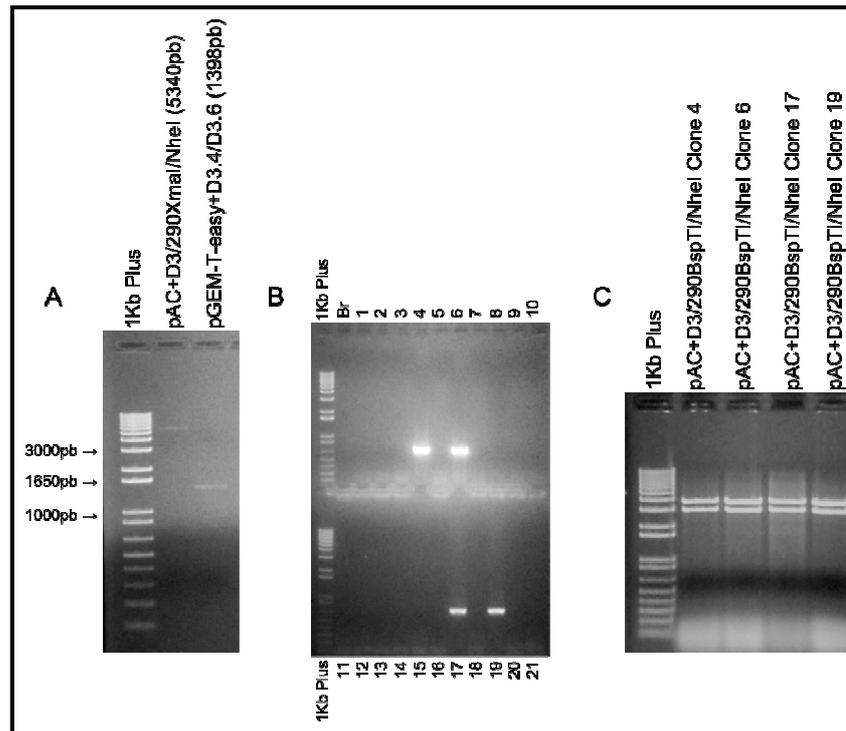


FIGURA 15 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose das etapas para a obtenção do clone pAC+D3/290BspTI/NheI. (A) Perfil eletroforético das reações de digestão purificadas dos clones pAC+D3/290XmaI/NheI e pGEM-T-easy+D3.4/D3.6 com as enzimas XmaI e BspTI. Entre parênteses encontra-se o tamanho esperado do fragmento liberado pela digestão. Foram aplicados 20% e 13% do volume das reações de digestão purificadas dos clones pAC+D3/290XmaI/NheI e pGEM-T-easy+D3.4/D3.6, respectivamente. (B) Triagem dos clones candidatos através de PCR de colônia com os oligonucleotídeos iniciadores D3.36 e D3.6, cujo produto possui um tamanho esperado de 666pb. Foram aplicados 67% do volume da PCR de colônia. (C) Confirmação da identidade de quatro clones positivos na PCR de colônia por digestão dos plasmídeo minipreparados com as enzimas BspTI e EcoRV. Os tamanhos esperados dos fragmentos liberados são 3766pb e 2972pb. Foram aplicados todo volume da digestão de 2,5% do volume dos plasmídeos minipreparados. Em todos os géis foram aplicados 250ng do marcador de massa molecular *1Kb Plus DNA Ladder*.

Em seguida o clone pAC+D3/290BspTI/NheI e o produto da reação de PCR U449/D3.6 foram digeridos com as enzimas XmaI e MluI (FIGURA 16). O oligonucleotídeo iniciador U449 possui um sítio de clivagem para a enzima MluI em sua porção 5' e foi desenhado de forma que hibridizasse na região da sequência sinal da proteína NS1, permitindo assim a inserção desse fragmento justaposto aos 56 nucleotídeos iniciais que codificam a proteína C e que precedem esse sítio no vetor. O resultado foi o clone denominado pAC+D3/290MluIU449/NheI que quando digerido em paralelo com o clone pBAC+D3/290NheI/ClaI (FIGURA 12) com as enzimas MluI e NheI permitiu que obtivéssemos os primeiros clones do replicon BR DEN3 290-02 (FIGURA 16).

Como pode ser visto na FIGURA 16A o plasmídeo do clone pAC+D3/290BspTI/NheI digerido com XmaI e MluI co-purificou com o plasmídeo não

digerido. Uma vez que esse material foi utilizado na ligação para obtenção do clone pAC+D3/290MlulU449/NheI, isso explica o aparecimento de bandas no gel de dois tamanhos distintos (1860 pb e 1297pb) na PCR de colônia (FIGURA 16B). Sendo que os fragmentos de maior massa molecular foram amplificados a partir dos plasmídeos não digeridos que foram co-transformados e as de tamanho menor a partir dos clones pAC+D3/290MlulU449/NheI.

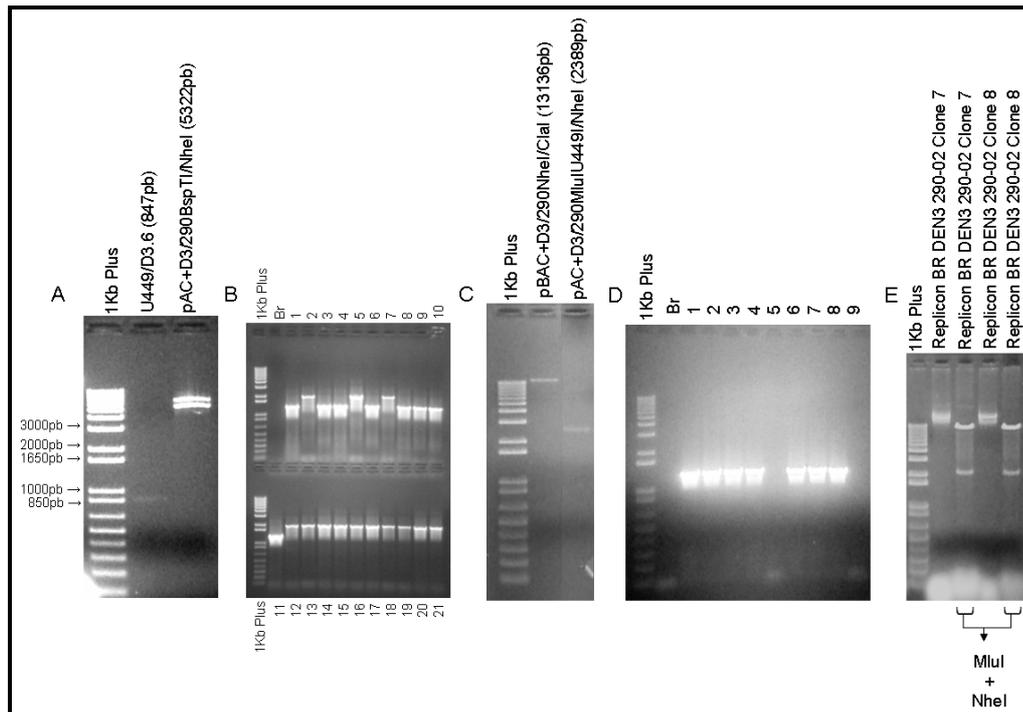


FIGURA 16 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose das etapas para a obtenção dos clones pAC+D3/290MlulU449/NheI e replicon BR DEN3 290-02. (A) Perfil eletroforético das reações de digestão purificadas do clone pAC+D3/290BspTI/NheI e da PCR U449/D3.6 com as enzimas Mlul e XmaI. Entre parênteses encontra-se o tamanho esperado do fragmento liberado pela digestão. Foram aplicados 13% do volume das reações de digestão purificadas. (B) Triagem dos clones candidatos através de PCR de colônia com os oligonucleotídeos iniciadores D3.39 e D3.6 cujo produto possui um tamanho esperado de 1297pb. Foram aplicados 67% do volume da PCR de colônia. (C) Perfil eletroforético das reações de digestão purificadas dos clones pAC+D3/290MlulU449/NheI e pBAC+D3/290NheI/ClaI com as enzimas Mlul e NheI. Entre parênteses encontra-se o tamanho esperado do fragmento liberado pela digestão. Foram aplicados 6% e 8% do volume das reações de digestão purificadas dos clones pBAC+D3/290NheI/ClaI e pAC+D3/290MlulU449/NheI, respectivamente. (D) Triagem dos clones candidatos através de PCR de colônia com os oligonucleotídeos iniciadores D3.39 e D3.6 cujo produto possui um tamanho esperado de 1297pb. Foram aplicados 67% do volume da PCR de colônia. (E) Confirmação da identidade de dois clones positivos na PCR de colônia por digestão dos plasmídeo minipreparados com as enzimas Mlul e NheI. Os tamanhos esperados dos fragmentos liberados são 13136pb e 2389pb. Foram aplicados 3,3% do volume dos plasmídeos minipreparados e todo volume da digestão da mesma quantidade de plasmídeo. Em todos os géis foram aplicados 250ng do marcador de massa molecular *1Kb Plus DNA Ladder*.

Um dos clones do replicon BR DEN3 290-02 foi parcialmente sequenciado e foram observadas mutações não sinônimas nas regiões que codificam as proteínas

NS1, NS2A e NS2B. Sendo que uma dessas alterava a fase de leitura da poliproteína.

A fim de contornar esse problema foram utilizados os clones pAC+D3/290MluIU449/NheI e pGEM-T-easy+D3.7/D3.29 (FIGURA 9). O sequenciamento nucleotídico parcial do clone pAC+D3/290MluIU449/NheI não identificou o aparecimento de mutações entre os sítios MluI e XmaI, assim sendo digerimos o mesmo com as enzimas XmaI e AvrII e também o clone pGEM-T-easy+D3.7/D3.29, que havia sido previamente sequenciado, com as enzimas XmaI e SpeI (FIGURAS 18A e 18B). Os sítios de clivagem das enzimas AvrII e SpeI resultam em extremidades coesivas, o que possibilitou a montagem do clone pAC+D3/290MluIU449/D3.29 (FIGURA 17). O fato de existirem dois sítios de restrição para NheI no vetor #49pAC (FIGURA 7) e conseqüentemente no clone pAC+D3/290MluIU449/NheI (FIGURA 17) impossibilitou o uso dessa endonuclease, ao invés da estratégia AvrII/SpeI, na montagem do clone pAC+D3/290MluIU449/D3.29 (FIGURA 17).

Para construção do clone pAC+D3/290MluIU449/D3.29 foram utilizados fragmentos que haviam sido previamente sequenciados e nos quais não foram observadas mutações. Esse clone, juntamente com o clone pBAC+D3/290NheI/ClaI, descrito anteriormente, foram utilizados em uma nova tentativa de se obter o replicon da cepa BR DEN3 290-02. Ambos os clones foram digeridos com as endonucleases NheI e MluI (FIGURA 18C) de forma a permitir que o fragmento do clone pAC+D3/290MluIU449/D3.29 situado entre esses sítios fosse adicionado ao clone pBAC+D3/290NheI/ClaI, dando origem a um novo clone do replicon BR DEN3 290-02 (FIGURAS 18D e 19). Diferentes segmentos desse clone, abrangendo a porção situada entre os sítios de clivagem para as enzimas MluI e ClaI, que não estavam presentes no vetor #50pBAC, foram amplificados por PCR (FIGURA 18E) e tiveram sua seqüência nucleotídica determinada. Foi constatada a presença de apenas uma mutação sinônima, que já havia sido identificada no clone pBAC+D3/290NheI/ClaI. O resultado do alinhamento das seqüências deste clone com a da cepa viral BR DEN3 290-02 pode ser consultado no APÊNDICE B.

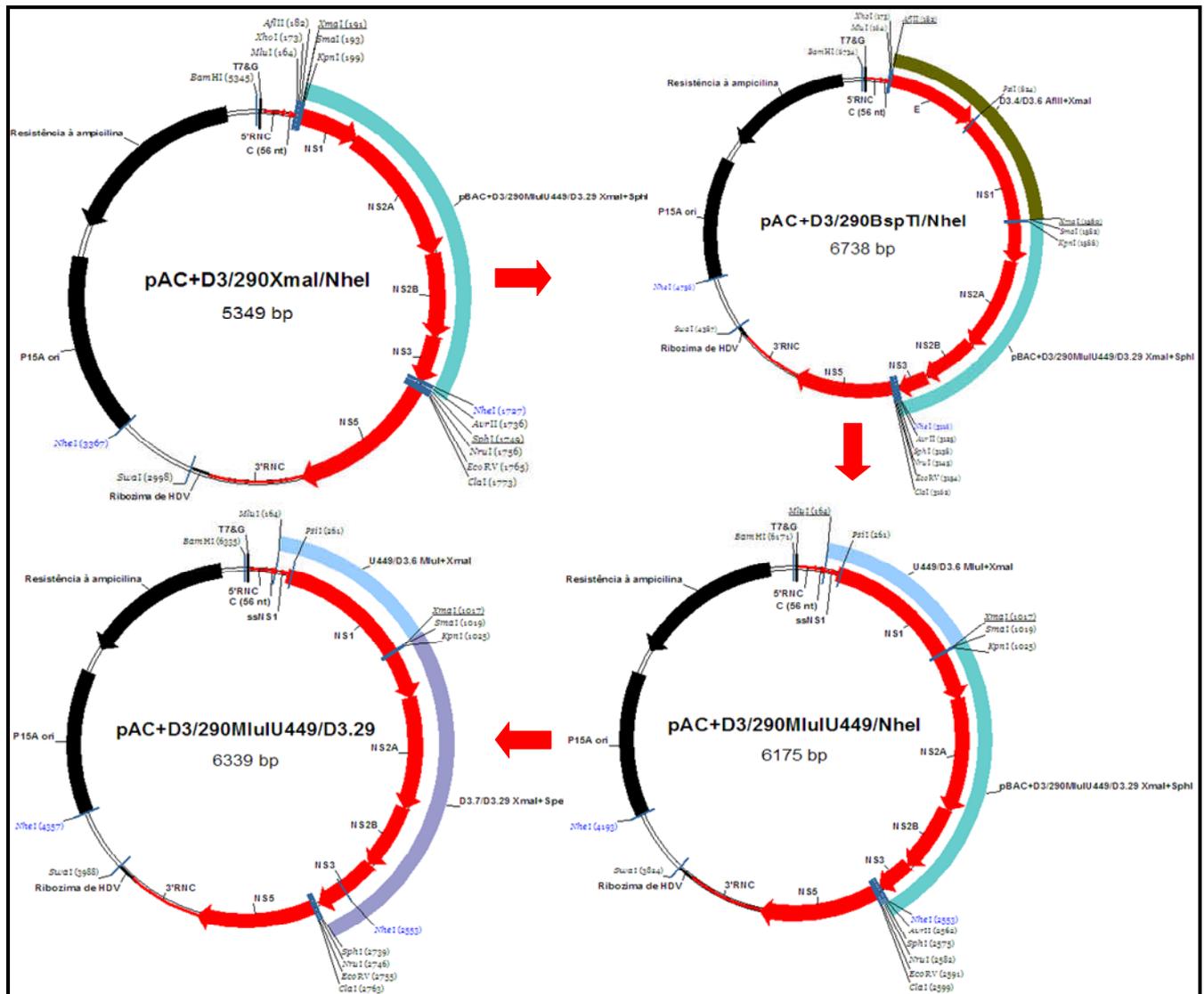


FIGURA 17 - Representação esquemática dos clones intermediários no processo de obtenção do clone pAC+D3/290MluU449/D3.29. Em preto estão representados componentes do vetor e em vermelho os segmentos do genoma da cepa BR DEN3 290-02. Os diferentes tons de azul e verde representam os fragmentos do genoma da cepa BR DEN3 290-02 inseridos nos vetores de baixa cópia. Para facilitar a compreensão foram utilizadas as mesmas cores das FIGURAS 6 e 7. Estão representados apenas os sítios de restrição que foram utilizados nos procedimentos de clonagem para montagem do replicon e do clone infeccioso. O número entre parênteses indica sua posição no clone e a cor indica se a enzima corta o mesmo uma (preto) ou mais vezes (azul). As enzimas utilizadas em cada etapa para obtenção dos clones ilustrados estão sublinhadas (desenhado com o software Vector NTI do pacote Vector NTI Advance 10.3.1, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

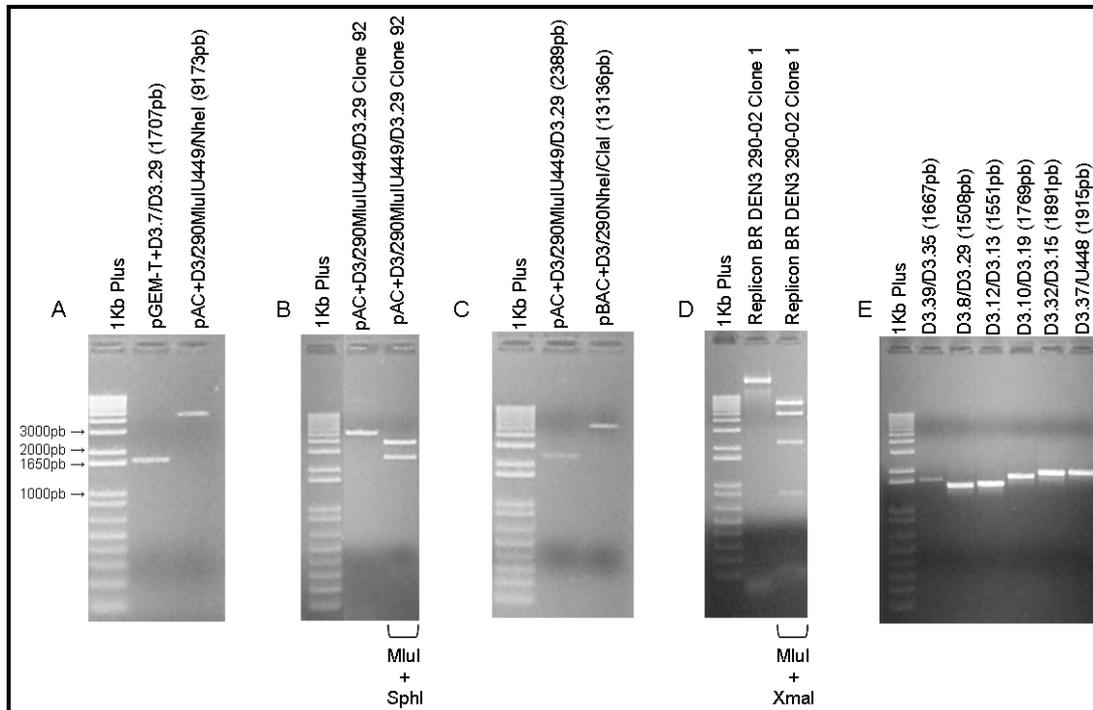


FIGURA 18 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose das etapas para a obtenção dos clones pAC+D3/290MluI/U449/D3.29 e replicon BR DEN3 290-02. (A) Perfil eletroforético das reações de digestão purificadas do clone pAC+D3/290MluI/U449/NheI com as enzimas XmaI e AvrII e do clone pGEM-T-easy+D3.7/D3.29 com as enzimas XmaI e SpeI. Entre parênteses encontra-se o tamanho esperado do fragmento liberado pela digestão. Foram aplicados 10% do volume das reações de digestão purificadas. (B) Confirmação da identidade de um dos clones positivo na PCR de colônia por digestão do plasmídeo minipreparado com as enzimas MluI e SphI. Os tamanhos esperados dos fragmentos liberados são 3764pb e 2575pb. Foram aplicados 4% do volume do plasmídeo minipreparado e todo volume da digestão da mesma quantidade de plasmídeo. (C) Perfil eletroforético das reações de digestão purificadas dos clones pAC+D3/290MluI/U449/D3.29 e pBAC+D3/290NheI/ClaI com as enzimas MluI e NheI. Entre parênteses encontra-se o tamanho esperado do fragmento liberado pela digestão. Foram aplicados 6,6% e 10% do volume das reações de digestão purificadas dos clones pBAC+D3/290NheI/ClaI e pAC+D3/290MluI/U449/NheI, respectivamente. (D) Confirmação da identidade de um dos clones positivos na PCR de colônia por digestão do plasmídeo minipreparado com as enzimas MluI e XmaI. Os tamanhos esperados dos fragmentos liberados são 7623pb, 4828pb, 2221pb e 853pb. Foram aplicados 3,3% do volume do plasmídeo minipreparado e todo volume da digestão da mesma quantidade de plasmídeo. (E) PCRs purificados utilizados no sequenciamento. As PCRs foram feitas a partir do plasmídeo minipreparado do replicon BR DEN3 290-02 Clone 1 utilizando os oligonucleotídeos iniciadores indicados (oligonucleotídeo iniciador de polaridade positiva/oligonucleotídeo iniciador de polaridade negativa). Entre parênteses se encontra o tamanho esperado de cada segmento em pares de base (pb). Foram aplicados 4% do volume das PCRs purificadas. Em todos os géis foram aplicados 250ng do marcador de massa molecular 1Kb Plus DNA Ladder.

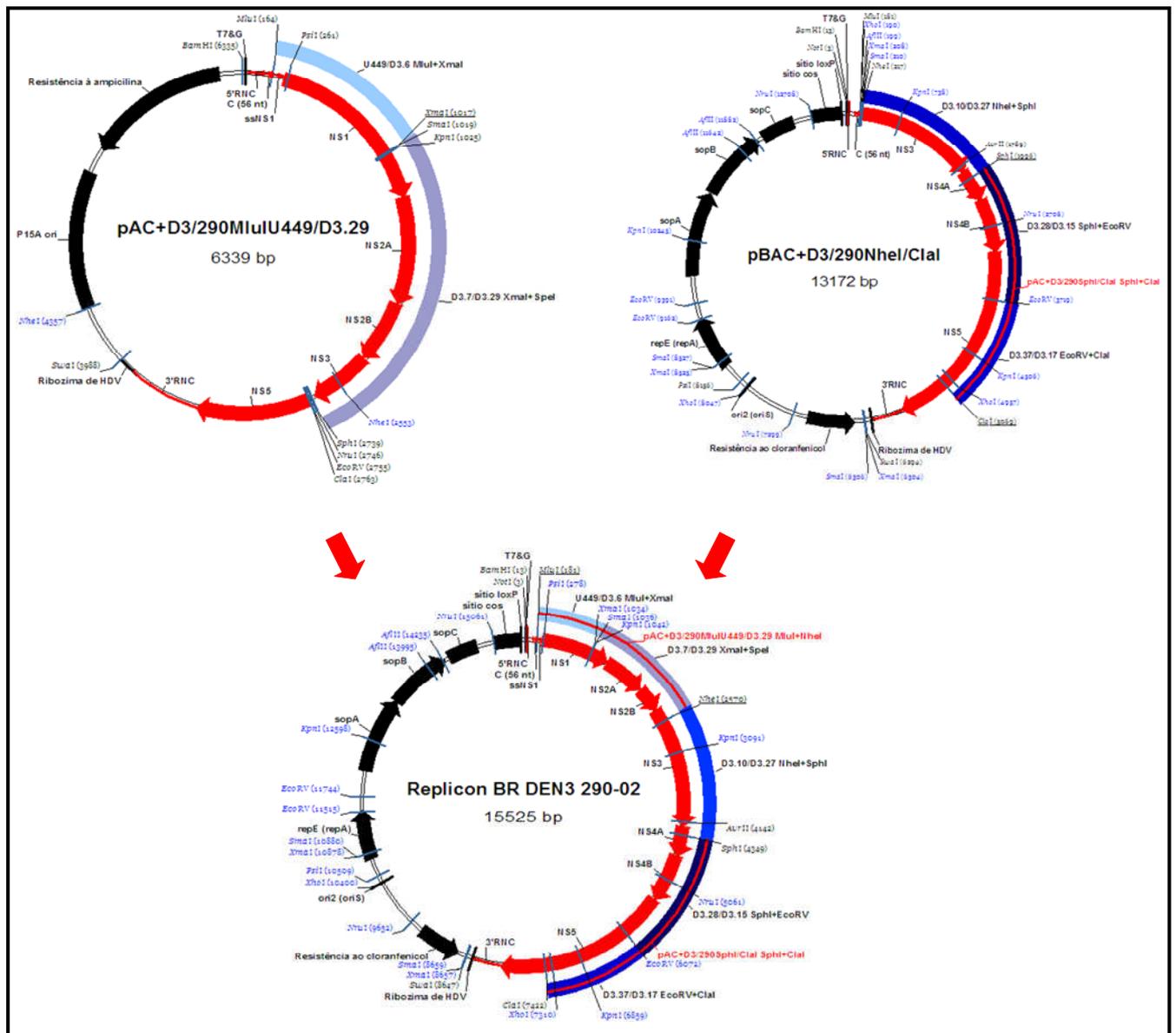


FIGURA 19 - Representação esquemática dos clones intermediários no processo de obtenção do clone do replicon BR DEN3 290-02. Em preto estão representados componentes do vetor e em vermelho os segmentos do genoma da cepa BR DEN3 290-02. Os diferentes tons de azul representam os fragmentos do genoma da cepa BR DEN3 290-02 inseridos nos vetores de baixa cópia. Para facilitar a compreensão foram utilizadas as mesmas cores das FIGURAS 6 e 7. Estão representados apenas os sítios de restrição que foram utilizados nos procedimentos de clonagem para montagem do replicon e do clone infeccioso. O número entre parênteses indica sua posição no clone e a cor indica se a enzima corta o mesmo uma (preto) ou mais vezes (azul). As enzimas utilizadas em cada etapa para obtenção dos clones ilustrados estão sublinhadas (desenhado com o software Vector NTI do pacote Vector NTI Advance 10.3.1, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

5.3 REAÇÕES DE IMUNOFLORESCÊNCIA DAS CÉLULAS E TITULAÇÃO DO SOBRENADANTE DAS CULTURAS TRANSFECTADAS COM O REPLICON BR DEN3 290-02

Com a obtenção do clone completo (contendo os genes virais correspondentes às proteínas NS1 a NS5), iniciamos os experimentos de transfecção em cultura de células para avaliar a atividade do replicon. O clone do replicon BR DEN290-02 foi linearizado através da digestão com a enzima Swal (FIGURA 20A), o material foi purificado e o ADN foi transcrito *in vitro* (FIGURA 20B) para obtenção do ARN a ser transfectado.

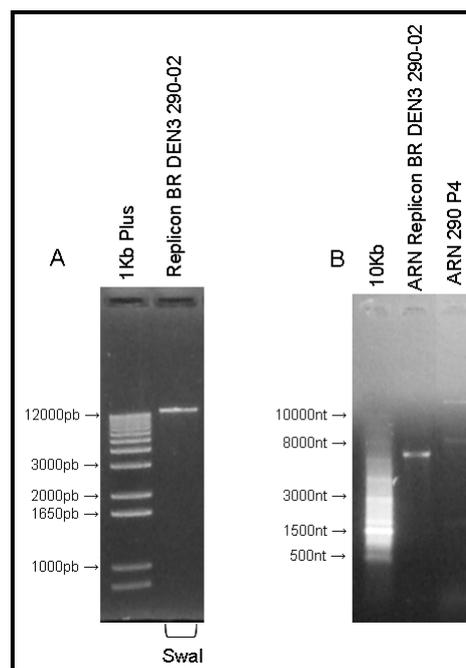


FIGURA 20 - Preparação do clone do replicon para transfecção. (A) Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose do clone do replicon linearizado com a enzima Swal. O tamanho esperado do clone linearizado é de 15525pb. Foram aplicados 10% do volume da digestão purificada e 250ng do marcador de massa molecular *1Kb Plus DNA Ladder*. (B) Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose sob condições livres de RNase do ARN do replicon transcrito *in vitro* e do ARN controle (ARN 290 P4). Foram aplicados 0,5% do volume da transcrição *in vitro* e 1,5 μ g do marcador de massa molecular *0,5-10Kb RNA Ladder* (Cat. No. 15623-200, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

O ARN proveniente da reação de transcrição *in vitro*, juntamente com um ARN extraído do sobrenadante de uma cultura infectada com a cepa BR DEN3 290-02 (ARN 290 P4, controle positivo) foram transfectados em uma monocamada de células C6/36 e nos tempos de 48h, 72h, 96h e 120h pós-transfecção, os sobrenadantes das culturas foram recolhidos e as células fixadas para serem processadas para reações de imunofluorescência. Células não transfectadas foram utilizadas como controle negativo.

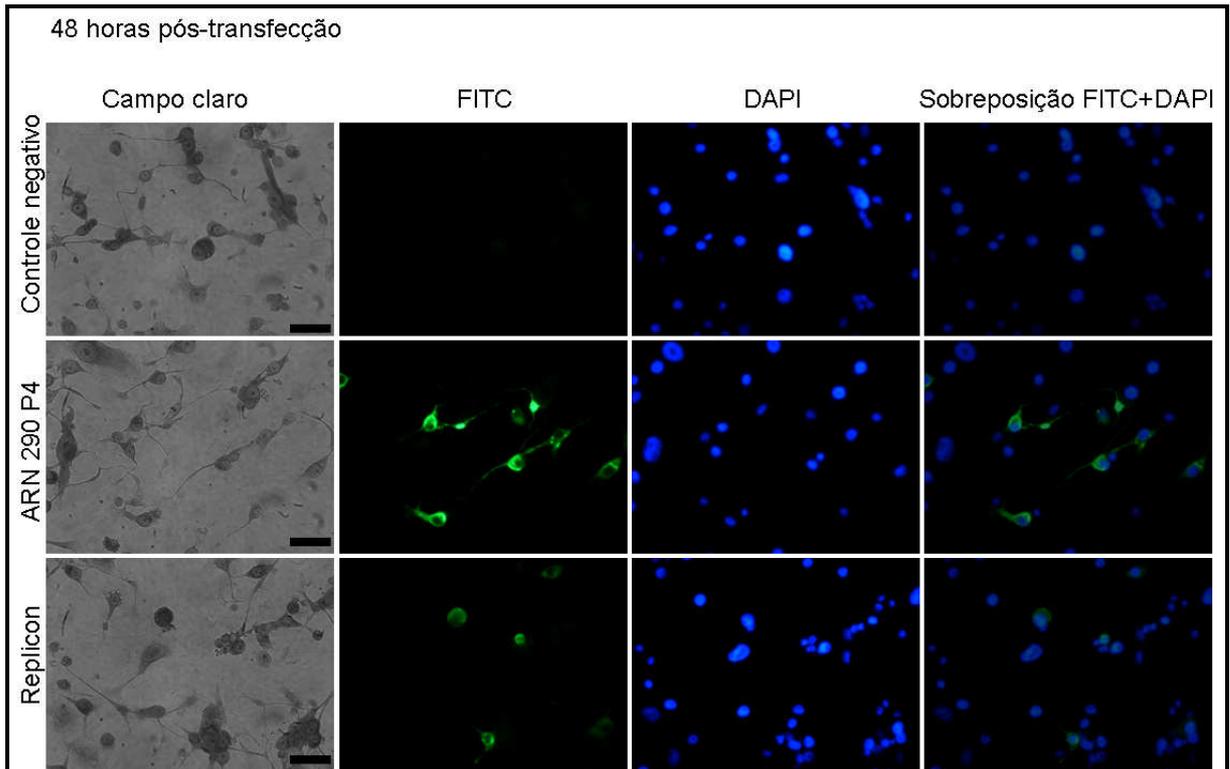


FIGURA 21 - Imunofluorescência 48h pós-transfecção. O tapete celular fixado foi reagido com α -D3 seguido de α -mouse FITC e os núcleos foram corados com DAPI. As fotos foram feitas com um aumento de 400x e a barra ilustrada nas fotos de campo claro corresponde a 50 μ m.

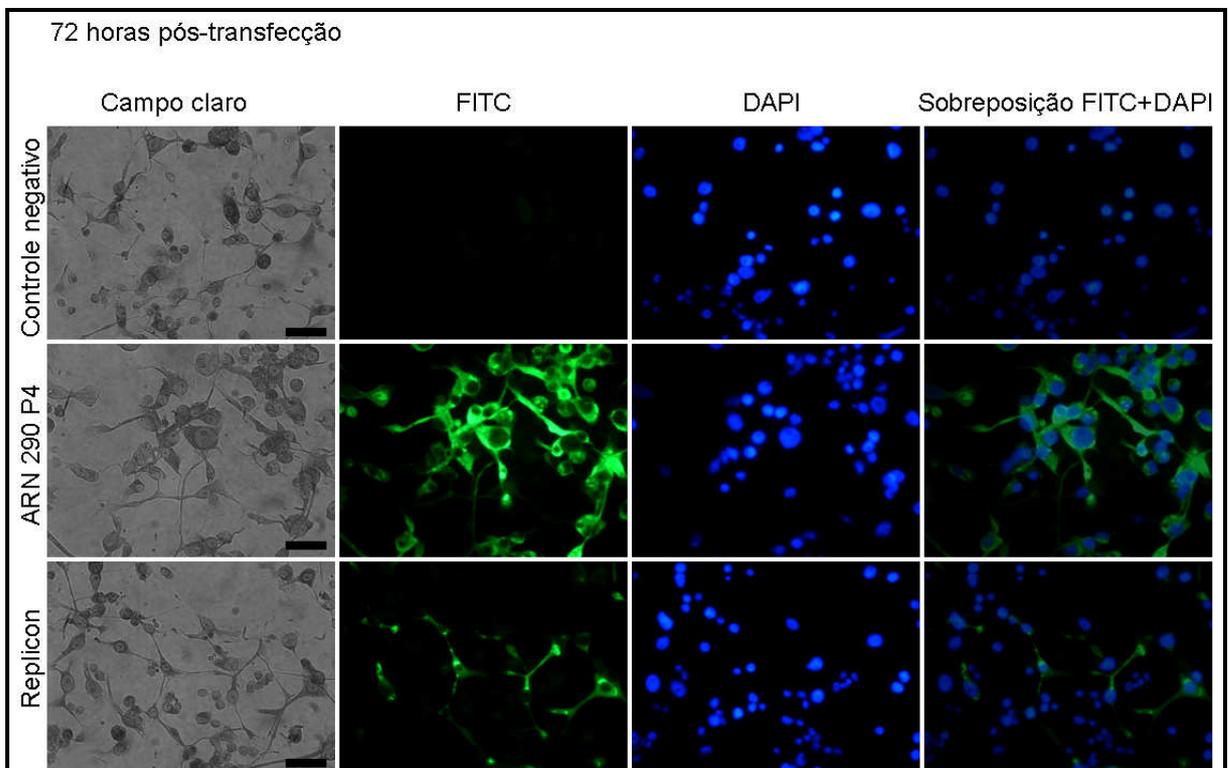


FIGURA 22 - Imunofluorescência 72h pós-transfecção. O tapete celular fixado foi reagido com α -D3 seguido de α -mouse FITC e os núcleos foram corados com DAPI. As fotos foram feitas com um aumento de 400x e a barra ilustrada nas fotos de campo claro corresponde a 50 μ m.

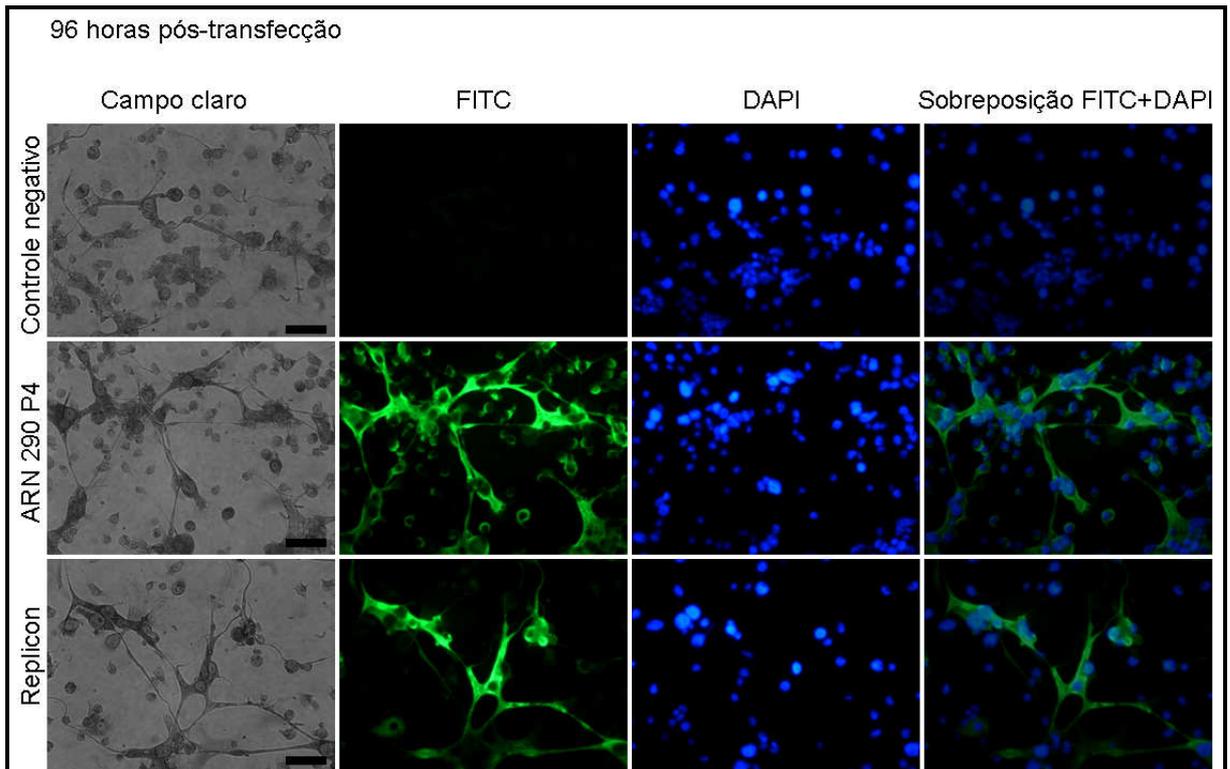


FIGURA 23 - Imunofluorescência 96h pós-transfecção. O tapete celular fixado foi reagido com α -D3 seguido de α -mouse FITC e os núcleos foram corados com DAPI. As fotos foram feitas com um aumento de 400x e a barra ilustrada nas fotos de campo claro corresponde a 50 μ m.

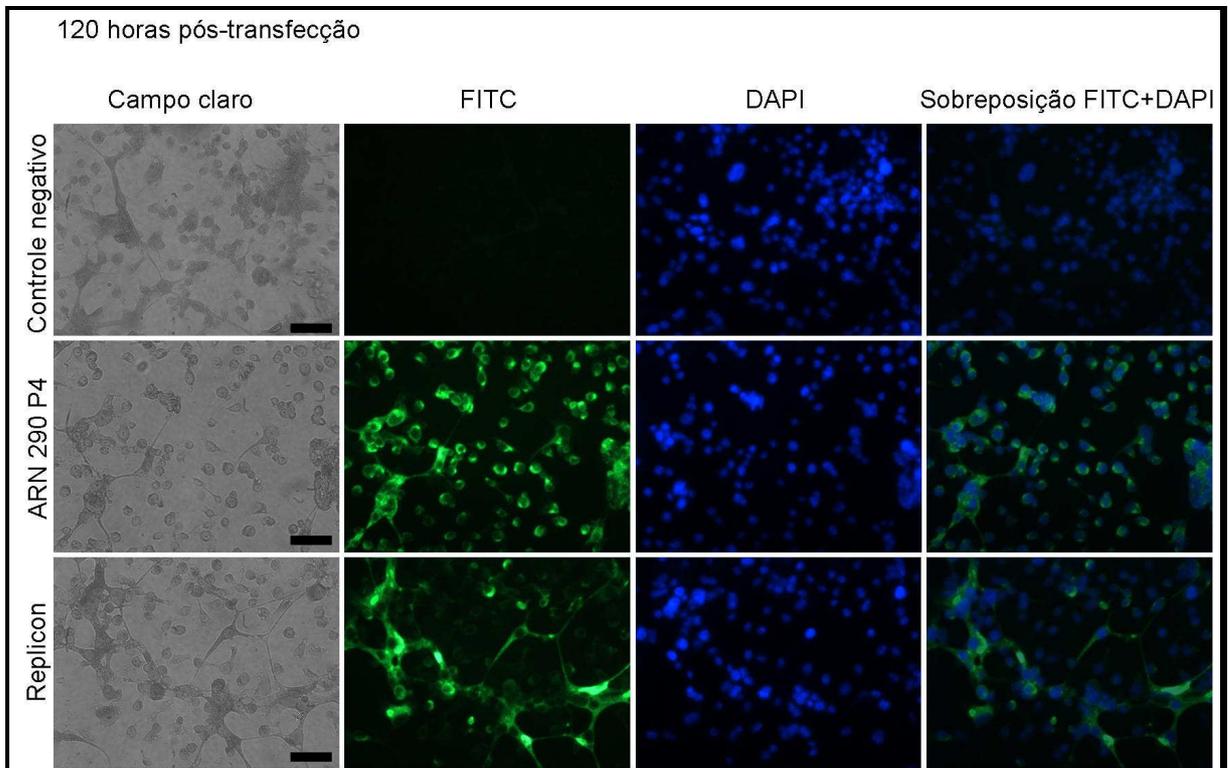


FIGURA 24 - Imunofluorescência 120h pós-transfecção. O tapete celular fixado foi reagido com α -D3 seguido de α -mouse FITC e os núcleos foram corados com DAPI. As fotos foram feitas com um aumento de 400x e a barra ilustrada nas fotos de campo claro corresponde a 50 μ m.

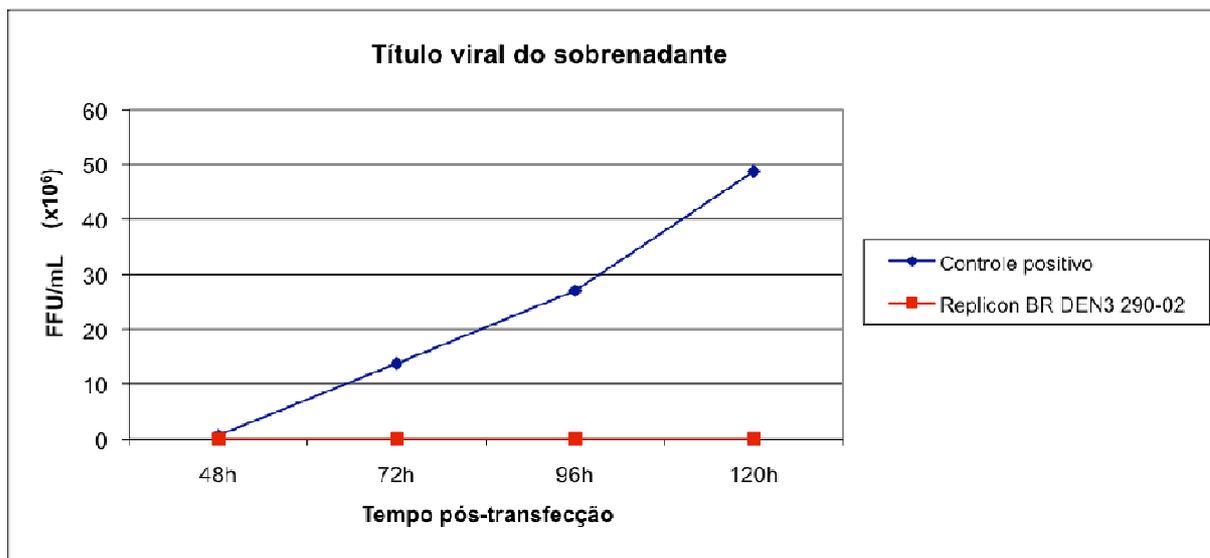


FIGURA 25 - Titulação pela técnica de formação de focos de infecção dos sobrenadantes das células transfectadas recolhidos 48h, 72h, 96h e 120h pós-transfecção. Cada diluição foi testada em duplicata e meio sem soro foi usado como controle negativo (Mock). A2-A6 e B2-B6: diferentes diluições do sobrenadante das células transfectadas com o ARN do replicon transcrito *in vitro*. C2-C6 e D2-D6: diferentes diluições do sobrenadante das células transfectadas com o ARN 290 P4.

Nas FIGURAS 21, 22, 23 e 24 é possível observar a reação das células transfectadas com as duas amostras de ARN com o anticorpo específico α -D3. A partir desse resultado é possível concluir que os ARNs foram eficientemente transfectados e traduzidos em proteínas que foram reconhecidas pelo α -D3. Também é possível observar que com o passar do tempo o número de células que reagem com o anticorpo e a intensidade da reação aumentam. Isso é uma boa indicação de que o ARN do replicon está sendo efetivamente replicado.

Posteriormente os sobrenadantes das culturas transfectadas que foram recolhidos 48h, 72h, 96h e 120h pós-transfecção foram titulados através da técnica de formação de focos de infecção. Como pode ser constatado na FIGURA 25, como esperado, não foi possível detectar a formação de partículas virais no sobrenadante das células transfectadas com o replicon.

A fim de confirmar que nossas observações não haviam sido o resultado de contaminação ou em virtude de erros técnicos foram realizadas IFIs das culturas transfectadas, 120h pós-transfecção, utilizando anticorpos monoclonais α -E e α -NS1. Como esperado, o controle negativo não mostrou reação positiva com nenhum dos anticorpos, o controle positivo reagiu com ambos e as culturas transfectadas com o replicon reagiram apenas com α -NS1 (FIGURA 26).

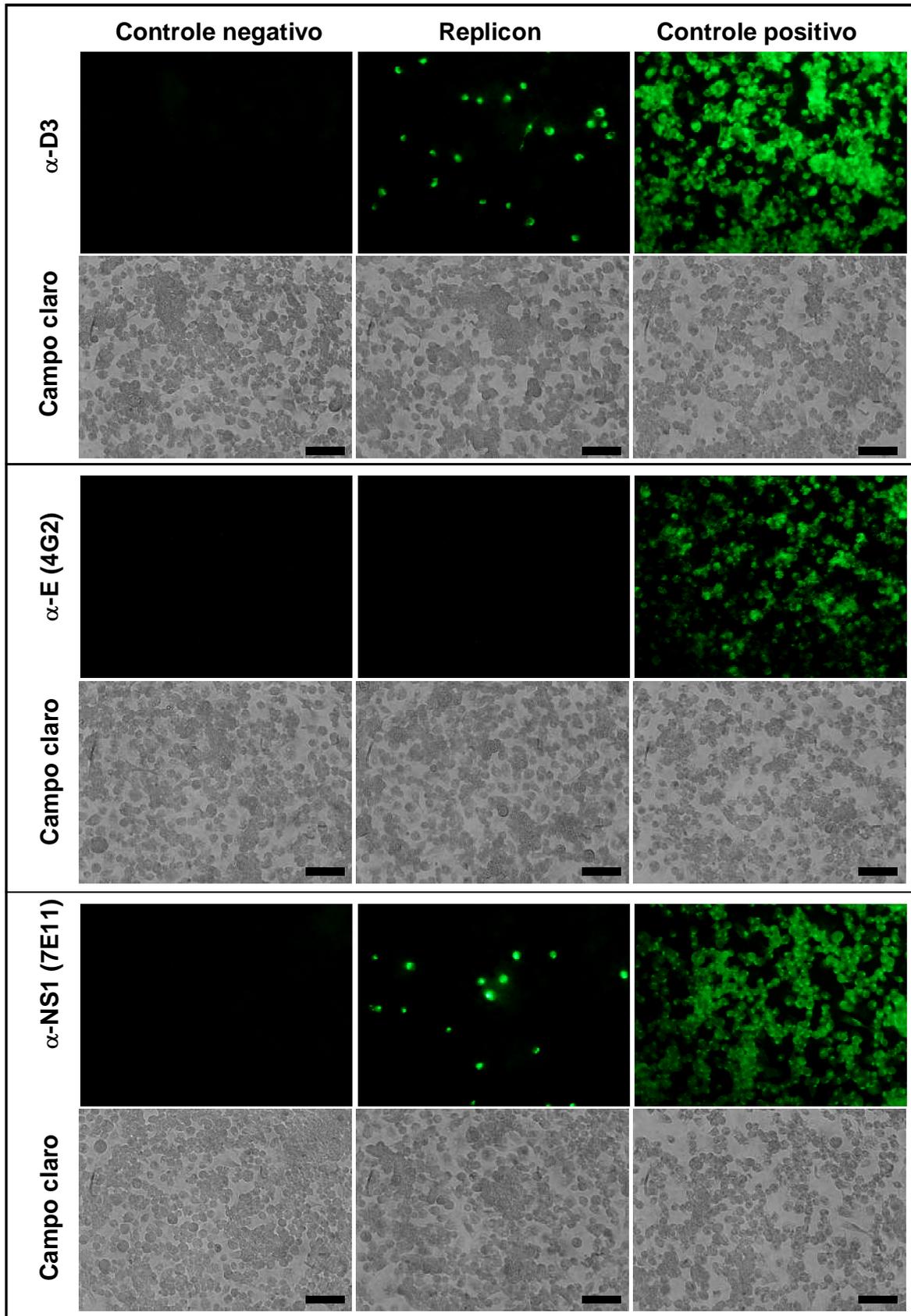


FIGURA 26 - Imunofluorescência 120h pós-transfecção. O tapete celular fixado foi reagido com α -D3, α -E ou α -NS1 seguido de α -mouse FITC. As fotos foram feitas com um aumento de 400x e a barra ilustrada nas fotos de campo claro corresponde a 50 μ m.

5.4 Construção do clone infeccioso da cepa BR DEN3 290-02

Várias estratégias foram utilizadas para a construção do clone infeccioso de DENV3. Uma dessas consistiu na inserção direta da porção situada entre os sítios de clivagem Mlul e NheI do genoma da cepa BR DEN3 290-02 no clone pBAC+D3/290NheI/ClaI pela digestão do mesmo e da PCR D3.39/D3.29 com essas enzimas. Para transformação dessa ligação foram utilizadas bactérias Top10 e DH5 α eletrocompetentes, assim como Top10 cálcio competente. Na estratégia utilizando as bactérias eletrocompetentes cresceram poucas colônias e nenhuma foi positiva na triagem por PCR de colônia. Na estratégia utilizando a bactéria quimiocompetente não foi observado nenhum crescimento.

Alternativamente, tentamos inserir a porção situada entre os sítios Mlul e NheI presentes no genoma da cepa BR DEN3 290-02 no vetor #50pBAC antes de inseri-la no clone pBAC+D3/290NheI/ClaI, porém igualmente sem sucesso.

Outra estratégia envolvia a ligação dos clones pAC+D3/290Mlul/BspTI e pAC+D3/290BspTI/D3.29 para obtenção do clone pAC+D3/290Mlul/D3.29 cujo fragmento situado entre os sítios Mlul e NheI seria inserido no clone pBAC+D3/290NheI/ClaI (FIGURA 19) pela digestão com essas enzimas. No entanto, em nenhuma das tentativas obtivemos um clone pAC+D3/290Mlul/D3.29. A seguir estão descritas as etapas utilizadas para obtenção dos clones pAC+D3/290Mlul/BspTI e pAC+D3/290BspTI/D3.29.

O primeiro passo para construção do clone pAC+D3/290Mlul/BspTI foi a digestão do vetor #49pAC e do clone pGEM-T-easy+D3.39/D3.3 (FIGURA 9) com as enzimas Mlul e XhoI para inserção do fragmento da cepa BR DEN3 290-02 situado entre esses sítios no vetor #49pAC. O clone assim obtido (pAC+D3/290Mlul/XhoI) foi digerido com as enzimas BspTI e XhoI em paralelo ao clone pGEM-T+D3.E5'/D3.DomB- (FIGURA 9) para inserção desse fragmento no clone pAC+D3/290Mlul/XhoI, originando o clone pAC+D3/290Mlul/BspTI (FIGURAS 27 e 29).

Já para a construção do clone pAC+D3/290BspTI/D3.29, o primeiro passo foi a digestão do vetor #49pAC com as enzimas XmaI e AvrII e do clone pGEM-T-easy+D3.7/D3.29 (FIGURA 9) com as enzimas XmaI e SpeI. Da mesma forma que

na construção do clone pAC+D3/290MlulU449/D3.29 foi evitado o uso da enzima NheI. Esse procedimento permitiu a inserção do fragmento situado entre o sítio XmaI e o nucleotídeo 4893 da cepa BR DEN3 290-02 no vetor #49pAC. O clone assim obtido (pAC+D3/290XmaI/D3.29) foi digerido com as enzimas BspTI e XmaI em paralelo ao clone pGEM-T-easy+D3.4/D3.6 (FIGURA 9), resultando na obtenção do clone pAC+D3/290BspTI/D3.29 (FIGURAS 28 e 29).

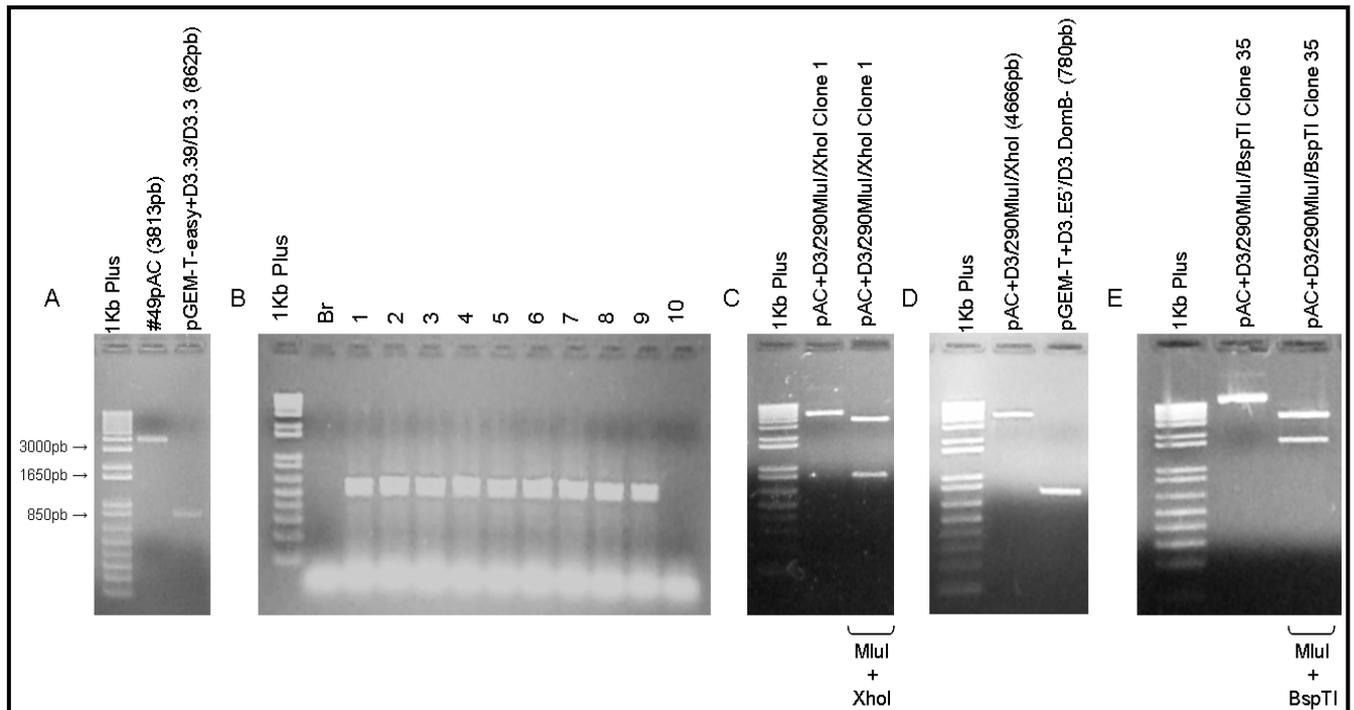


FIGURA 27 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose das etapas para a obtenção do clone pAC+D3/290Mlul/BspTI. (A) Perfil eletroforético das reações de digestão purificadas do vetor #49pAC e do clone pGEM-T-easy+D3.39/D3.3 com as enzimas Mlul e Xhol. Entre parênteses encontra-se o tamanho esperado do fragmento liberado pela digestão. Foram aplicados 10% do volume das reações de digestão purificadas. (B) Triagem dos clones candidatos através de PCR de colônia com os oligonucleotídeos iniciadores D3.39 e D2 Lanciotti cujo produto possui um tamanho esperado de 644pb. Foram aplicados 67% do volume da PCR de colônia. (C) Confirmação da identidade de um dos clones positivo na PCR de colônia por digestão do plasmídeo minipreparado com as enzimas Mlul e Xhol. Os tamanhos esperados dos fragmentos liberados são 3813pb e 862pb. Foram aplicados 3,3% do volume do plasmídeo minipreparado e todo volume da digestão da mesma quantidade de plasmídeo. (D) Perfil eletroforético das reações de digestão purificadas dos clones pAC+D3/290Mlul/Xhol e pGEM-T+D3.E5'/D3.DomB- com as enzimas Xhol e BspTI. Entre parênteses encontra-se o tamanho esperado do fragmento liberado pela digestão. Foram aplicados 8% do volume das reações de digestão purificadas. (E) Confirmação da identidade de um dos clones positivos pela técnica de palitagem (foto não mostrada) através da digestão do plasmídeo minipreparado com as enzimas Mlul e BspTI. Os tamanhos esperados dos fragmentos liberados são 3804pb e 1642pb. Foram aplicados 4% do volume do plasmídeo minipreparado e todo volume da digestão da mesma quantidade de plasmídeo. Em todos os géis foram aplicados 250ng do marcador de massa molecular 1Kb Plus DNA Ladder.

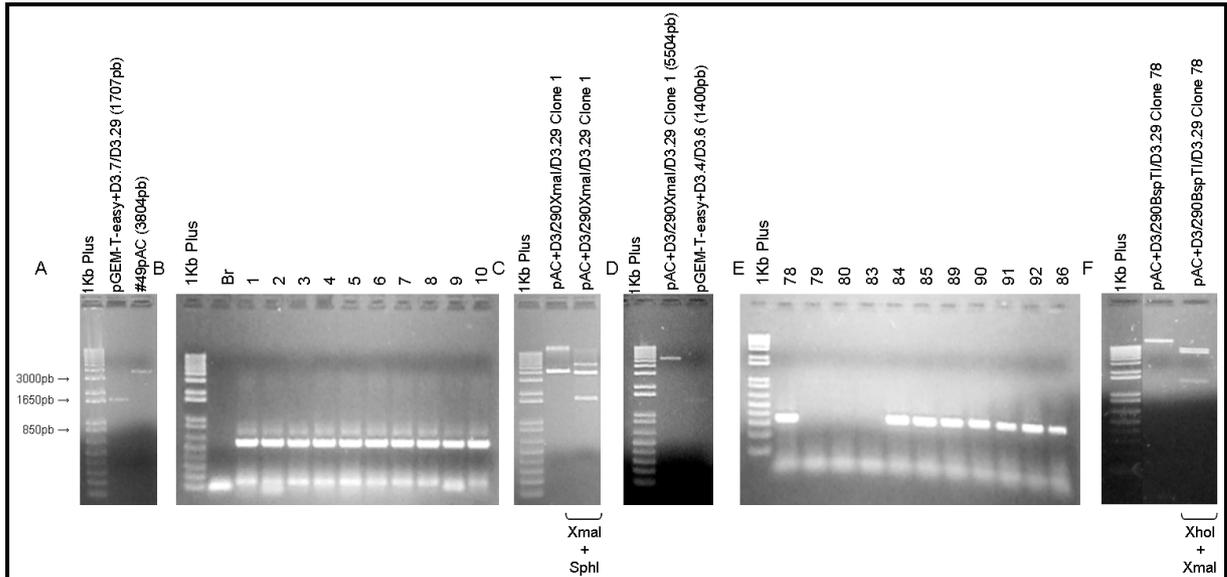


FIGURA 28 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose das etapas para a obtenção do clone pAC+D3/290BspTI/D3.29. (A) Perfil eletroforético das reações de digestão purificadas do vetor #49pAC com as enzimas Xmal e AvrII e do clone pGEM-T-easy+D3.7/D3.29 com as enzimas Xmal e SpeI. Entre parênteses encontra-se o tamanho esperado do fragmento liberado pela digestão. Foram aplicados 6% e 10% do volume das reações de digestão purificadas do vetor #49pAC e do clone pGEM-T-easy+D3.7/D3.29, respectivamente. (B) Triagem dos clones candidatos através de PCR de colônia com os oligonucleotídeos iniciadores D3.10 e D3.29 cujo produto possui um tamanho esperado de 592pb. Foram aplicados 67% do volume da PCR de colônia. (C) Confirmação da identidade de um dos clones positivo na PCR de colônia por digestão do plasmídeo minipreparado com as enzimas Xmal e SphI. Os tamanhos esperados dos fragmentos liberados são 3791pb e 1722pb. Foi aplicado 4% do volume do plasmídeo minipreparado e todo volume da digestão da mesma quantidade de plasmídeo. (D) Perfil eletroforético das reações de digestão purificadas dos clones pAC+D3/290Xmal/D3.29 e pGEM-T-easy+D3.4/D3.6 com as enzimas Xmal e BspTI. Entre parênteses encontra-se o tamanho esperado do fragmento liberado pela digestão. Foram aplicados 5% do volume das reações de digestão purificadas. (E) Triagem dos clones candidatos através de PCR de colônia com os oligonucleotídeos iniciadores D3.39 e D3.43 cujo produto possui um tamanho esperado de 357pb. Foram aplicados 67% do volume da PCR de colônia. (F) Confirmação da identidade de um dos clones positivos na PCR de colônia por digestão do plasmídeo minipreparado com as enzimas Xmal e XhoI. Os tamanhos esperados dos fragmentos liberados são 5495pb e 1407pb. Foram aplicados 3,3% do volume do plasmídeo minipreparado e todo volume da digestão da mesma quantidade de plasmídeo. Em todos os géis foram aplicados 250ng do marcador de massa molecular *1Kb Plus DNA Ladder*.

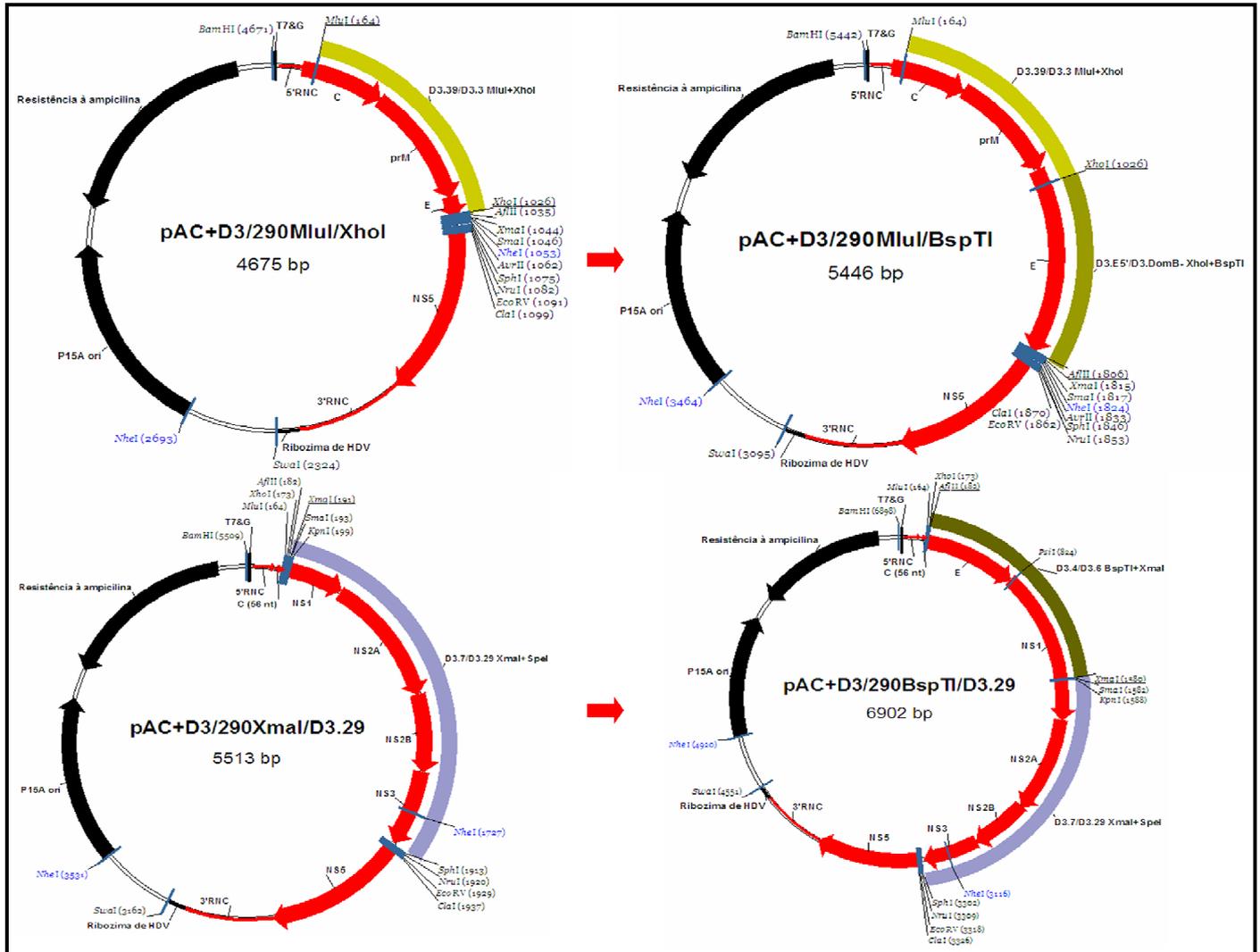


FIGURA 29 - Representação esquemática da construção dos clones pAC+D3/290MluI/BspTI e pAC+D3/290BspTI/D3.29. Em preto estão representados componentes do vetor e em vermelho os segmentos do genoma da cepa BR DEN3 290-02. Os diferentes tons de azul e verde representam os fragmentos do genoma da cepa BR DEN3 290-02 inseridos nos vetores de baixa cópia. Para facilitar a compreensão foram utilizadas as mesmas cores das FIGURAS 6 e 7. Estão representados apenas os sítios de restrição que foram utilizados nos procedimentos de clonagem para montagem do replicon e do clone infeccioso. O número entre parênteses indica sua posição no clone e a cor indica se a enzima corta o mesmo uma (preto) ou mais vezes (azul). As enzimas utilizadas em cada etapa para obtenção dos clones ilustrados estão sublinhadas (desenhado com o software Vector NTI do pacote Vector NTI Advance 10.3.1, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Além de tentar construir o clone infeccioso conforme descrito nos parágrafos anteriores utilizamos também uma abordagem alternativa com esses mesmos clones (pAC+D3/290MluI/BspTI, pAC+D3/290BspTI/D3.29, pBAC+D3/290NheI/ClaI). O clone pAC+D3/290MluI/BspTI (FIGURA 29) foi digerido com as enzimas MluI e BspTI, o clone pAC+D3/290BspTI/D3.29 (FIGURA 29) com as enzimas NheI e AflIII e o clone pBAC+D3/290NheI/ClaI (FIGURA 19) com as enzimas MluI e NheI. Tentamos uma ligação de três partes onde a porção da cepa BR DEN3 290-02 entre os sítios MluI e NheI seria inserida no clone pBAC+D3/290NheI/ClaI a fim de montar

o clone infeccioso. No entanto, essa estratégia também não apresentou o resultado esperado.

Com a finalidade de se construir o clone infeccioso foram realizadas mais três estratégias. A primeira envolvia a digestão do produto de PCR D3.39/D3.6 e do clone pAC+D3/290MlulU449/D3.29 (FIGURA 19) com as enzimas Mlul e KpnI cuja ligação resultaria no clone pAC+D3/290Mlul/D3.29. Esse por sua vez seria digerido em paralelo ao clone pBAC+D3/290NheI/ClaI com as enzimas Mlul e NheI, resultando assim no clone infeccioso da cepa BR DEN3 290-02. No entanto, não conseguimos recuperar nenhum clone pAC+D3/290Mlul/D3.29. A segunda estratégia tinha os mesmos objetivos da anterior, porém envolvia a digestão dos clones pGEM-T-easy+D3.39/D3.48 e pAC+D3/290MlulU449/D3.29 (FIGURA 19) com as enzimas AatI (isoesquizômero de PstI) e Mlul. O resultado seria a construção do clone pAC+D3/290Mlul/D3.29, porém após algumas tentativas não obtivemos nenhum resultado positivo. A terceira estratégia envolvia a subclonagem do fragmento D3.39/D3.48, que havia sido clonado no pGEM-T-easy, no vetor #49pAC através da digestão do clone pGEM-T-easy+D3.39/D3.48 com as enzimas Mlul e SpeI e do vetor #49pAC com Mlul e AvrII. Esse procedimento de subclonagem deu origem ao clone pAC+D3/290Mlul/D3.48 (FIGURAS 30 e 31).

Com a obtenção do clone pAC+D3/290Mlul/D3.48 já era possível tentar recuperar um clone contendo a sequência do genoma viral completa através de reação de ligação *in vitro* deste clone com o clone do replicon, seguido de transcrição *in vitro* e transfecção. Para realizar a ligação *in vitro* o clone pAC+D3/290Mlul/D3.48 foi previamente digerido com as endonucleases AatI e Sall e o clone do replicon com as endonucleases AatI e SmaI. As digestões foram purificadas (FIGURA 32A), ligadas e após purificação do produto ligado, submetidas ao procedimento de transcrição *in vitro*. Como podemos constatar pela FIGURA 32B o ARN transcrito não possui o tamanho esperado e provavelmente foi o resultado da transcrição apenas do fragmento digerido a partir do clone pAC+D3/290Mlul/D3.48, onde estava situado o promotor da T7 ARN polimerase. Resultado esse indicativo de que a ligação dos dois fragmentos não ocorreu como o esperado.

Uma vez que dispúnhamos do clone pAC+D3/290Mlul/D3.48, utilizamos esse clone em uma nova tentativa para a construção do clone pAC+D3/290Mlul/D3.29 (FIGURA 34). Assim, tanto o clone pAC+D3/290Mlul/D3.48, quanto o clone pAC+D3/290MlulU449/D3.29 (FIGURA 17) foram digeridos com as

enzimas AaI e SphI e os fragmentos liberados ligados (FIGURA 33). As bactérias, depois de transformadas, foram mantidas a temperatura ambiente. Dessa forma, foi possível a obtenção do clone pAC+D3/290MluI/D3.29 (FIGURA 34).

Atualmente, esse clone está sendo sequenciado e juntamente com o clone do replicon, digerido com os pares de endonucleases MluI e NheI ou ClaI e XmaI a fim de obtermos um clone contendo o genoma viral completo (*full-length*).

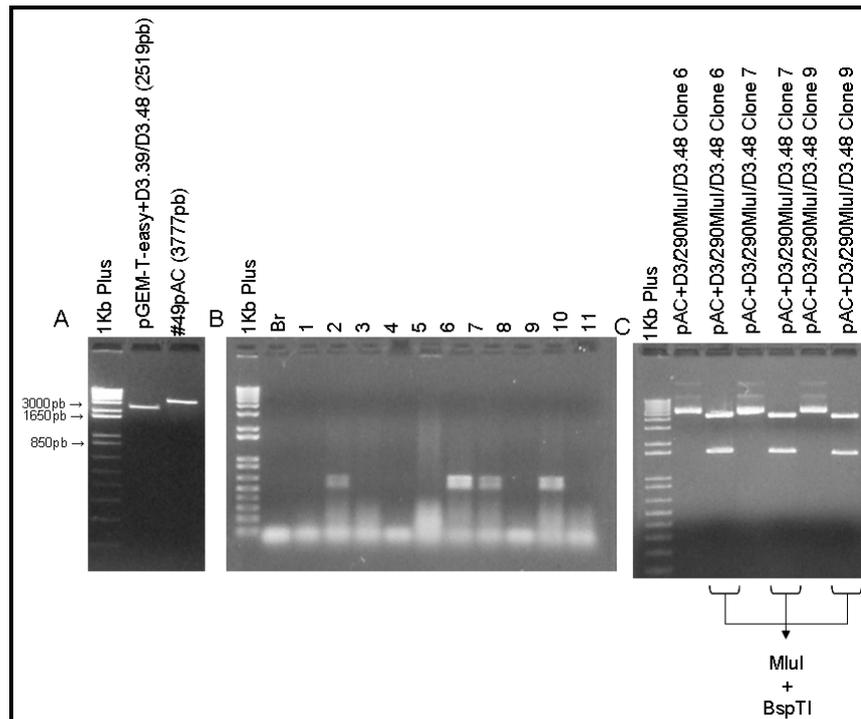


FIGURA 30 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose das etapas para a obtenção do clone pAC+D3/290MluI/D3.48. (A) Perfil eletroforético das reações de digestão purificadas do vetor #49pAC com as enzimas MluI e AvrII e do clone pGEM-T-easy+D3.39/D3.48 com as enzimas MluI e SpeI. Entre parênteses encontra-se o tamanho esperado do fragmento liberado pela digestão. Foram aplicados 10% do volume das reações de digestão purificadas. (B) Triagem dos clones candidatos através de PCR de colônia com os oligonucleotídeos iniciadores D3.4 e D3.43 cujo produto possui um tamanho esperado de 654pb. Foram aplicados 67% do volume da PCR de colônia. (C) Confirmação da identidade de três dos clones positivos na PCR de colônia por digestão do plasmídeo minipreparado com as enzimas MluI e BspTI. Os tamanhos esperados dos fragmentos liberados são 4491pb e 1642pb. Foram aplicados 4% do volume dos plasmídeos minipreparados e todo volume da digestão da mesma quantidade de plasmídeo. Em todos os géis foram aplicados 250ng do marcador de massa molecular *1Kb Plus DNA Ladder*.

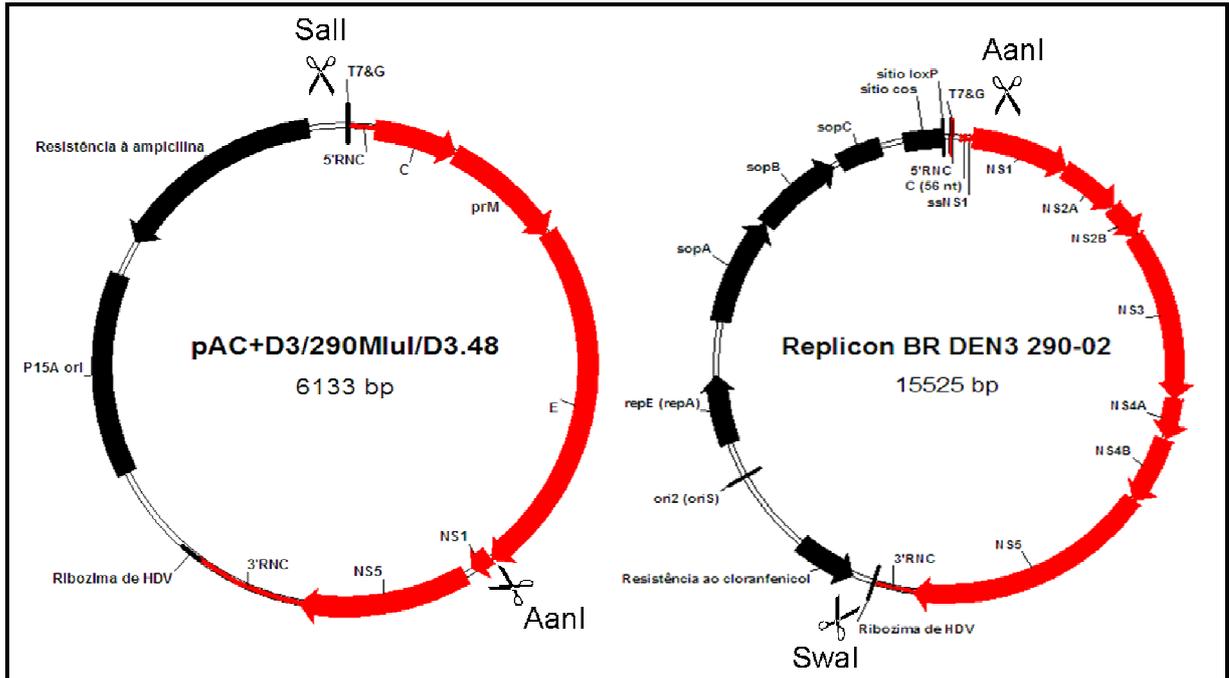


FIGURA 31 - Representação esquemática das digestões (✂) que precedem o passo de ligação *in vitro* para recuperação do clone infeccioso. Estão representados o clone pAC+D3/290MluI/D3.48 e o replicon BR DEN3 290-02. Em preto estão representados componentes do vetor e em vermelho os segmentos do genoma da cepa BR DEN3 290-02. Os pontos onde ocorrem as clivagens pelas endonucleases estão representados pela ✂ (desenhado com o software Vector NTI do pacote Vector NTI Advance 10.3.1, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

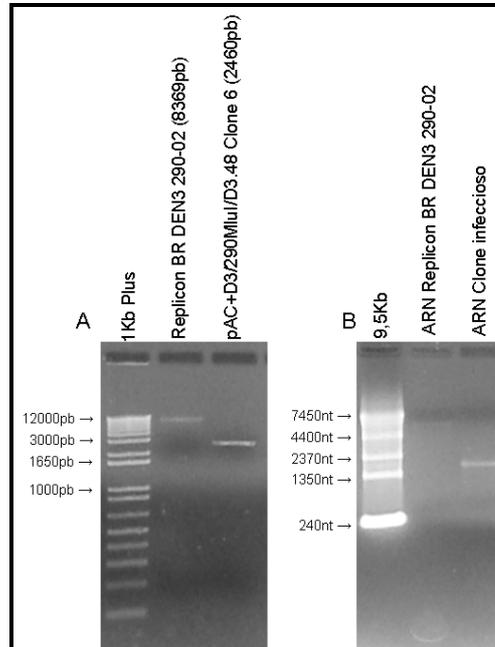


FIGURA 32 - Preparação do clone infeccioso para transfecção. (A) Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose da digestão purificada do replicon com AanI e SwaI e do clone pAC+D3/290MluI/D3.48 com Sall e AanI. Entre parênteses encontra-se o tamanho esperado dos fragmentos purificados. Foram aplicados 17% do volume das digestão purificadas e 250ng do marcador de massa molecular 1Kb Plus DNA Ladder. (B) Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose sob condições livres de RNase do ARN do replicon transcrito *in vitro* e do ARN transcrito a partir da ligação dos fragmentos em A (ARN Clone infeccioso). Foram aplicados 1% do volume da transcrição *in vitro* e 2,5µg do marcador de massa molecular 0,24-9,5Kb RNA Ladder (Cat. No. 15620-016, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

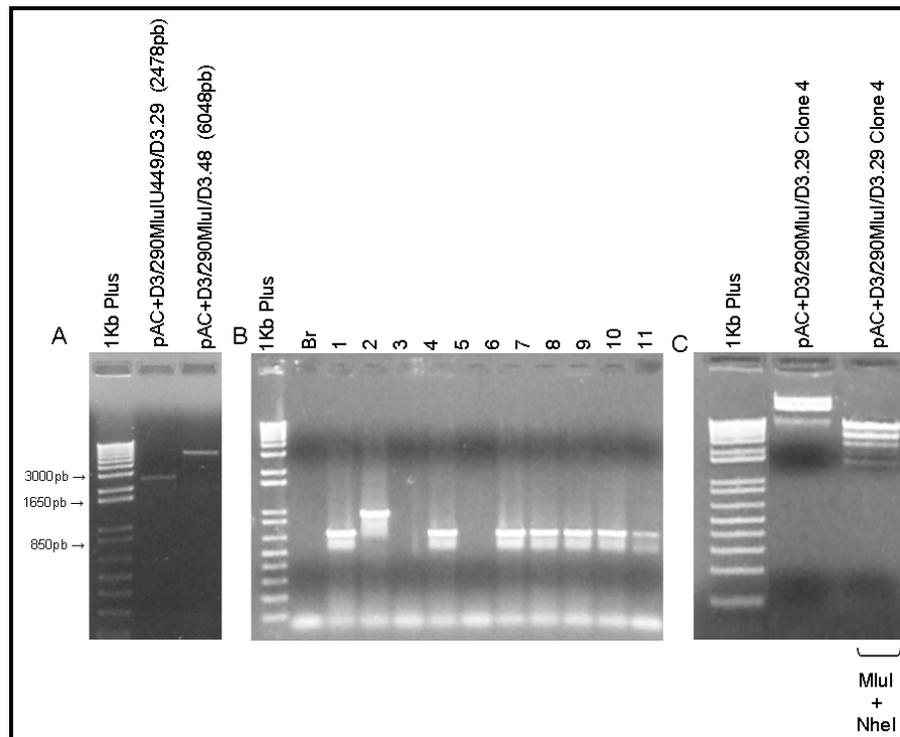


FIGURA 33 - Perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose das etapas para a obtenção do clone pAC+D3/290MluI/D3.29. (A) Perfil eletroforético das reações de digestão purificadas dos clones pAC+D3/290MluIU449/D3.29 e pAC+D3/290MluI/D3.48 com as enzimas AaI e SphI. Entre parênteses encontra-se o tamanho esperado do fragmento liberado pela digestão. Foram aplicados 10% do volume das reações de digestão purificadas. (B) Triagem dos clones candidatos através de PCR de colônia com os oligonucleotídeos iniciadores D3.7 e D3.31 cujo produto possui um tamanho esperado de 699pb. Foram aplicados 67% do volume da PCR de colônia. (C) Confirmação da identidade de um dos clones positivos na PCR de colônia por digestão do plasmídeo minipreparado com as enzimas MluI e NheI. Os tamanhos esperados dos fragmentos liberados são 4576pb, 2146pb e 1804pb. Foram aplicados 4% do volume dos plasmídeos minipreparados e todo volume da digestão da mesma quantidade de plasmídeo. Em todos os géis foram aplicados 250ng do marcador de massa molecular *1Kb Plus DNA Ladder*.

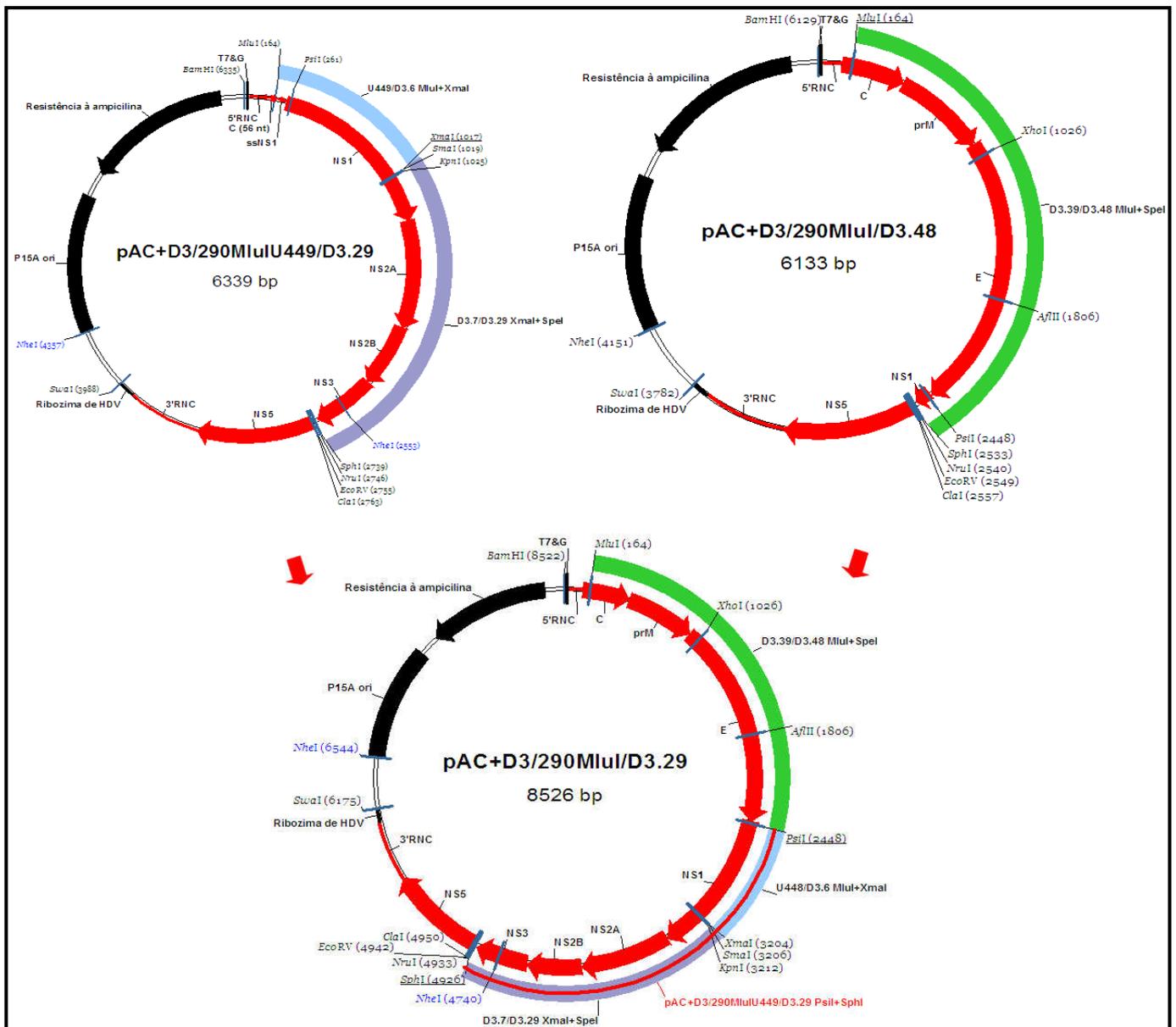


FIGURA 34 - Representação esquemática da construção do clone pAC+D3/290MluI/D3.29. Em preto estão representados componentes do vetor e em vermelho os segmentos do genoma da cepa BR DEN3 290-02. Os diferentes tons de azul e verde representam os fragmentos do genoma da cepa BR DEN3 290 -02 inseridos nos vetores de baixa cópia. Para facilitar a compreensão foram utilizadas as mesmas cores das FIGURAS 6 e 7. Estão representados apenas os sítios de restrição que foram utilizados nos procedimentos de clonagem para montagem do replicon e do clone infeccioso. O número entre parênteses indica sua posição no clone e a cor indica se a enzima corta o mesmo uma (preto) ou mais vezes (azul). As enzimas utilizadas em cada etapa para obtenção dos clones ilustrados estão sublinhadas (desenhado com o software Vector NTI do pacote Vector NTI Advance 10.3.1, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

6 DISCUSSÃO

Dados do Brasil, Ministério da Saúde, mostram que no ano de 2008 foram notificados mais de 700.000 casos de dengue, em 2007, 559.994 casos e em 2006, 345.922 casos (BRASIL. Ministério da Saúde, 2006, 2007, 2008b). Numa porcentagem muito pequena ($\leq 2\%$) desses casos o isolamento viral e a identificação do sorotipo infectante são realizados. A conclusão que pode ser obtida a partir dos dados disponíveis desses últimos três anos é de que o sorotipo prevalente têm sido o três, apesar de o número de casos pelo sorotipo dois no último ano ter sido praticamente equivalente ao número de casos causados pelo sorotipo três. Outro dado que chama a atenção é o aumento da notificação de formas graves da doença a partir do ano 2000 (BRASIL. Ministério da Saúde, 2008a) coincidindo com a introdução do sorotipo três no país (NOGUEIRA; ARAÚJO; SCHATZMAYR, 2007). O sequenciamento nucleotídico do genoma de vírus do sorotipo três circulantes no Brasil identificou que tanto vírus do genótipo III, quanto do genótipo V estão presentes (NOGUEIRA *et al.*, 2008), sendo que os vírus do genótipo III têm sido relacionados ao desenvolvimento de formas mais graves da doença (MESSER *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2008). Em nosso laboratório vem sendo realizado um trabalho de caracterização genética e biológica de algumas cepas de DENV3 isoladas no Brasil nos anos de 2002 e 2004 (NOGUEIRA *et al.*, 2008). Tendo em vista a importância desse sorotipo nas epidemias ocorridas desde sua introdução no Brasil, a grande lacuna existente de conhecimentos básicos a respeito dos vírus da dengue e a escassez de ferramentas que nos permitissem explorar essas lacunas além de aspectos relativos à virulência das cepas brasileiras, decidimos investir no desenvolvimento de um sistema subgenômico de replicon e de um clone infeccioso que nos permitissem estudar essas questões.

Com o intuito de facilitar o processo de clonagem, os vetores pACDV1poly e pBACDV1poly (SUZUKI *et al.*, 2007), que já haviam sido utilizados em um trabalho semelhante para construção do replicon e do clone infeccioso da cepa DEN-1 BR/90, foram modificados pela substituição das sequências nucleotídicas situadas entre os sítios BamHI/SwaI no pACDV1poly e NotI/SwaI no pBACDV1poly por um cassete sintético.

Como pode ser observado no QUADRO 1 apresentado no item 1.2 da introdução, os clones infecciosos já descritos de vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* utilizam sequências promotoras de citomegalovírus (CMV), T3, T7 ou SP6 ARN polimerase, predominando essa última (RICE *et al.*, 1989; LAI *et al.*, 1991; SUMIYOSHI; HOKE; TRENT, 1992; KHROMYCK; WESTAWAY, 1994; GRITSUN; GOULD, 1995; KAPOOR *et al.*, 1995; KINNEY *et al.*, 1997; MANDL *et al.*, 1997; POLO *et al.*, 1997; GRITSUN; GOULD, 1998; GUALANO *et al.*, 1998; HURRELBRINK; NESTOROWICZ; MCMINN, 1999; VAN DER MOST; CORVER; STRAUSS, 1999; CAMPBELL; PLETNEV, 2000; LEE; LOBIGS, 2000; PURI *et al.*, 2000; SRIBURI *et al.*, 2001; YAMSHCHIKOV *et al.*, 2001; YAMSHCHIKOV; MISHIN; COMINELLI, 2001; MISHIN; COMINELLI; YAMSHCHIKOV, 2001; ZHANG *et al.*, 2001; SHI *et al.*, 2002; BREDENBEEK *et al.*, 2003; YUN *et al.*, 2003; BLANEY JR. *et al.*, 2004a; BLANEY JR. *et al.*, 2004b; HAYASAKA *et al.*, 2004; MCELROY *et al.*, 2005; ROSSI *et al.*, 2005; ZHAO *et al.*, 2005; PIERRO *et al.*, 2006; TAJIMA *et al.*, 2006; SUZUKI *et al.*, 2007). Em alguns casos entre a sequência promotora e o início da sequência do vírus é adicionado um G, cuja presença parece estar associada a uma maior taxa de transcrição do que o A que constitui o primeiro nucleotídeo dos genomas de *Flavivirus* (RICE *et al.*, 1989; IMBURGIO *et al.*, 2000). Ademais, já foi demonstrado por outros autores que a presença de alguns nucleotídeos extras entre a sequência promotora e a viral, assim como após o final da 3'RNC, não impede a recuperação de partículas virais (RICE *et al.*, 1989; LAI *et al.*, 1991; KHROMYKH; WESTAWAY, 1994; KINNEY *et al.*, 1997; POLO *et al.*, 1997; GUALANO *et al.*, 1998; HURRELBRINK; NESTOROWICZ; MCMINN, 1999; CAMPBELL; PLETNEV, 2000; PURI *et al.*, 2000; LEE; LOBIGS, 2000; YAMSHCHIKOV *et al.*, 2001; SHI *et al.*, 2002; YUN *et al.*, 2003; BLANEY JR. *et al.*, 2004b; PIERRO *et al.*, 2006). No entanto, a presença desses nucleotídeos extras é mais bem tolerada na extremidade 3' do que na 5' (YAMSHCHIKOV *et al.*, 2001) e em alguns casos está associada a uma diminuição da infecciosidade dos transcritos (MANDL *et al.*, 1997; YAMSHCHIKOV *et al.*, 2001; YUN *et al.*, 2003). Além disso, existem evidências de que esses nucleotídeos extras são perdidos, resultando em progênies virais com extremidades 5' e 3' autênticas (KHROMYKH; WESTAWAY, 1994; YAMSHCHIKOV *et al.*, 2001; YUN *et al.*, 2003). A estratégia utilizada em nosso trabalho previa um nucleotídeo extra (G) entre a sequência promotora (T7) e a 5'RNC. Já em 3'RNC uma extremidade sem a presença de nucleotídeos extras é garantida pela presença

da ribozima do vírus da hepatite delta, cuja sequência se encontra logo após a da 3'RNC. Como mostram os resultados de ROSSI *et al.* (2005), o uso da ribozima aumenta a eficiência de transfecção de 20 a 100 vezes quando comparada à estratégia tradicional de linearização com endonuclease seguida de tratamento com exonuclease.

Outro componente importante na síntese de ARNs de Flavivírus *in vitro* é o *cap*, uma vez que ele desempenha um papel na estabilização desses ARNs e no processo de tradução das proteínas virais (CHIU; KINNEY; DREHER, 2005). A omissão do *cap* da reação de transcrição resulta em uma queda na infecciosidade dos transcritos (MANDL *et al.*, 1997). Para que o *cap* seja eficientemente incorporado em alguns casos são utilizadas concentrações otimizadas do *cap* e do deoxinucleotídeo-trifosfato correspondente (dGTP:m⁷G(5')ppp(5')G ou dATP:m⁷G(5')ppp(5')A) (SUMIYOSHI; HOKE; TRENT, 1992; KHROMYKH; WESTAWAY, 1994; POLO *et al.*, 1997; HURRELBRINK; NESTOROWICZ; MCMINN, 1999; PANG; ZHANG; DAYTON, 2001; SHI *et al.*, 2002). Nas nossas reações de transcrição *in vitro* as concentrações de dGTP e m⁷G(5')ppp(5')G não foram otimizadas.

No caso da montagem do replicon, o trabalho de outros autores já mostrou que a omissão total da sequência das proteínas estruturais resulta na ausência de replicação (KHROMYKH; WESTAWAY, 1997). Para que a replicação ocorra é necessária a presença dos nucleotídeos que codificam a porção amino-terminal da proteína C, onde está localizada a sequência 5'CS. Essa sequência é complementar a 3'CS (HAHN *et al.*, 1987), situada na 3'RNC, e essa complementaridade é essencial para a replicação (BREDENBEEK *et al.*, 2003; LO *et al.*, 2003; ALVAREZ *et al.*, 2005b). Além disso, a manutenção da sequência sinal da proteína NS1, codificada pela porção C-terminal da proteína E, garante o correto endereçamento e processamento da mesma (CHAMBERS *et al.*, 1990; KHROMYKH; WESTAWAY, 1997; LINDENBACH; RICE, 2001). Assim sendo, em nossa estratégia de montagem do replicon foi excluída toda sequência codificadora das proteínas estruturais exceto pelos 56 primeiros e 82 últimos nucleotídeos que codificam as proteínas C e E, respectivamente.

Os métodos utilizados para introdução do ARN transcrito *in vitro* nas células alvo são classificados em duas categorias: métodos bioquímicos ou métodos físicos. Dentre os métodos bioquímicos podemos citar a transfecção mediada por fosfato de cálcio, dietilaminoetil-dextran (DEAE-dextran), reagentes lipídicos catiônicos

(lipofectina, lipofectAmine, DOTAP, DMRIE-C, FuGENE 6) e dendrímero ativado (SuperFect), sendo que todos esses métodos se baseiam na formação de complexos com o ácido nucléico que facilitam sua entrada na célula. O método físico comumente utilizado para transfecção de moléculas de ARN é a eletroporação, que por sua vez se baseia na formação de poros temporários na membrana celular através do uso de pulsos elétricos. Em um outro método físico, mais utilizado para vacinação, o ARN é injetado pela perfuração da membrana plasmática. Esse método é conhecido como biolístico (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Gonzalez *et al.* (2007) compararam a eficácia de alguns reagentes lipídicos catiônicos usados para transfecção com a eletroporação, que é um método bastante utilizado, mas que requer um grande número de células e quantidade de ARN, não pode ser realizado na presença de soro e está associado a uma intensa morte celular. Os resultados obtidos por esses autores indicam que os reagentes por eles testados (DMRIE-C, *TransIT*-mRNA Kit e *TransMessenger*) apresentaram resultados favoráveis em relação à eletroporação. Ademais, permitem que a transfecção seja realizada em células aderentes, utilizando quantidades de ARN menores que as dispensadas nos procedimentos de eletroporação, sendo que o número de células depende não do reagente utilizado, mas sim do tamanho do frasco de cultura (GONZALEZ *et al.*, 2007). Ruggli *et al.* (1996) não observaram vantagem no uso da eletroporação quando comparada a um lipídio catiônico (DOTAP). Segundo seus resultados, ambos os métodos resultam em porcentagens semelhantes de células transfectadas. Experiências anteriores em nosso laboratório também indicavam que a eletroporação além de ser um método mais trabalhoso, não apresentava vantagens em relação ao uso da lipofectina. Assim optamos pelo uso dessa última em nosso trabalho.

A possibilidade de que a reação positiva observada nas IFIs (FIGURAS 21, 22, 23 e 24) das culturas transfectadas com o replicon ocorra em função da tradução do ARN inicialmente transfectado foi descartada, uma vez que outros pesquisadores testaram essa hipótese com o uso de sistemas subgenômicos incapazes de replicação ou através do uso de marcadores moleculares tais como a luciferase. Os achados desses estudos mostram que o ARN transfectado tem vida curta e não pode ser associado à síntese protéica observada 48h pós-transfecção (KHROMYKH; WESTAWAY, 1997; SHI; TILGNER; LO, 2002; ALVAREZ *et al.*, 2005b; JONES; PATKAR; KUHN, 2005). Além disso, a síntese protéica só pode ser detectada

através de imunofluorescência se o ARN for amplificado, uma vez que a quantidade de proteína sintetizada a partir desse ARN está abaixo do limiar de detecção dessa técnica (KHROMYKH; WESTAWAY, 1997; CORVER *et al.*, 2003). Ainda de acordo com Khromykh e Westaway (1997), existe uma boa correlação entre resultados de ensaios de *Northern blot* e de imunofluorescência. O aumento no número de células positivas por imunofluorescência nas culturas transfectadas com o replicon (FIGURAS 21, 22, 23 e 24) é sugestivo de uma replicação eficiente de nosso sistema subgenômico. Isso também aponta para um carreamento de ARN do replicon por células filhas durante os eventos mitóticos, visto que não foi detectada a produção de partículas virais pela técnica de imunodetecção por foco (FIGURA 25). Esse aumento no número de células fluorescentes também foi observado por Pang, Zhang e Dayton (2001) em seu trabalho com um replicon de DENV2.

Alguns sistemas subgenômicos de replicon contam com marcadores moleculares que permitem uma quantificação indireta de sua replicação. Esses marcadores são bastante úteis quando se deseja avaliar o papel que mutações, deleções ou inserções nas sequências das proteínas não-estruturais e RNCs exercem nos processos de replicação ou tradução. O marcador mais utilizado é a luciferase, cuja atividade pode ser medida através de um simples ensaio bioquímico após a lise das células transfectadas (LO *et al.*, 2003; ALVAREZ *et al.*, 2005b; JONES; PATKAR; KUHN, 2005; HOLDEN *et al.*, 2006; NG *et al.*, 2007; SUZUKI *et al.*, 2007). O efeito dessas mudanças também pode ser avaliado por imunocitoquímica (SUZUKI *et al.*, 2007), imunofluorescência (PANG; ZHANG; DAYTON, 2001; SHI; TILGNER; LO, 2002; CORVER *et al.*, 2003; JONES; PATKAR; KUHN, 2005; NG *et al.*, 2007) ou ainda com o uso de um marcador como a GFP (SHI; TILGNER; LO, 2002; JONES; PATKAR; KUHN, 2005; NG *et al.*, 2007), no entanto essas técnicas não permitem uma mensuração precisa da expressão das proteínas e do processo replicativo associado à essa expressão, dificultando a identificação de mutações que tenham um efeito sutil sobre esses processos. Outro marcador, menos utilizado, é a cloranfenicol acetiltransferase (KHROMYKH; WESTAWAY, 1997). A replicação desses sistemas subgenômicos pode ainda ser avaliada pela técnica de PCR quantitativo (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) (SHI; TILGNER; LO, 2002; LO *et al.*, 2003; JONES *et al.*, 2005; HOLDEN *et al.*, 2006; NG *et al.*, 2007) ou pela mensuração da concentração de NS1 presente no sobrenadante das culturas transfectadas, pela técnica de ELISA (JONES *et al.*,

2005). No entanto essa última técnica só pode ser utilizada no caso de culturas de células mamíferas, uma vez que a secreção de NS1 não é observada em células de inseto (CHAMBERS *et al.*, 1990). Uma das perspectivas desse trabalho é a inserção de marcadores no sistema subgenômico de replicon. Já foram sintetizados oligonucleotídeos iniciadores para inserção tanto do gene da GFP quanto da luciferase em duas posições diferentes do clone do replicon: antes da sequência sinal da NS1 ou na região variável (RV) da 3'RNC. Como demonstrado por Khromykh e Westaway (1997) deleções de até 76 nucleotídeos na RV da 3'RNC não tem nenhum efeito sobre a replicação, no entanto a inserção de marcadores nessa região exerce um efeito inibitório sobre a tradução. A inserção dos marcadores em ambas as posições implicará na transformação do sistema subgenômico em bicistrônico pela inserção de um sítio de entrada interna do ribosso (*internal ribosome entry site*, IRES) entre o marcador e a sequência sinal da NS1 ou na RV da 3'RNC antes do marcador.

Outras perspectivas incluem o uso desse sistema subgenômico para triagem de compostos com atividade antiviral e na obtenção de partículas semelhantes a vírus (*virus-like particles*, VLPs) através de ensaios de trans-complementação, ambos de extrema importância e aplicação prática. Experimentos de trans-complementação podem também ser utilizados no estudo da função das proteínas virais. Porém, para essas finalidades seria interessante o estabelecimento de culturas celulares onde ocorra a expressão estável e não apenas temporária do replicon. Isso normalmente é feito pela inserção de marcadores de resistência como a puromicina (NG *et al.*, 2007) ou neomicina (KHROMYKH; WESTAWAY, 1997; SHI; TILGNER; LO, 2002; JONES; PATKAR; KUHN, 2005; SCHOLLE *et al.*, 2004) no clone do replicon.

Assim como nós, outros grupos relataram dificuldades na construção de clones infecciosos de Flavivírus (RICE *et al.*, 1989; LAI *et al.*, 1991; SUMIYOSHI; HOKE; TRENT, 1992; KHROMYKH; WESTAWAY, 1994; GRITSUN; GOULD, 1995; POLO *et al.*, 1997; GRITSUN; GOULD, 1998; YAMSHCHIKOV; MISHIN; COMINELLI, 2001; SHI *et al.*, 2002; BLANEY JR. *et al.*, 2004a; PIERRO *et al.*, 2006). Uma região do genoma viral que parece ser especialmente problemática quando clonada é a porção do genoma que codifica as proteínas estruturais, fato que pudemos comprovar em nosso trabalho. Do mesmo modo que nós, outros autores relataram problemas na clonagem desse segmento (KHROMYKH;

WESTAWAY, 1994; POLO *et al.*, 1997; SHI *et al.*, 2002; BLANEY JR. *et al.*, 2004a). Segundo Shi *et al.* (2002) esta é a porção do genoma que apresenta maior instabilidade quando clonada, por isso esses autores sugerem que a inserção desse segmento seja o último passo na construção de clones infecciosos com sequência completa. Polo *et al.* (1997) descrevem uma situação muito semelhante ao problema que enfrentamos nas primeiras tentativas de obtenção do clone pAC+D3/290MluI/D3.29 (FIGURA 33), que compreende as sequências codificadoras de todas proteínas estruturais e de parte das não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b e parte da NS3). Todas as estratégias empregadas para construir esse clone através da ligação de dois fragmentos, um compreendendo a maior parte das proteínas estruturais (pAC+D3/290MluI/BspTI, FIGURA 29) e outro compreendendo uma parte da E, NS1, NS2a, NS2b e parte da NS3 (pAC+D3/290BspTI/D3.29, FIGURA 29), não foram bem sucedidas. Blaney Jr. *et al.* (2004a) também expõem a ocorrência de uma situação de mesma natureza na construção do clone infeccioso de uma cepa de DENV3. Na experiência desses autores a junção de dois fragmentos, um abrangendo quase toda sequência codificadora das proteínas estruturais e outro, toda NS1 e parte da NS2a, em um mesmo vetor, inviabilizava a recuperação do clone infeccioso com sequência completa. Para contornar esse problema Polo *et al.* (1997) realizaram a clonagem em um sistema de levedura tirando vantagem da recombinação homóloga que tornou possível a clonagem do genoma completo em um único vetor. Posteriormente essa mesma estratégia foi utilizada com sucesso em outro trabalho na construção de um clone infeccioso de DENV1 (PURI *et al.*, 2000). Já Blaney Jr. *et al.* (2004a) inseriram no final da proteína E uma pequena sequência cassete, que é retirada antes do processo de transcrição *in vitro*, contendo códons de parada para todas as fases de leitura. Yamshchikov, Mishin e Cominelli (2001) já haviam previamente adotado estratégia semelhante na construção de seu clone infeccioso do vírus da Encefalite japonesa, que se baseava na transcrição *in vivo* dirigida por um promotor de CMV, inserindo íntrons que antecedem as regiões que pareciam ser responsáveis por desestabilizar o inserto nos vetores bacterianos.

É senso comum que o genoma de Flavivírus possui regiões que quando expressas são tóxicas aos sistemas procariotos (RICE *et al.*, 1989; SUMIYOSHI; HOKE; TRENT, 1992; POLO *et al.*, 1997; YAMSHCHIKOV; MISHIN; COMINELLI, 2001; SRIBURI *et al.*, 2001; PIERRO *et al.*, 2006). Essa toxicidade propicia o surgimento de mutações compensatórias (LAI *et al.*, 1991; SUMIYOSHI; HOKE;

TRENT, 1992), que por vezes resultam em ARNs não infecciosos, e pode também ser evidenciada pela presença de colônias bacterianas de diferentes tamanhos, sendo que os clones de sequência completa têm sido associados às colônias de tamanho menor (POLO *et al.*, 1997; GRITSUN; GOULD, 1998; SRIBURI *et al.*, 2001; BREDENBEEK *et al.*, 2003). Possivelmente essa toxicidade se deve ao fato de a porção estrutural do genoma desses vírus codificar proteínas majoritariamente associadas a membranas (YAMSHCHIKOV; MISHIN; COMINELLI, 2001). Uma vez que os promotores virais utilizados na grande maioria desses trabalhos não são ativos nos sistemas procariotos, Yamshchikov, Mishin e Cominelli (2001) sugerem a ocorrência de transcrição espúria a partir de sequências semelhantes às promotoras, presentes nos genomas virais. Gritsun e Gould (1995), por outro lado, sugerem que a razão da instabilidade desses genomas nos vetores bacterianos se deve a presença em sua sequência de sítios relacionados à ocorrência de eventos de recombinação em *E. coli*.

A questão da instabilidade do inserto nos sistemas bacterianos é sem dúvida o principal obstáculo na construção dos clones infecciosos de Flavivírus. Uma vez que não existe uma fórmula única para solucionar essa questão ela vem sendo abordada na maior parte dos estudos de forma empírica. No entanto, grande parte dos autores concorda que o uso de vetores de baixa cópia é essencial (GRITSUN; GOULD, 1998; HURRELBRINK; NESTOROWICZ; MCMINN, 1999; YUN *et al.*, 2003; PIERRO *et al.*, 2006; SUZUKI *et al.*, 2007) e alguns ainda sugerem que o crescimento bacteriano seja realizado em temperaturas que variam de 20°C a 28°C (GRITSUN; GOULD, 1998; SRIBURI *et al.*, 2001; SHI *et al.*, 2002; HAYASAKA *et al.*, 2004). Neste trabalho ambas as estratégias foram utilizadas visando diminuir a quantidade de produtos tóxicos produzidos e aumentar o sucesso nos processos de clonagem. O uso de plasmídeos de alta cópia também se mostrou inviável na construção de clones infecciosos de vírus do gênero *Pestivirus*, também pertencentes à família *Flaviviridae* (MEYERS; THIEL; RÜMENAPF, 1996; MOORMANN *et al.*, 1996; RUGGLI *et al.*, 1996; MENDEZ *et al.*, 1998).

Ruggli *et al.* (1996), que foram pioneiros no uso do vetor pACNR1180 para construção de clones infecciosos, chamam a atenção em seu trabalho para o fato de a porção 5' do genoma do vírus da Febre suína clássica ser estável apenas quando clonada na orientação contrária a do gene de resistência à ampicilina. Tendo em vista os resultados positivos obtidos por Breddenbeek *et al.* (2003) no qual as

clonagens em um vetor derivado do pACNR1180 também foram realizadas na orientação contrária a do gene de resistência à ampicilina, o vetor utilizado neste estudo (FIGURA 7), que é derivado do pACNR1180, foi construído de forma a permitir a clonagem apenas nessa orientação.

Um exemplo que ilustra bem a diversidade de protocolos e estratégias para a clonagem de genomas virais completos e regeneração de partículas infectivas é o caso da construção do clone infeccioso do vírus da febre amarela. Inicialmente Rice *et al.* (1989) não tiveram sucesso na construção de um clone que contivesse todo genoma viral em um único vetor, no caso o pBR322, por isso foi adotada uma estratégia de ligação *in vitro* que envolvia dois vetores, seguida de transcrição *in vitro*. Vários anos mais tarde Van der Most, Corver e Strauss (1999) e posteriormente Bredenbeek *et al.* (2003) partindo dos mesmos vetores construídos por Rice *et al.* (1989) construíram um clone infeccioso com o genoma viral completo clonado (*full-length*) utilizando o vetor pBeloBAC11 (VAN DER MOST; CORVER; STRAUSS, 1999) ou o pACNR1181 (BREEDENBEEK *et al.*, 2003). Esse vetor possui um número de cópias apenas um pouco menor do que o pBR322, que no entanto foi utilizado com sucesso em outros trabalhos (LAI *et al.*, 1991; KHROMYKH; WESTAWAY, 1994; KAPOOR *et al.*, 1995; KINNEY *et al.*, 1997, MANDL *et al.*, 1997; GRITSUN; GOULD, 1998; LEE; LOBIGS, 2000; YAMSHCHIKOV; MISHIN; COMINELLI, 2001; YAMSHCHIKOV *et al.*, 2001; SHI *et al.*, 2002; HAYASAKA *et al.*, 2004; BLANEY JR. *et al.*, 2004b). Nesses casos o que pode ter feito a diferença em relação ao trabalho de Rice *et al.* (1989) foi o uso de cepas bacterianas diferentes ou características inerentes às sequências virais clonadas. A importância da cepa bacteriana pode ser evidenciada no trabalho de Lai *et al.* (1991) que resolveram os problemas de instabilidade através da substituição da cepa bacteriana. Inicialmente esses autores utilizaram a cepa HB101 (F- mcrB mrr hsdS20(rB- mB-) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(SmR) glnV44 λ -) que foi posteriormente substituída pela cepa BD1528 (F-, Δ (codB-lacI)3, glnV44(AS), galK2(Oc), galT22, LAM-, tyrT58(AS), ung-1, metB1, hsdR514, trpR55) gerando melhores resultados. Em contrapartida, utilizando os mesmos vetores e cepas bacterianas que Yamshchikov *et al.* (2001), Sumiyoshi, Hoke e Trent (1992) não obtiveram o mesmo sucesso que os primeiros na construção de um clone infeccioso do vírus da Encefalite japonesa com o genoma viral completo clonado (*full-length*).

Dados da literatura apontam que a questão da instabilidade dos insertos nos sistemas bacterianos têm sido contornada basicamente de três formas. A primeira consiste na clonagem do genoma viral em duas partes que são posteriormente unidas através de um procedimento de ligação *in vitro*, seguido de transcrição *in vitro* (RICE *et al.*, 1989; SUMIYOSHI; HOKE; TRENT, 1992; KAPOOR *et al.*, 1995; MANDL *et al.*, 1997; GRITSUN; GOULD, 1998). A segunda faz uso de vetores de levedura e dos eventos de recombinação homóloga que ocorrem nesses organismos (POLO *et al.*, 1997; PURI *et al.*, 2000). A terceira, por sua vez, envolve a amplificação de todo genoma viral por RT-PCR utilizando um oligonucleotídeo iniciador que hibridize com a porção 5'RNC e possua a sequência de um promotor a montante, evitando o passo de clonagem (GRITSUN; GOULD, 1995). Em nosso trabalho, foi tentada uma única vez o procedimento de ligação *in vitro*, de duas porções do genoma clonadas em diferentes vetores, seguido de transcrição *in vitro*. Nosso insucesso deveu-se muito provavelmente a não otimização do procedimento de ligação *in vitro*, ou ainda à digestão parcial de uma das porções do genoma. O resultado foi a transcrição apenas da porção precedida pelo promotor da T7 ARN polimerase (FIGURA 32).

7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Dentro dos objetivos propostos neste trabalho uma grande parte foi alcançada e avançamos de forma significativa para a obtenção do clone infeccioso de DENV3. Todos os segmentos do genoma puderam ser amplificados por RT-PCR e a grande maioria clonada em vetores de alta cópia ou diretamente nos vetores de baixa cópia. A maioria dos clones teve sua sequência nucleotídica determinada e apenas os clones que não apresentaram substituições de aminoácidos com relação ao genoma da cepa BR DEN3 290-02 foram utilizados no trabalho. A montagem do clone do replicon da cepa BR DEN3 290-02 foi realizada com sucesso através da subclonagem dos segmentos correspondentes à sequência sinal da NS1 e das proteínas não-estruturais no vetor #50pBAC. A determinação da sequência desse clone mostrou apenas uma substituição sinônima, não tendo sido identificadas outras diferenças com relação ao genoma da cepa original. Foi então realizada a caracterização biológica do replicon através de sua linearização, síntese de ARN por transcrição *in vitro* e posterior transfecção em células C6/36. A análise das culturas transfectadas foi realizada por IFI e os resultados indicam que o replicon foi eficientemente transfectado e replicou nas células, uma vez que as proteínas virais foram reconhecidas pelos anticorpos policlonal α -D3 e monoclonal α -NS1 (7E11) e não foram detectadas pelo anticorpo monoclonal α -E (4G2) (FIGURA 26). Posteriormente, a titulação dos sobrenadantes das culturas transfectadas (FIGURA 25) determinou que nenhuma partícula viral havia sido produzida, confirmando que as proteínas virais identificadas na IFI não eram fruto de uma contaminação com nosso controle positivo. Apesar de todos os segmentos correspondentes ao genoma da cepa BR DEN3 290-02 já terem sido subclonados nos vetores de baixa cópia, nós ainda não tivemos sucesso na montagem de um clone infeccioso com o genoma viral completo clonado (*full-length*), ou na recuperação do clone infeccioso através do procedimento de ligação *in vitro* das duas porções do genoma que se encontram clonadas em dois vetores diferentes, seguido de transcrição *in vitro* e transfecção. Esse trabalho assim como a inserção de marcadores moleculares no sistema de replicon ainda estão em progresso.

Recentemente foi demonstrada a cocirculação de dois genótipos de DENV3 (III e V) no Brasil (NOGUEIRA *et al.*, 2008). Como já comentado, DENV3

pertencentes ao genótipo III têm sido associados ao desenvolvimento de formas mais graves da doença (MESSER *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2008). Há alguns anos nosso laboratório vem realizando um trabalho de caracterização genética e biológica de alguns isolados clínicos de DENV3 obtidos durante os períodos epidêmicos de 2002 e 2004 (NOGUEIRA *et al.*, 2008). Dados preliminares apontam para algumas diferenças interessantes na sequência desses vírus que estão associadas a diferenças também a nível de fenótipo viral. Por isso, dentro de nossas perspectivas estão a avaliação de algumas dessas diferenças no sistema subgenômico de replicon e no clone infeccioso, quando esse estiver disponível, assim como a inserção de marcadores moleculares (luciferase ou GFP) no sistema subgenômico de replicon. A inserção de marcadores moleculares nos permitirá avaliar melhor os efeitos de mutações não-sinônimas na região não estrutural tanto a nível de replicação quanto de tradução viral. Além disso, nosso grupo iniciou recentemente um estudo de avaliação de compostos antivirais para dengue e, como já mencionado, os sistemas subgenômicos de replicon constituem uma ferramenta bastante interessante para explorar a atividade desses compostos (ROSSI *et al.*, 2005; NG *et al.*, 2007).

REFERÊNCIAS

- ACIOLI-SANTOS, B. *et al.* MBL2 gene polymorphisms protect against development of thrombocytopenia associated with severe dengue phenotype. **Human Immunology**, New York, v. 69, p. 122-128, 2008.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ALVAREZ, D. E. *et al.* Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 79, n. 11, p. 6631-6643, 2005a.
- ALVAREZ, D. E. *et al.* Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. **Virology**, New York, v. 339, n. 2, p. 200-212, 2005b.
- ASHBURN, P. M.; CRAIG, C. F. Experimental investigations regarding the etiology of dengue fever. **The Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 4, p. 440-475, 1907.
- BARNES, W. M. Plasmid detection and sizing in single colony lysates. **Science**, Washington, v. 195, p. 393-394, 1977.
- BLANEY JR., J. E. *et al.* Genetically modified, live attenuated dengue virus type 3 vaccine candidates. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 71, n. 6, p. 811-821, 2004a.
- BLANEY JR., J. E. *et al.* Vaccine candidates derived from a novel infectious cDNA clone of an American genotype dengue virus type 2. **BMC Infectious Diseases**, 4:39, 2004b. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=15461822>>. Acesso em: 31/08/09.
- BLANEY JR., J. E. *et al.* Vaccine candidates for dengue virus type 1 (DEN1) generated by replacement of the structural genes of rDEN4 and rDEN4(delta)30 with those of DEN1. **Virology Journal**, 4:23, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=17328799>>. Acesso em: 31/08/09.
- BONALDO, M. C. *et al.* Construction and characterization of recombinant flaviviruses

bearing insertions between E and NS1 genes. **Virology Journal**, 4:115, 2007.

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=17971212>>. Acesso em: 31/08/09.

BORDIGNON, J. *et al.* Dengue neurovirulence in mice: identification of molecular signatures in the E and NS3 helicase domains. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 79, n. 10, p. 1506-1517, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002. 20p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Dengue. Casos confirmados de FHD, segundo ano de confirmação. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990-1991, 1994-2008*, 2008a. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_conf_fhd.pdf>. Acesso em: 10/03/2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 24p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Informe Epidemiológico da Dengue, Janeiro a Dezembro de 2007. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_010208.pdf>. Acesso em: 10/03/2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Informe epidemiológico da dengue Janeiro a Novembro de 2008, 2008b. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_janeiro_novembro.pdf>. Acesso em: 21/02/2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica da Dengue até Dezembro de 2006. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_dez2006.pdf>. Acesso em: 10/03/2009.

BRAVO, J. R.; GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. P. Why dengue hemorrhagic fever in Cuba? I. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 81, p. 816-820, 1987.

- BREDENBEEK, P. J. *et al.* A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. **Journal of General Virology**, London, v. 84, p. 1261-1268, 2003.
- CAMPBELL, M. S.; PLETNEV, A. G. Infectious cDNA Clones of Langat Tick-Borne flavivirus that differ from their parent in peripheral neurovirulence. **Virology**, New York, v. 269, p. 225-237, 2000.
- CAREY, D. E. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 243-262, 1971.
- CAUFOUR, P. S. *et al.* Construction, characterization and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 viruses. **Virus Research**, Amsterdam, v. 79, n. 1-2, p. 1-14, 2001.
- CHAMBERS, T. J. *et al.* Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Reviews of Microbiology**, Palo Alto, v. 44, p. 649-688, 1990.
- CHIU, W.; KINNEY, R. M.; DREHER, T. W. Control of translation by the 5'- and 3'-terminal regions of the dengue virus genome. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 79, n.13, p. 8303-8315, 2005.
- CLEAVES, G. R.; RYAN, T. E.; SCHLESINGER, R.W. Identification and characterization of type 2 dengue virus replicative intermediate and replicative form RNAs. **Virology**, New York, v. 111, p. 73-83, 1981.
- CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 80, n. 23, p. 11418-11431, 2006.
- COFFEY, L. L. *et al.* Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. **Microbes and Infection**, Paris, v. 11, n. 2, p. 143-156, 2009.
- COLOGNA, R.; RICO-HESSE, R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 77, n. 7, p. 3929-3938, 2003.
- CORVER, J. *et al.* Fine mapping of a cis-acting sequence element in yellow fever virus RNA that is required for RNA replication and cyclization. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 77, n. 3, p. 2265-2270, 2003.

DEEN, J. L. *et al.* The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. **The Lancet**, London, v. 368, n. 9530, p. 170-173, 2006.

DÈSPRES, P.; FRENKIEL, M.P.; DEUBEL, V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. **Virology**, New York, v. 196, n. 1, p. 209-219, 1993.

DONG, H.; ZHANG, B.; SHI, P. Terminal structures of West Nile virus genomic RNA and their interactions with viral NS5 protein. **Virology**, New York, v. 391, p. 123-135, 2008.

DUAN, X. *et al.* Novel binding between pre-membrane protein and vacuolar ATPase is required for efficient dengue virus secretion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 373, n. 2, p. 319-324, 2008.

DURBIN, A. P. *et al.* rDEN2/4D30(ME), a live attenuated chimeric dengue serotype 2 vaccine is safe and highly immunogenic in healthy dengue naive adults. **Human Vaccines**, Georgetown, v. 2, n. 6, p. 255-260, 2006.

EDELMAN, R. *et al.* Phase I trial of 16 formulations of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 69, Suppl. 6, p. 48-60, 2003.

EGLOFF, M. *et al.* An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. **The EMBO Journal**, Eynsham, v. 21, n. 11, p. 2757-2768, 2002.

EWING, B. *et al.* Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, p. 175-185, 1998.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, p. 186-194, 1998.

FAZEKAS DE ST GROTH, S; WEBSTER, R. G. Disquisitions on original antigenic sin. I. Evidence in man. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 124, n. 3, p. 331-345, 1966.

FERES, V. C. R. *et al.* Laboratory surveillance of dengue virus in Central Brazil, 1994-2003. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 37, p. 178-183, 2006.

FERREIRA, M. L. B. *et al.* Manifestações neurológicas de dengue. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v. 63, n. 2-B, p. 488-493, 2005.

FIGUEIREDO, R. M. P. *et al.* Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 14, n. 4, p. 667-669, 2008.

GEHRKE, R. *et al.* Incorporation of Tick-borne encephalitis virus replicons into virus-like particles by a packaging cell line. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 77, n. 16, p. 8924-8933, 2003.

GENTRY, M. K. *et al.* Identification of distinct antigenic determinants on dengue-2 virus using monoclonal antibodies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 31, p. 548-555, 1982.

GONZALEZ, G. *et al.* Selection of an optimal RNA transfection reagent and comparison to eletroporation for the delivery of viral RNA. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 145, p. 14-21, 2007.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A Graphical Tool for Sequence Finishing. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, p. 195-202, 1998.

GORDON, D.; DESMARAIS C.; GREEN, P. Automated Finishing with Autofinish. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 11, n. 4, p. 614-625, 2001.

GOULD, E. A. *et al.* Examination of the immunological relationships between flaviviruses using yellow fever monoclonal antibodies. **Journal of General Virology**, London, v. 66, n. 7, p. 1369-1382, 1985.

GRITSUN, T. S.; GOULD, E. A. Development and analysis of a tick-borne encephalitis virus infectious clone using a novel and rapid strategy. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 76, p. 109-120, 1998.

GRITSUN, T. S.; GOULD, E. A. Infectious transcripts of tick-borne encephalitis virus, generated in days by RT-PCR. **Virology**, New York, v. 214, p. 611-618, 1995.

GUALANO, R. C. *et al.* Identification of a major determinant of mouse neurovirulence of dengue virus type 2 using stably cloned genomic-length cDNA. **Journal of General Virology**, London, v. 79, p. 437-446, 1998.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. **Infectious Agents and Disease**, New York, v. 2, n. 6, p. 383-393, 1993.

GUIRAKHOO, F. *et al.* Live attenuated chimeric yellow fever dengue type 2 (ChimeriVax™ – DEN2) vaccine: phase I clinical trial for safety and immunogenicity. **Human Vaccines**, Georgetown, v. 2, n. 2, p. 60-67, 2006.

GUIRAKHOO, F. *et al.* Safety and efficacy of chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine formulations in nonhuman primates. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 78, n. 9, p. 4761-4775, 2004.

GUIRAKHOO, F. *et al.* 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**, New York, v. 298, p. 146-159, 2002.

GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 8, n. 2, p. 69-80, 2004.

HAHN, C. S. *et al.* Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 198, n. 1, p. 33-41, 1987.

HALSTEAD, S. B. *et al.* Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 65, n. 3, p. 180-183, 2001.

HALSTEAD, S. B.; CHOW, J. S.; MARCHETTE, N. J. Immunological enhancement of dengue virus replication. **Nature New Biology**, London, v. 243, p. 24-26, 1973.

HALSTEAD, S. B.; O'ROURKE, E. J. Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leucocytes. **Nature**, Basingstoke, v. 265, p. 739-741, 1977.

HAMMON, W. M.; RUDNICK, A.; SATHER, G. E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. **Science**, Washington, v. 131, p. 1102-1103, 1960.

HAYASAKA, D. *et al.* Amino acid changes responsible for attenuation of virus neurovirulence in an infectious cDNA clone of the Oshima strain of tick-borne encephalitis virus. **Journal of General Virology**, London, v. 85, p. 1007-1018, 2004.

HOLDEN, K. L. *et al.* Inhibition of dengue virus translation and RNA synthesis by a morpholino oligomer targeted to the top of the terminal 3' stem-loop structure. **Virology**, New York, v. 344, p. 439-452, 2006.

HOLDEN; K. L.; HARRIS, E. Enhancement of dengue virus translation: role of the 3' untranslated region and the terminal 3' stem-loop domain. **Virology**, New York, v. 329, p. 119-133, 2004.

HOLMAN, D. H. *et al.* Two complex, adenovirus-based vaccines that together induce immune responses to all four dengue virus serotypes. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 14, n. 2, p. 182-189, 2007.

HOLMES, E. C. Patterns of intra- and interhost nonsynonymous variation reveal strong purifying selection in dengue virus. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 77, n. 20, p. 11296-11298, 2003.

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

HUANG, C. Y. H *et al.* Dengue PDK-53 virus as a chimeric carrier for tetravalent dengue vaccine development. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 77, n. 21, p. 11436-11447, 2003.

HURRELBRINK, R. J.; NESTOROWICZ, A.; MCMINN, P. C. Characterization of infectious Murray Valley encephalitis virus derived from a stably cloned genome-length cDNA. **Journal of General Virology**, London, v. 80, p. 3115-3125, 1999.

IMBURGIO, D. *et al.* Studies of promoter recognition and start site selection by T7 RNA polymerase using a comprehensive collection of promoter variants. **Biochemistry**, Washington, v. 39, p. 10419-10430, 2000.

ISHIKAWA, T. *et al.* Construction and evaluation of a chimeric pseudoinfectious virus vaccine to prevent Japanese encephalitis. **Virology**, New York, v. 26, p. 2772-2781, 2008.

JONES, C. T.; PATKAR, C. G.; KUHN, R. J. Construction and applications of yellow fever virus replicons. **Virology**, New York, v. 331, p. 247-259, 2005.

JONES, M. *et al.* Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 79, n. 9, p. 5414-5420, 2005.

KAPOOR, M. *et al.* Synthesis and characterization of an infectious dengue virus type-2 RNA genome (New Guinea C strain). **Gene**, Amsterdam, v. 162, p. 175-180, 1995.

KAWANO, H. *et al.* Genetic determinants of dengue type 4 virus neurovirulence for mice. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 67, n. 11, p. 6567-6575, 1993.

KHANAM, S. *et al.* An adenovirus prime/plasmid boost strategy for induction of equipotent immune responses to two dengue virus serotypes. **BMC Biotechnology**, 7:10, 2007. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1805746>>. Acesso em: 31/08/09.

KHROMYKH, A. A.; WESTAWAY, E. G. Completion of Kunjin virus RNA sequence and recovery of an infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 68, n. 7, p. 4580-4588, 1994.

KHROMYKH, A. A.; WESTAWAY, E. G. Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 71, n. 2, p. 1497-1505, 1997.

KINNEY, R. M. *et al.* Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK53. **Virology**, New York, v. 230, p. 300-308, 1997.

KITCHENER, S. *et al.* Immunogenicity and safety of two live-attenuated tetravalent dengue vaccine formulations in healthy Australian adults. **Vaccine**, Amsterdam, v. 24, p. 1238-1241, 2006.

KOFLER, R. M. *et al.* Mimicking live flavivirus immunization with a noninfectious RNA vaccine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 17, p. 1951-1956, 2004.

KOURÍ, G.; GUZMÁN, M. G.; BRAVO, J. R. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 81, p. 821-823, 1987.

KÜMMERER, B. M.; RICE, C. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 76, n. 10, p. 4773-4784, 2002.

KUROSU, T. *et al.* Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 362, n. 4, p. 1051-1056, 2007.

LAI, C. *et al.* Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, p. 5139-5143, 1991.

LAI, C.; PUTNAK, R. Dengue and dengue viruses. In: TABOR, E. (Ed.). **Emerging Viruses in Human Populations**. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2007. p. 269-298.

LEE, E.; LOBIGS, M. Substitutions at the putative receptor-binding site of an encephalitic flavivirus alter virulence and host cell tropism and reveal a role for glycosaminoglycans in entry. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 74, n. 19, p. 8867-8875, 2000.

LEUNG, D. *et al.* 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**, Baltimore, v. 276, n. 49, p.45762-45771, 2001.

LIN, S. *et al.* Study of sequence variation of dengue type 3 virus in naturally infected mosquitoes and human hosts: implications for transmission and evolution. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 78, n. 22, p. 12717-12721, 2004.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 991-1041.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Trans-complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 71, n. 12, p. 9608-9617, 1997.

LING, L. M.; WILDER-SMITH, A.; LEO, Y. S. Fulminant hepatitis in dengue haemorrhagic fever. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 38, n. 3, p. 265-268, 2007.

LO, M. K. *et al.* Functional analysis of mosquito-borne flavivirus conserved sequence elements within 3' untranslated region of West Nile virus by use of a reporting replicon that differentiates between viral translation and RNA replication. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 77, n. 18, p. 10004-10014, 2003.

MANDEL, M.; HIGA, A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 53, n. 1, p. 159-162, 1970.

MANDL, C. W. *et al.* Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudoerfl and high virulence strain Hypr. **Journal of General Virology**, London, v. 78, p. 1049-1057, 1997.

MASON, P. W. *et al.* The antigenic structure of dengue type 1 virus envelope and NS1 proteins expressed in *Escherichia coli*. **Journal of General Virology**, London, v. 71, p. 2107-2114, 1990.

MATEU, G. P. *et al.* Construction and biological properties of yellow fever 17D/dengue type 1 recombinant virus. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 101, n. 3, p. 289-298, 2007.

MCELROY, K. L. *et al.* Characterization of an infectious clone of the wild-type yellow fever Asibi strain that is able to infect and disseminate in mosquitoes. **Journal of General Virology**, London, v. 86, p. 1747-1751, 2005.

MENDEZ, E. *et al.* Infectious bovine viral diarrhea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 72, n. 6, p. 4737-4745, 1998.

MESSER, W. B. *et al.* Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, n. 7, p. 800-809, 2003.

- MEYERS, G.; THIEL, H.; RÜMENAPF, T. Classical swine fever virus: recovery of infectious viruses from cDNA constructs and generation of recombinant cytopathogenic defective interfering particles. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 70, n. 3, p. 1588-1595, 1996.
- MIAGOSTOVICH, M. P. *et al.* Retrospective study on dengue fatal cases. **Clinical Neuropathology**, Munich, v. 16, n. 4, p. 204-208, 1997.
- MISHIN, V. P.; COMINELLI, F. C.; YAMSHCHIKOV, V. F. A 'minimal' approach in design of flavivirus infectious DNA. **Virus Research**, Amsterdam, v. 81, p. 113-123, 2001.
- MISRA, U. K. *et al.* Neurological manifestations of dengue virus infection. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 244, n. 1, p. 117-122, 2006.
- MODIS, Y. *et al.* Structure of the Dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, Basingstoke, v. 427, n. 6972, p. 313-319, 2004.
- MONATH, T. P. Yellow fever and dengue: the interactions of virus, vector and host in the re-emergence of epidemic disease. **Seminars in Virology**, San Diego, v. 5, n. 2, p. 133-145, 1994.
- MONGKOLSAPAYA, J. *et al.* Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature Medicine**, New York, v. 9, n. 7, p. 921-927, 2003.
- MOORMANN, R. J. M. *et al.* Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 70, n. 2, p. 763-770, 1996.
- MUÑOZ-JORDÁN, J. L. *et al.* Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 24, p. 14333-14338, 2003.
- MURRAY, C. L.; JONES, C. T.; RICE, C. M. Architects of assembly: roles of non-structural proteins in virion morphogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.6, n. 9, p. 699-708, 2008.

MUYLAERT, I. R.; GALLER, R.; RICE, C. M. Genetic analysis of the yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 71, n.1, p. 291-298, 1997.

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

NOGUEIRA, M. B. *et al.* 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 5, p. 483-488, 2008.

NOGUEIRA, R. M. R.; ARAÚJO, J. M. G.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, v. 22, n. 5, p. 358-363, 2007.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. A timeline for dengue in the Americas to december 31, 2000 and noted first occurrences. Disponível em: <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/dengue_history.htm>. Acesso em: 01/02/2007.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Number of reported cases of dengue and dengue hemorrhagic fever (DHF) in the Americas, by country: figures for 2008. Disponível em: <<http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue-cases-2008.pdf>>. Acesso em: 31/12/2008.

PANG, X.; ZHANG, M.; DAYTON, A. I. Development of dengue virus type 2 replicons capable of prolonged expression in host cells. **BMC Microbiology**, 1:18, 2001. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=56997>>. Acesso em: 31/08/09.

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

PIERRO, D. J. *et al.* Infectious clone construction of dengue virus type 2, strain Jamaican 1409, and characterization of a conditional E6 mutation. **Journal of General Virology**, London, v. 87, p. 2263-2268, 2006.

PLETNEV, A. G. Infectious cDNA clone of attenuated Langkat tick-borne flavivirus (strain E5) and a 3' deletion mutant constructed from it exhibit decreased

neuroinvasiveness in immunodeficient mice. **Virology**, New York, v. 282, p. 288-300, 2001.

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

PURI, B. *et al.* Construction of a full length infectious clone for dengue-1 virus western pacific, 74 strain. **Virus Genes**, Boston, v. 20, n. 1, p. 57-63, 2000.

PUTNAK, J. R. *et al.* An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. **Vaccine**, Amsterdam, v. 23, p. 4442-4452, 2005.

RAVIPRAKASH, K. *et al.* Needle-free biojector injection of a dengue virus type 1 DNA vaccine with human immunostimulatory sequences and the GM-CSF gene increases immunogenicity and protection from virus challenge in *Aotus* monkeys. **Virology**, New York, v. 315, p. 345-352, 2003.

RICE, C. M. *et al.* Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. **The New Biologist**, Philadelphia, v. 1, n. 3, p. 285-296, 1989.

RICO-HESSE, R. *et al.* Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, New York, v. 230, p. 244-251, 1997.

RIGAU-PÉREZ, J. G. Severe dengue: the need for new case definitions. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 6, n. 5, p. 297-302, 2006.

ROSEN, L. The emperor's new clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 26, n. 3, p. 337-343, 1977.

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

RUGGLI, N. *et al.* Nucleotide sequence of classical swine fever virus strain Alfort/187 and transcription of infectious RNA from stably cloned full-length cDNA. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 70, n. 6, p. 3478-3487, 1996.

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

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

SABIN, A. B.; SCHLESINGER, R. W. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. **Science**, Washington, v. 101, n. 2634, p.640-642, 1945.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Introducing cloned genes into cultured mammalian cells. In: _____. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. p. 16.1-16.62.

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. **Journal of General Virology**, London, v. 77, p. 2541-2545, 1996.

SANTOS, Q. N. *et al.* Guillain-Barré syndrome in the course of dengue. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v. 62, n. 1, p. 144-146, 2004.

SCHOLLE, F. *et al.* Trans-packaged West Nile virus-like particles: infectious properties in vitro and in infected mosquito vectors. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 78, n. 21, p. 11605-11614, 2004.

SHI, P. *et al.* Infectious cDNA clone of the epidemic West Nile virus from New York city. **Journal of Virology**, v. 76, n. 12, p. 5847-5856, 2002.

SHI, P.; TILGNER, M.; LO, M. K. Construction and characterization of subgenomic replicons of New York strain of West Nile virus. **Virology**, New York, v. 296, p. 219-233, 2002.

SHIZUYA, H. *et al.* Cloning and stable maintenance of 3000-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, n. 18, p. 8794-8797, 1992.

SIERRA, B. C. *et al.* Ethnicity and difference in dengue virus-specific memory T cell responses in Cuban individuals. **Viral Immunology**, New York, v. 19, n. 4, p. 662-668, 2006.

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

SILER, J. F.; HALL, M. W.; HITCHENS, A. P. Dengue: Its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity, and prevention. **The Philippine Journal of Science**, [S.I.], v. 29, p. 1-252, 1926.

SILVA, R. L. A. *et al.* Genetic analysis of dengue 3 virus subtype III 5' and 3' non-coding regions. **Virus Research**, Amsterdam, v. 135, p. 320-325, 2008.

SIMMONS, J. S.; ST JOHN, J. H.; REYNOLDS, F. H. K. Experimental studies of dengue. **The Philippine Journal of Science**, [S.I.], v. 44, n. 1-2, p. 1-252, 1931.

SRIBURI, R. *et al.* Construction of infectious dengue 2 virus cDNA clones using high copy number plasmid. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 92, p. 71-82, 2001.

STADLER, K. *et al.* Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 71, n. 11, p. 8475-8481, 1997.

SUMIYOSHI, H.; HOKE, C. H.; TRENT, D. W. Infectious Japanese encephalitis virus RNA can be synthesized from in vitro-ligated cDNA templates. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 66, n. 9, p. 5425-5431, 1992.

SUN, W. *et al.* Protection of rhesus monkeys against dengue virus challenge after tetravalent live attenuated dengue virus vaccination. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 193, p. 1658-1665, 2006.

SUN, W. *et al.* Vaccination of human volunteers with monovalent and tetravalent live-attenuated dengue vaccine candidates. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 69, Suppl. 6, p. 24-31, 2003.

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

TAJIMA, S. *et al.* Nineteen nucleotides in the variable region of 3' non-translated region are dispensable for the replication of dengue type 1 virus in vitro. **Virus Research**, Amsterdam, v. 116, p. 38-44, 2006.

THOISY, B. DE; DUSSART, P.; KASANJI, M. Wild terrestrial rainforest mammals as potential reservoirs for flaviviruses (yellow fever, dengue 2 and St. Louis encephalitis viruses) in French Guiana. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 98, n. 7, p. 409-412, 2004.

VALDÉS, K. *et al.* Human dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 7, n. 5, p. 856-857, 2000.

VAN DER MOST, R. G.; CORVER, J.; STRAUSS, J. H. Mutagenesis of the RGD motif in the yellow fever virus 17D envelope protein. **Virology**, New York, v. 265, p. 83-95, 1999.

VARNAVSKI, A. N.; KHROMYKH, A. Noncytotoxic flavivirus replicon RNA-based system for expression and delivery of heterologous genes. **Virology**, New York, v. 255, n. 2, p. 366-375, 1999.

VILLORDO, S. M.; GAMARNIK, A. V. Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. **Virus Research**, Amsterdam, v. 139, n. 2, p. 230-239, 2009.

VLAYCHEVA, L. A. *et al.* Yellow fever 17D virus: pseudo-revertant suppression of defective virus penetration and spread by mutations in domains II and III of the E protein. **Virology**, New York, v. 327, n. 1, p. 41-49, 2004.

WATTS, D. M. *et al.* Failure of secondary infection with american genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. **The Lancet**, London, v. 354, p. 1431-1434, 1999.

WESTAWAY, E. G.; MACKENZIE, J. M.; KHROMYKH, A. A. Kunjin RNA replication and applications of Kunjin replicons. **Advances in virus Research**, New York, v. 59, p. 99-140, 2003.

WIDMAN, D. G. *et al.* Construction and characterization of a second-generation pseudoinfectious West Nile virus vaccine propagated using a new cultivation system. **Vaccine**, Amsterdam, v. 26, p. 2762-2771, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. DengueNet database and geographic information system. Disponível em: <http://www.who.int/globalatlas/autologin/denguenet_login.asp>. Acesso em: 05/02/2009a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control**. 2nd ed. Geneva: World Health Organization, 1997. 84p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Impact of dengue. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html>>. Acesso em: 05/02/2009b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Vector distribution and bioecology. Disponível em: <http://www.searo.who.int/LinkFiles/Dengue_chap-7.pdf>. Acesso em: 05/02/2009c.

YAMSHCHIKOV, V. *et al.* An infectious clone of the West Nile flavivirus. **Virology**, New York, v. 281, p. 294-304, 2001.

YAMSHCHIKOV, V.; MISHIN, V.; COMINELLI, F. A new strategy in design of (+)RNA virus infectious clones enabling their stable propagation in *E. coli*. **Virology**, New York, v. 281, p. 272-280, 2001.

YOSHII, K; HOLBROOK, M. R. Sub-genomic replicon and virus-like particles of Omsk hemorrhagic fever virus. **Archives of Virology**, Wien, v. 154, p. 573-580, 2009.

YUN, S. *et al.* Development and application of a reverse genetics system for Japanese encephalitis virus. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 77, n. 11, p. 6450-6465, 2003.

YUN, S. *et al.* Engineering the Japanese encephalitis virus RNA genome for the expression of foreign genes of various sizes: Implications for packaging capacity and RNA replication efficiency. **Journal of Neurovirology**, London, v. 13, n. 6, p. 522-535, 2007.

ZHANG, F. *et al.* Amplification and cloning of the full-length genome of Japanese encephalitis virus by a novel long RT-PCR protocol in a cosmid vector. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 96, p. 171-182, 2001.

ZHAO, Z. *et al.* Characterization of the E-138 (Glu/Lys) mutation in Japanese encephalitis virus by using a stable, full-length, infectious cDNA clone. **Journal of General Virology**, London, v. 86, p. 2209-2220, 2005.

APÊNDICE A

SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Nome	Sequência 5' → 3'
D1 Lanciotti	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG
D2 Lanciotti	ATTGCACCAGCAGTCAACGTCATCTGGTTC
TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC
Den3prM5'	CGGGATCCATCAACAAACGAAAAAGACATCG
Den3E3'	GGGGCGCCCATCTTCCCAATCGAGCTTCC
Den3E5'EcoRI	GCGAATTCATGAGATGTGTGGGA
Den3prM3'EcoRI	GGAATTCTGGGTGCCTTAAGGGCCCA
D3.1 +	AGTTGTTAATCTACGTGGACCG
D3.2 -	CCCGTTGATTCAACAGCACCATTCC
D3.3 -	GTGGTTGATGCCTGAGGTG
D3.4 +	CACCGTCATCATCACAGTGC
D3.5 -	CAGCTTGACCACAGCTCCC
D3.6 -	CCACCTTTCCACTTCCCGC
D3.7 +	GGAGTTCTCTTGACTTGG
D3.8 +	GGGAGAAGACGGTTGCTGG
D3.9 -	GGGTACGTCCCATAGAACGCCGG
D3.10 +	CATGGGAGGAAGAGGCTGAGC
D3.11 -	GCGGCTGCCTCTCCATTCC
D3.12 +	CCCAGCCAGTATAGCGGCTAGAGGG
D3.13 -	GTCCAGGCTGATGCTGGGTGC
D3.14 +	GCAGAGAACCCCCAAG
D3.15 -	GTCACCATGGGCACCACATCCC
D3.16 +	GCCACAGGCTCAGCCTCCTCC
D3.17 -	CGTCCTGGGGTCTGCAGGG
D3.18 +	GGAAACCAAAGGAGTGGAGAGG
D3.19 -	GGCGGCTGACTTCTCCC
D3.20 +	CACGGGCCAGCCTCTC
D3.21 -	GCGCTACCTCTGGACACGGCATG
D3.22 +	GGAATCACTGAAGTGGATAG
D3.23 -	CCGTGCCTGTTGGAGTCGGTCCG
D3.24 +	CCAACAGGTGAGAAGCCTC
D3.25 -	CCAAATGGCTCCCTCCGACTCC
D3.26 -	GCTTTCTTCCACTGTTGGGCTTGG
D3.27 -	CTTCCCAGGTGATCCTTCCCAGAG
D3.28 +	GGAAGAGTGCCTTACACCTAGCCC
D3.29 -	GCAATTGCTCCTATTTCCCCTG
D3.30 +	GGAGTTGGGCTGGCTATGGCAACAACG
D3.31 -	GTCGGCATGTACGGCCCTCTCATCC
D3.32 +	GCGTCGGCTATAGTCCTGG
D3.33 +	GCCGTAGAGCCTGGG
D3.34 +	CTGGGCAAGTGTGGAAGC
D3.35 -	GAGCCCCAGAGCGATTCC
D3.36 +	GACGGGCCGAACACACCGGAG
D3.37 +	AAGTGTGACACCCTGTTGTGTGAC
D3.38 -	AGA ACCTGTTGATTCAACAGCACCATTCC
D3.39 +	AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAG
D3.40 +	CTGAACCACATATTGTGGG
D3.41 -	GCCCCCGGCCACCAATGG
D3.42 -	TCTTGGGTGATCACTCTATCTGCTTT
D3.43 -	CACTGGGTTGGCTGTAATCAGTCTGC

D3.44 +	GAGGAAAATCCCTACTTTTTAAGACAGCCTCT
D3.45 +	GAGGGGCAGTGTTGACATATAATGGG
D3.46 +	CGGGAAAAGGTCATTCAACTTAGTAGG
D3.47 -	TTCTCTCTCTTGCCCATCATGTTGTAAAC
D3.48 -	TGTCCAGGTATGGACCTCGTTGGTGAC
U21 (pAC sense)	TCCCCGAAAAGTGCCACC
U22 (pAC antisense)	CAAGGGGTGTTATGAGCC
U223 (pBelo senseSeq)	CAGGTGCTGAAAGCGAGC
U224 (pBelo antiseq)	AGGCAGTTATTGGTGCCC
U447	TTAACGTAGTGCTAACAG
U448	TTGGATGCTAGTCTGAGG
U449 (<i>Mlu</i> I)	CTGAAACGCGTGAAAAACACATCCATGTCATTTTCATGC

APÊNDICE B

ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DO CLONE DO REPLICON COM A DA CEPA VIRAL BR DEN3 290-02

BLAST Replicon BR DEN3 290-02 Clone 1 x BR DEN3 290-02

Replicon	121	AAAAACACATCCATGTCATTTTCATGCAATAGGAATCATTACACTCTATCTGGGA	180
BRD3/290	2339	2398
Replicon	181	GCTGTGGTCAAGCTGACATGGGATGTGTATAAACTGGAAAGGCAAAGAACTCAAATGT	240
BRD3/290	2399	2458
Replicon	241	GGAAGTGGAACTCTTCGTCACCAACGAGGTCCATACCTGGACAGAGCAATACAAATTC	300
BRD3/290	2459	2518
Replicon	301	GCAGACTCCCCAAAAGATTGGCGACAGCCATTGCAGGCGCTTGGGAGAATGGAGTGTGC	360
BRD3/290	2519	2578
Replicon	361	GGAATTAGGTCAACAACCCAGAATGGAGAATCTCCTGTGGAGCAAATAGCCAATGAACTG	420
BRD3/290	2579	2638
Replicon	421	AACCACATATTGTGGGAAAACAATATCAAATTAACGGTAGTTGTGGGCGATATAATTGGG	480
BRD3/290	2639	2698
Replicon	481	GTCTTAGAGCAAGGAAAAAGAACACTAACACCACAACCCATGGAGCTAAAATACTCATGG	540
BRD3/290	2699	2758
Replicon	541	AAAACGTGGGAAAGGCAAATAAGTGACAGCTGAAACACAAAATTCCTCTTCATAATA	600
BRD3/290	2759	2818
Replicon	601	GACGGGCCGAACACACCCGGAGTGTCCAAGTGCCTCAAGAGCATGGAATGTGTGGGAGGTG	660
BRD3/290	2819	2878
Replicon	661	GAAGATTACGGGTTTCGAGTCTTCACAACCAACATATGGCTGAAACTCCGAGAGGTGTAC	720
BRD3/290	2879	2938
Replicon	721	ACCCAATAATGTGACCATAGGCTAATGTCCGAGCTGTCAAGGATGAGAGGGCCGTACAT	780
BRD3/290	2939	2998
Replicon	781	GCCGACATGGGCTATTGGATAGAAAGCCAAAAGAATGGAAGTTGGAAGCTAGAAAAGCA	840
BRD3/290	2999	3058
Replicon	841	TCCCTCATAGAGGTGAAAACCTGCACATGGCCAAAATCACATACCCTTTGGAGTAATGGT	900
BRD3/290	3059	3118
Replicon	901	GTGCTAGAGAGTGATATGATCATCCCAAAGAGTCTAGCTGGTCTATTTTCGCAACACAAC	960
BRD3/290	3119	3178
Replicon	961	CACAGGCCCGGTTACCACACCCAGACGGCGGACCTGGCATTTAGGAAAATTAGAGCTG	1020
BRD3/290	3179	3238
Replicon	1021	GACTTCAACTATTGTGAAGGAACAACAGTTGTATCACAGAAAACGTGGGACAAGAGGC	1080
BRD3/290	3239	3298
Replicon	1081	CCATCATTGAGAACAACAACAGTGTCCAGGAAAGTTAATACAGAAATGGTGTGCCGTTCCG	1140
BRD3/290	3299	3358
Replicon	1141	TGCACACTCCTCCCTTGCATATGCGGAGAAGACGGTTGCTGGTATGGCATGGAAATC	1200
BRD3/290	3359	3418
Replicon	1201	AGACCCATCAGTGAGAAAGAAGAAAACATGGTAAAGTCTTTAGTCTCAGCGGGAAGTGA	1260
BRD3/290	3419	3478
Replicon	1261	AAGGTGGACAACCTTCACAATGGGTGTCTTGTGTTTGGCAATCCTCTTTGAAGAGGTGATG	1320
BRD3/290	3479	3538
Replicon	1321	AGAGGAAAATTTGGGAAGAAAACACATGATTGCGGGGGTGTCTTTCACGTTTGTGCTCCTT	1380
BRD3/290	3539	3598
Replicon	1381	CTCTCAGGGCAAATAACATGGAGAGACATGGCGCACACACTAATAATGATTGGGTCCAAC	1440
BRD3/290	3599	3658
Replicon	1441	GCATCTGACAGGATGGGAATGGGCGTTACCTACCTAGCTTTAATTGCAACATTTAAAATC	1500
BRD3/290	3659	3718
Replicon	1501	CAGCCATTCTTGGCTTTGGGATTTTCTTAAGAAAACGTGACATCCAGAGAAAATTTATTG	1560
BRD3/290	3719	3778
Replicon	1561	TTAGGAGTTGGGCTGGCTATGGCAACAACGTTACAACCTGCCAGAGGACATTGAAACAAATG	1620
BRD3/290	3779	3838
Replicon	1621	GCAAATGGAATCGCTCTGGGGCTCATGGCTCTTAAACTGATAACACAATTTGAAACATAC	1680
BRD3/290	3839	3898
Replicon	1681	CAATTATGGACAGCATTAACTCTCTTAACGTGTTCAAATACAATGTTTACGTTGACTGTT	1740
BRD3/290	3899	3958
Replicon	1741	GCCTGGAGAACAGCCACCCTGATTTTGGCGGAGTTTCGCTTTTACCAGTGTGCCAGTCT	1800
BRD3/290	3959	4018
Replicon	1801	TCGAGCATGAGGAAAACAGACTGGCTTCCAATGGCAGTGGCAGCTATGGGAGTTCCACCT	1860
BRD3/290	4019	4078

Replicon	1861	CTACCACTTTTTATTTTTAGCTTGAAAGACACACTCAAAAAGGAGAAGCTGGCCACTGAAT	1920
BRD3/290	4079	4138
Replicon	1921	GAAGGGGTGATGGCTGTTGGGCTTGTGAGCATTCTGGCCAGTTCTCTCCTAGAAATGAT	1980
BRD3/290	4139	4198
Replicon	1981	GTACCCATGGCTGGACCATTGGTGGCCGGGGCTTGCTGATAGCGTGCTACGTCATAACT	2040
BRD3/290	4199	4258
Replicon	2041	GGCAGCTCAGCAGACCTCACCGTAGAAAAAGCAGCAGATATAACATGGGAGGAAGAGGCT	2100
BRD3/290	4259	4318
Replicon	2101	GAGCAAACAGGAGTGTCCACAACCTTAATGATCACAGTTGATGATGATGGAACAATGAGA	2160
BRD3/290	4319	4378
Replicon	2161	ATAAAAGATGATGAGACTGAGAATATCCTAACAGTGCTTTTGAAAAACAGCATTACTAATA	2220
BRD3/290	4379	4438
Replicon	2221	GTATCAGGAGTCTTTCCATACTCCATAACCCGCAACATTGCTGGTCTGGCATACTTGGCAA	2280
BRD3/290	4439	4498
Replicon	2281	AAGCAAACCCAAAGATCCGGCGTCTATGGGACGTACCCAGCCCCCAGAGACACAGAAA	2340
BRD3/290	4499	4558
Replicon	2341	GCAGAACTGGAAGAAGGGGTCTATAGGATCAAACAGCAAGGAATTTTGGGAAAACCCAA	2400
BRD3/290	4559	4618
Replicon	2401	GTAGGGTTGGAGTACAGAAGGAAGGAGTCTTCCACACCATGTGGCACGTTACAAGAGGG	2460
BRD3/290	4619	4678
Replicon	2461	GCAGTGTGACATATAATGGGAAAAGACTGGAACCAAACCTGGGCTAGCGTGAAAAAAGAT	2520
BRD3/290	4679	4738
Replicon	2521	CTGATTTTCATACGGAGGAGGATGGAGATTGAGCGCACAATGGCAAAGGGGGAGGAGTG	2580
BRD3/290	4739	4798
Replicon	2581	CAGTTATTGCCGTAGAGCCTGGGAAGAACCCAAAGAACCTTCAAACCATGCCAGGCAC	2640
BRD3/290	4799	4858
Replicon	2641	TTTCAGACTACAACAGGGGAAATAGGAGCAATTGCACTGGATTTCAAGCCTGGAACCTCA	2700
BRD3/290	4859	4918
Replicon	2701	GGATCTCCCATCATAAACAGAGAGGGAAAGGTAGTGGGACTGTATGGCAATGGAGTGGTT	2760
BRD3/290	4919	4978
Replicon	2761	ACAAAGAATGGTGGCTACGTCAGCGGAATAGCGCAAACGAATGCAGAACCAGATGGACCG	2820
BRD3/290	4979	5038
Replicon	2821	ACACCAGAATTGGAAGAAGAGATGTTCAAAAAGCGAAATCTAACCATAAATGGATCTTCAT	2880
BRD3/290	5039	5098
Replicon	2881	CCTGGGTCCAGGAAAGACACGGAAATACCTTCCAGCTATTGTTAGAGAGGCAATCAAGAGA	2940
BRD3/290	5099	5158
Replicon	2941	CGTTAAGAACTCTAATTTTGGCACCCGACAAGGGTGGTTGCAGCTGAGATGGAAGAAGCA	3000
BRD3/290	5159	5218
Replicon	3001	TTGAAAGGGCTCCCAATAAGGTACCAAACACAGCAACAAAATCTGAACACACAGGAAGA	3060
BRD3/290	5219	5278
Replicon	3061	GAGATTGTTGATCTAATGTGCCACGCAACGTTCACAATGCGTCTGCTGTACCAGTTAGG	3120
BRD3/290	5279	5338
Replicon	3121	GTTCCAAACTATAACTTGATAATAATGGATGAAGCCATTTACAGACCCAGCCAGTATA	3180
BRD3/290	5339	5398
Replicon	3181	GCGGCTAGAGGGTACATATCGACTCGTGTGGAAATGGGAGAGGCAGCCGAATTTTCATG	3240
BRD3/290	5399	5458
Replicon	3241	ACAGCAACGCCCTGGAACAGCTGATGCCTTTCCTCAGAGCAACGCTCCAATTCAAGAT	3300
BRD3/290	5459	5518
Replicon	3301	GAAGAAAGGGACATACCAGAACGTCATGGAATTGAGGCAATGAATGGATAACCGACTTC	3360
BRD3/290	5519	5578
Replicon	3361	GCTGGGAAAACGGTGTGGTTTGTCCCCAGCATTAAAGCCGGAATGACATAGCAAACCTGC	3420
BRD3/290	5579	5638
Replicon	3421	TTGCGAAAAAACGGGAAAAAGGTCATTCAACTTAGTAGGAAGACTTTTGACACAGAATAT	3480
BRD3/290	5639	5698
Replicon	3481	CAGAAACTAAACTGAATGATTGGGACTTCGTGGTGACAACTGACATTTAGAAATGGGG	3540
BRD3/290	5699	5758
Replicon	3541	GCCAAATTTCAAAGCAGATAGAGTGATCGACCCAAGAAGATGTCTCAAACAGTGATCCTG	3600
BRD3/290	5759	5818
Replicon	3601	ACAGATGGACCAGAGCGGGTGATCCTGGCTGGACCAATGCCAGTCAACCGGCGAGTGCT	3660
BRD3/290	5819	5878
Replicon	3661	GCGCAAAGGAGAGGGAGAGTTGGCAGGAACCCACAAAAGAAAATGACCAGTACATATTC	3720
BRD3/290	5879	5938
Replicon	3721	ACGGGCCAGCCTCTCAACAATGATGAAGACCATGCTCACTGGACAGAAGCAAAAATGCTG	3780
BRD3/290	5939	5998
Replicon	3781	CTGGACAACATTAATACACCAGAAGGGATCATACCAGCTCTCTTTGAGCCAGAAAGGGAG	3840
BRD3/290	5999	6058
Replicon	3841	AAGTCAGCCGCATAGACGGTGAGTATCGCTTGAAAGGTGAGTCCAGGAAGACTTTCTGTG	3900
BRD3/290	6059	6118

Replicon	3901	GAACTCATGAGGAGGGGTGACCTTCCAGTCTGGTTAGCCATAAAGTAGCATCAGAAGGG	3960
BRD3/290	6119	6178
Replicon	3961	ATCAAATATACAGATAGAAAATGGTGCTTCGATGGACAACGTAATAATCAAATTTTAGAG	4020
BRD3/290	6179	6238
Replicon	4021	GAGAACATGGATGTGAAAATCTGGACAAAGGAGAGAAAAGAAAAAATTGAGACCTAGG	4080
BRD3/290	6239	6298
Replicon	4081	TGGCTTGATGCCCCGCACTTATTAGATCCCTTAGCACTCAAGGAATCAAGGACTTTGCG	4140
BRD3/290	6299	6358
Replicon	4141	GCTGGCAGAAAAGTCAATCGCCCTTGATCTTGTGACAGAAATAGGAAGAGTGCCTTCACAC	4200
BRD3/290	6359	6418
Replicon	4201	CTAGCCCATAGAACGAGAAACGCTCTGGACAATCTGGTGATGCTGCATACATCAGAACAT	4260
BRD3/290	6419	6478
Replicon	4261	GGCGGTAGGGCCTACAGGCATGCGGTGGAGGAACACCAGAGACAATGGAAACACTCCTA	4320
BRD3/290	6479	6538
Replicon	4321	CTCTGGGACTCATGATCTTGTGACAGGTGGAGCAATGCTTTTCTTAATATCAGTAAA	4380
BRD3/290	6539	6598
Replicon	4381	GGGATTGGAAGACTTCAATAGGACTCATTTGTGTAATTGCTTCCAGCGGCATGTTGTGG	4440
BRD3/290	6599	6658
Replicon	4441	ATGGCCGAAATCCCACTCCAATGGATCGCGTGGCTATAGTCTGGAGTTTTTTATGATG	4500
BRD3/290	6659	6718
Replicon	4501	GTGTGCTTATACCAGAACCAGAAAAGCAGAGAACCCCCAAGACAACCAACTCGCATAT	4560
BRD3/290	6719	6778
Replicon	4561	GTCGTGATAGGCATACTTACATTGGCTGCAATAATAGCAGCTAATGAAATGGGATTGTTG	4620
BRD3/290	6779	6838
Replicon	4621	GAAACTACAAAGAGAGATTAGGAATGTCTAAGGAGCCAGGTGTTGTCTCTCCAACCAGC	4680
BRD3/290	6839	6898
Replicon	4681	TATTTAGATGTGGACTTGCACCCAGCATCAGCCTGGACATTGTACGCCGTGGCCACTACA	4740
BRD3/290	6899	6958
Replicon	4741	GTAATAACACCAATGTTAAGACATACCATAGAGAATTTCTACAGCAAATGTGTCTCTGGCA	4800
BRD3/290	6959	7018
Replicon	4801	GCTATAGCCAACCAGGCAGTGGTCTGATGGGTTTGGACAAAGGATGGCCAATATCAAAA	4860
BRD3/290	7019	7078
Replicon	4861	ATGGACTTAGGAGTACCCCTACTGGCATTGGGTTGCTATTACAAAGTGAACCCACTGACT	4920
BRD3/290	7079	7138
Replicon	4921	CTAACAGCGGCAGTACTCTTGCTGATCACACATTATGCTATCATAGGTCCAGGATTGCAG	4980
BRD3/290	7139	7198
Replicon	4981	GCAAAAGCCACTCGCGAAGCTCAGAAAAGACAGCTGCTGGAATAATGAAGAATCCAACG	5040
BRD3/290	7199	7258
Replicon	5041	GTGGATGGGATAATGACAATAGACCTAGATCCTGTAATATATGATTCAAAATTTGAAAAG	5100
BRD3/290	7259	7318
Replicon	5101	CAACTGGGACAGGTTATGCTCCTGTTTTGTGTGCAATTCAACTTTTGTTAATGAGAACA	5160
BRD3/290	7319	7378
Replicon	5161	TCATGGGCCTTGTGTGAAGCTTTAACTCTAGCTACAGGACCAATAACAACACTCTGGGAA	5220
BRD3/290	7379	7438
Replicon	5221	GGATCACCTGGGAAGTTTTGGAACACCACGATAGCTGTTTCCATGGCGAACATTTTTAGA	5280
BRD3/290	7439	7498
Replicon	5281	GGGAGCTATTTAGCAGGAGCTGGGCTTGCTTTTTCTATTATGAAATCAGTTGGAACAGGA	5340
BRD3/290	7499	7558
Replicon	5341	AAAAGAGGAACAGGCTCACAAGGTGAAACTTTAGGAGAAAAATGGAAAAAGAAATTAAT	5400
BRD3/290	7559	7618
Replicon	5401	CAATTATCCCGAAAAGAGTTTGACCTTTACAAGAAATCTGGAATCACTGAAGTGGATAGA	5460
BRD3/290	7619	7678
Replicon	5461	ACAGAAGCCAAAGAAGGGTTGAAAAGAGGAGAAATAACACATCATGCCGTGCCAGAGGT	5520
BRD3/290	7679	7738
Replicon	5521	AGCGCAAAACTTCAATGGTTTGTGGAGAGAAACATGGTCATTTCCGAAGGAAGAGTCATA	5580
BRD3/290	7739	7798
Replicon	5581	GACTTGGGCTGTGGAAGAGGAGGCTGGTCATATTACTGTGCAGGACTGAAAAAGTCACA	5640
BRD3/290	7799	7858
Replicon	5641	GAAGTGCGGGGATACACAAAAGCGGTCCAGGACACGAAGAACCAGTACCTATGTCCACA	5700
BRD3/290	7859 A	7918
Replicon	5701	TATGGATGGAACATAGTTAAGTTAATGAGTGGAAAGGATGTGTTTTATCTTCCACCTGAA	5760
BRD3/290	7919	7978
Replicon	5761	AAGTGTGACACCCTGTTGTGTGACATTGGAGAATCTTACCAAGCCCAACAGTGGAAAGAA	5820
BRD3/290	7979	8038
Replicon	5821	AGCAGAACTATAAGAGTTTTGAAGATGGTTGAACCATGGCTAAAGAACAACCAATTTGTC	5880
BRD3/290	8039	8098
Replicon	5881	ATTAAGTATTGAACCCTTACATGCCAATGTGATTGAGCACCTAGAAAGACTACAAGG	5940
BRD3/290	8099	8158

Replicon	5941	AAACATGGAGGAATGCTTGTGAGAAATCCACTTTCACGAAACTCCACGCACGAAATGTAC	6000
BRD3/290	8159	8218
Replicon	6001	TGGATATCTAATGGCACAGGTAACATTGTGCGCTTCAGTCAATATGGTATCTAGACTGCTA	6060
BRD3/290	8219	8278
Replicon	6061	CTGAACAGGTTTACGATGACACACAGAAGACCCACCATTGAGAAAAGATGTGGATTAGGA	6120
BRD3/290	8279	8338
Replicon	6121	GCAGGAACTCGACATGTTAATGCGGAACCCAGAAACCCCAACATGGATGTCATTGGGGAA	6180
BRD3/290	8339	8398
Replicon	6181	AGAATAAAAAGGATCAAGGAGGAGCATAATTCAACATGGCACTATGATGACGAAAACCCC	6240
BRD3/290	8399	8458
Replicon	6241	TACAAAACGTGGGCTTACCATGGATCTTATGAAGTCAAAGCCACAGGCTCAGCCTCCTCC	6300
BRD3/290	8459	8518
Replicon	6301	ATGATAAATGGAGTCGTGAAACTCCTCACTAAACCATGGGATGTGGTGCCCATGGTGACA	6360
BRD3/290	8519	8578
Replicon	6361	CAGATGGCAATGACAGATACAACCTCCATTGGCCAGCAGAGAGTCTTTAAAGAGAAAGTG	6420
BRD3/290	8579	8638
Replicon	6421	GACACCAGGACACCAGGTCCATGCCAGGAACAAGAAGGGTCATGGGGATCACAGCGGAG	6480
BRD3/290	8639	8698
Replicon	6481	TGGCTCTGGAGAACCCTGGGAAGGAACAAAAACCCAGGTTATGCACAAGGGAAGAGTTC	6540
BRD3/290	8699	8758
Replicon	6541	ACAAAAAAGGTCAGAACTAACGCAGCCATGGGCGCCGTTTTTCACAGAGGAGAACCAATGG	6600
BRD3/290	8759	8818
Replicon	6601	GACAGCGCGAAAGCTGCTGTTGAGGATGAGGATTTTTGGAACTAGTGGACAGAGAACGT	6660
BRD3/290	8819	8878
Replicon	6661	GAATCCACAAACTGGGCAAGTGTGAAGCTGTGTTTACAACATGATGGGCAAGAGAGAG	6720
BRD3/290	8879	8938
Replicon	6721	AAGAACTTGGAGAGTTTGGCAAAGCAAAAGGCAGTAGAGCTATATGGTACATGTGGTTG	6780
BRD3/290	8939	8998
Replicon	6781	GGAGCCAGGTACCTTGAGTTCGAAGCCCTTGGATTCTTAAATGAAGACCCTGGTTCTCG	6840
BRD3/290	8999	9058
Replicon	6841	CGTGAGAACTCTTACAGTGGAGTGAAGGAGAAGGACTGCACAAGCTAGGCTATATATTA	6900
BRD3/290	9059	9118
Replicon	6901	AGGGACATTTCCAAGATACCCGGAGGAGCTATGTATGCTGATGACACAGCTGGTTGGGAC	6960
BRD3/290	9119	9178
Replicon	6961	ACAAGAATAACAGAAGATGACCTGCACAATGAGGAAAAGATCACACAGCAAATGGACCCT	7020
BRD3/290	9179	9238
Replicon	7021	GAACACAGGCAGTTAGCGAACGCTATATTTAAGCTCACATACAAAACAAAGTGGTCAAA	7080
BRD3/290	9239	9298
Replicon	7081	GTTCACACGCCACTCCAACAGGCACGGTAATGGACATCATATCTAGGAAAAGACCAAAGA	7140
BRD3/290	9299	9358
Replicon	7141	GGCAGTGGACAGGTAGGAACTTATGGTCTGAATACATTCACCAACATGGAAGCCCAGTTA	7200
BRD3/290	9359	9418
Replicon	7201	ATCAGACAAATGGAAGGAGAAGGTGTGCTGTCAAAGGCAGACCTCGAGAACCCTCATCTG	7260
BRD3/290	9419	9478
Replicon	7261	CCAGAGAAGAAAATTACACAATGGTTGGAACCAAAGGAGTGGAGAGGTTAAAAAGAATG	7320
BRD3/290	9479	9538
Replicon	7321	GCCATTAGCGGGGATGATTGCGTAGTGAAACCAATCGATGACAGGTTTCGCTAATGCCCTG	7380
BRD3/290	9539	9598
Replicon	7381	CTCGCTCTGAACGATATGGGAAAGGTTCCGAAAAGACATACCTCAATGGCAGCCATCAAAG	7440
BRD3/290	9599	9658
Replicon	7441	GGATGGCATGATTGGCAACAGGTTCTTTTCTGCTCCCACCACTTTCATGAATTGATCATG	7500
BRD3/290	9659	9718
Replicon	7501	AAAGATGGAAGAAAGTTGGTGGTTCCCTGCAGACCCAGGACGAACTAATAGGAAGAGCA	7560
BRD3/290	9719	9778
Replicon	7561	AGAATCTCTCAAGGAGCGGGATGGAGCCTTAGAGAAAACCCATGTCTGGGGAAGCCTAC	7620
BRD3/290	9779	9838
Replicon	7621	GCTCAAATGTGGAGTCTCATGTATTTTACAGAAGAGACCTCAGACTAGCATCCAA	7676
BRD3/290	9839	9894

ANEXO A

SEQUÊNCIAS DOS VETORES

>pGEM-T-easy

GGGCGAATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGG
GAATTCGATATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTGCACCATATGGGA
GAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTATAGTGTACCTAAATAG
CTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACA
ATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAA
TGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCG
GGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGG
CGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTC
GGTCGTTCCGGCTGCGGGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGT
TATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAG
CAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCT
CCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAA
ACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTG
CGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCT
TCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTG
TAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTCCAGCCGA
CCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGA
CTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATG
TAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAA
GAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAG
TTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTG
TTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGA
TCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTT
TGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGA
AGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATG
CTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTCCATCCATAGTT
GCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGG
CCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT
CAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACT
TTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTT
CGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGT
CACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGC
GAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTC
CGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAG
CACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGG
TGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTC
TTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGT
GCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCT
GTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATC
TTTTACTTTACCCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGC
AAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTTTCCTTTTT
CAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGA
ATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTG

CCACCTGATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCAT
 CAGGAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTTGTAAAT
 CAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAATCCCTTATAAATCAAAA
 GAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTA
 TAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAACCGTCTATCAGGGCGAT
 GGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGT
 AAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGG
 AAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGC
 GCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCG
 CCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCA
 ACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCG
 AAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCA
 GTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATA

>#49pAC

TAATACGACTCACTATAGAGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAGAACAGTTTCG
 ACTCGGAAGCTTGCTTAACGTAGTGCTAACAGTTTTTTATTAGAGAGCAGATCTC
 TGATGAACAACCAACGGAAGAAGACGGGAAAACCGTCTATCAATATGCTGAAAC
 GCGTGACCTCGAGGTCCTTAAGCTGCCCGGGCAGGCTAGCCAGCCTAGGGAC
 GCATGCCAGTCGCGAGACGATATCGACATCGATGACAGGTTTCGCTAATGCCCT
 GCTCGCTCTGAACGATATGGGAAAGGTTTCGGAAAGACATACTCAATGGCAGC
 CATCAAAGGGATGGCATGATTGGCAACAGGTTCCCTTTCTGCTCCCACCACTTTC
 ATGAATTGATCATGAAAGATGGAAGAAAGTTGGTGGTCCCTGCAGACCCCAGG
 ACGAACTAATAGGAAGAGCAAGAATCTCTCAAGGAGCGGGATGGAGCCTTAGA
 GAAACCGCATGTCTGGGGAAAGCCTACGCTCAAATGTGGAGTCTCATGATTTT
 CACAGAAGAGACCTCAGACTAGCATCCAACGCCATATGTTTCAGCAGTACCAGTC
 CACTGGGTCCCCACAAGTAGAACGACATGGTCTATTTCATGCTCACCATCAGTGG
 ATGACCACAGAAGACATGCTTACTGTCTGGAACAGGGTGTGGATCGAGGACAAT
 CCATGGATGGAAGACAAAACCTCCAGTCACAACCTGGGAAAATGTTCCATATCTA
 GGAAGAGAGAAGACCAATGGTGCAGGATCACTTATTGGTCTCACTTCCAGAGCA
 ACCTGGGCCCAGAACATACCCACAGCAATTCAACAGGTGAGAAGCCTTATAGGC
 AATGAAGAGTTTCTGGACTACATGCCTTCAATGAAGAGATTTAGGAAGGAGGAG
 GAGTCGGAGGGAGCCATTTGGTAAACGTAGGAAGTGAAAAGAGGTTAACTGT
 CAGGCCACATTAAGCCACAGTACGGAAGAAGCTGTGCTGCCTGTGAGCCCCGT
 CCAAGGACGTTAAAAGAAGAAGTCAGGCCCCAAAGCCACGGTTTGAGCAAACC
 GTGCTGCCTGTATCTCCGTGCTGGGGACGTAAAACCTGGGAGGCTGCAAACCTG
 TGGAAGCTGTACGCACGGTGTAGCAGACTAGCGGTTAGAGGAGACCCCTCCCA
 TGACACAACGCAGCAGCGGGGCCGAGCACTGAGGGAAGCTGTACCTCCTTGC
 AAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCCGCAAACAAAACAGCATATTGACG
 CTGGGAGAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTCAGCATCATTCCAGGCACAGAA
 CGCCAGAAAATGGAATGGTGTGTTGAATCAACAGGTTCTGGCCGGCATGGTC
 CCAGCCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGGCAACATTCCGAGGGGACCGTCCCCT
 CGGTAATGGCGAATGGGACGGGATTTAAATCTAGAGCAAGACGTTTCCCGTTGA
 ATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGT
 TCATGATGATATTTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGGAGACAAA
 CGTGGCTTTGTTGAATAAATCGAACTTTTGTGAGTTGAAGGATCAGATCACGCA
 TCTTCCCGACAACGCAGACCGTTCCGTGGCAAAGCAAAGTTCAAATCACCAA
 CTGGTCCACCTACAACAAAGCTCTCATCAACCGTGGCTCCCTCACTTTCTGGCT
 GGATGATGGGGCGATTCAGGCCTGGTATGAGTCAGCAACACCTTCTTCACGAG
 GCAGACCTCAGCGCTAGCGGAGTGTATACTGGCTTACTATGTTGGCACTGATGA

GGGTGTCAGTGAAGTGCTTCATGTGGCAGGAGAAAAAAGGCTGCACCGGTGCG
TCAGCAGAATATGTGATACAGGATATATTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTA
CGCTCGGTCGTTGACTGCGGCGAGCGGAAATGGCTTACGAACGGGGCGGAG
ATTTCTGGAAGATGCCAGGAAGATACTTAACAGGGAAGTGAGAGGGCCGCGG
CAAAGCCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACAAGCATCACGAAATCTGAC
GCTCAAATCAGTGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTT
CCCTGGCGGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCTCCTGCCTTTTCGGTTTACCGGTG
CATTCCGCTGTTATGGCCGCGTTTGTCTCATTCCACGCCTGACACTCAGTTCCG
GGTAGGCAGTTCGCTCCAAGCTGGACTGTATGCACGAACCCCCCGTTCAGTCC
GACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGAAAGACAT
GCAAAGCACCCTGGCAGCAGCCACTGGTAATTGATTTAGAGGAGTTAGTCTT
GAAGTCATGCGCCGGTTAAGGCTAAACTGAAAGGACAAGTTTTGGTGACTGCGC
TCCTCCAAGCCAGTTACCTCGGTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGAGAACCCTTCGA
AAAACCGCCCTGCAAGGCGTTTTTTTCGTTTTTCAGAGCAAGAGATTACGCGCAG
ACCAAACGATCTCAAGAAGATCATCTTATTAAGGGGTCTGACGCTCAGTGGAA
CGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACC
TAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAA
ACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCT
GTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGAT
ACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCAC
GCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAG
CGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCC
GGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTGCGCAACGTTGTTGCCA
TTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTACAGCT
CCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAG
CGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGCAAGTGT
TATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGT
AAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGT
ATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCC
ACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAACGTTCTTCGGGGCGAAA
ACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGC
ACCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAA
ACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTG
AATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCT
CATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCG
CGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTGTCGACGCGGATCC

>#50pBAC

TAATACGACTCACTATAGAGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAGAACAGTTTCG
ACTCGGAAGCTTGCTTAACGTAGTGCTAACAGTTTTTTTATTAGAGAGCAGATCTC
TGATGAACAACCAACGGAAGAAGACGGGAAAACCGTCTATCAATATGCTGAAAC
GCGTGACCTCGAGGTCCTTAAGCTGCCCGGGCAGGCTAGCCAGCCTAGGGAC
GCATGCCAGTCGCGAGACGATATCGACATCGATGACAGGTTTCGCTAATGCCCT
GCTCGCTCTGAACGATATGGGAAAGGTTTCGGAAAGACATACCTCAATGGCAGC
CATCAAAGGGATGGCATGATTGGCAACAGGTTCCCTTTCTGCTCCCACCACTTTC
ATGAATTGATCATGAAAGATGGAAGAAAGTTGGTGGTTCCCTGCAGACCCCAGG
ACGAACTAATAGGAAGAGCAAGAATCTCTCAAGGAGCGGGATGGAGCCTTAGA
GAAACCGCATGTCTGGGGAAAGCCTACGCTCAAATGTGGAGTCTCATGATTTT
CACAGAAGAGACCTCAGACTAGCATCCAACGCCATATGTTTCAGCAGTACCAGTC
CACTGGGTCCCCACAAGTAGAACGACATGGTCTATTCATGCTCACCATCAGTGG

ATGACCACAGAAGACATGCTTACTGTCTGGAACAGGGTGTGGATCGAGGACAAT
CCATGGATGGAAGACAAAACCTCCAGTCACAACCTGGGAAAATGTTCCATATCTA
GGGAAGAGAGAAGACCAATGGTGCGGATCACTTATTGGTCTCACTTCCAGAGCA
ACCTGGGCCAGAACATACCCACAGCAATTCAACAGGTGAGAAGCCTTATAGGC
AATGAAGAGTTTCTGGACTACATGCCTTCAATGAAGAGATTTAGGAAGGAGGAG
GAGTCGGAGGGAGCCATTTGGTAAACGTAGGAAGTGAAAAAGAGGTTAACTGT
CAGGCCACATTAAGCCACAGTACGGAAGAAGCTGTGCTGCCTGTGAGCCCCGT
CCAAGGACGTTAAAAGAAGAAGTCAGGCCCAAAGCCACGGTTTGAGCAAACC
GTGCTGCCTGTATCTCCGTGCTGGGGACGTAAAACCTGGGAGGCTGCAAACCTG
TGGAAGCTGTACGCACGGTGTAGCAGACTAGCGTTAGAGGAGACCCCTCCCA
TGACACAACGCAGCAGCGGGGCCGAGCACTGAGGGAAGCTGTACCTCCTTGC
AAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCCGCAAACAAAACAGCATATTGACG
CTGGGAGAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCCTCAGCATCATTCCAGGCACAGAA
CGCCAGAAAATGGAATGGTGTGTTGAATCAACAGGTTCTGGCCGGCATGGTC
CCAGCCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGGCAACATTCCGAGGGGACCGTCCCCT
CGGTAATGGCGAATGGGACGGGATTTAAATCTAGAGCAAGACGTTTCCCGTTGA
ATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGT
TCATGATGATATATTTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAA
CGTGGCTTTGTTGAATAAATCGAACTTTTGTGAGTTGAAGGATCAGATCACGCA
TCTTCCCGACAACGCAGACCGTTCCGTGGCAAAGCAAAGTTCAAATCACCAA
CTGGTCCACCTACAACAAAGCTCTCATCAACCGTGGCTCCCTCACTTTCTGGCT
GGATGATGGGGCGATTACAGGCCTGGTATGAGTCAGCAACACCTTCTTCACGAG
GCAGACCTCAGCGCTAGCGGAGTGTATACTGGCTTACTATGTTGGCACTGATGA
GGGTGTCAGTGAAGTGCTTCATGTGGCAGGAGAAAAAAGGCTGCACCGGTGCG
TCAGCAGAATATGTGATACAGGATATATTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTA
CGCTCGGTGCTTCCGACTGCGGCGAGCGGAAATGGCTTACGAACGGGGCGGAG
ATTTCCCTGGAAGATGCCAGGAAGATACTTAACAGGGAAGTGAGAGGGGCCGCG
CAAAGCCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACAAGCATCACGAAATCTGAC
GCTCAAATCAGTGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTC
CCCTGGCGGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCCTGCCTTTCGGTTTACCGGTGT
CATTCCGCTGTTATGGCCGCGTTTGTCTCATTCCACGCCTGACACTCAGTTCCG
GGTAGGCAGTTCGCTCCAAGCTGGACTGTATGCACGAACCCCCGTTACAGTCC
GACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGAAAGACAT
GCAAAGCACCCTGGCAGCAGCCACTGGTAATTGATTTAGAGGAGTTAGTCTT
GAAGTCATGCGCCGGTTAAGGCTAAACTGAAAGGACAAGTTTTTGGTACTGCGC
TCCTCCAAGCCAGTTACCTCGGTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGAGAACCCTTCGA
AAAACCGCCCTGCAAGGCGGTTTTTTCGTTTTCAGAGCAAGAGATTACGCGCAG
ACCAAACGATCTCAAGAAGATCATCTTATTAAGGGTCTGACGCTCAGTGGAA
CGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACC
TAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAA
ACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCT
GTCTATTTTCGTTTCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGAT
ACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCAC
GCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAG
CGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCC
GGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCA
TTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTGGTATGGCTTCAATCAGCT
CCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAG
CGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGT
TATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCATGCCATCCGT

AAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGT
ATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCC
ACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAA
ACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGC
ACCCAAGTATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAA
ACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTG
AATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCT
CATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCG
CGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTGTGACGCGGATCC

ANEXO B**GENÓTIPO DAS LINHAGENS BACTERIANAS**

Top10: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ^-

Top10F': F'[lacI^q Tn10(tet^R)] mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ^-