

Anaclara Pincelli Cintra

**Múltiplas mutações em peptídeo conservado da proteína E do
Dengue virus: implicações para a biologia do vírus**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao
Curso de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Santa Catarina para obtenção do
Grau de Bacharel e Licenciada em Ciências
Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Santos Mansur

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor

Pincelli Cintra, Anaclara

Múltiplas mutações em peptídeo conservado da proteína E do *Dengue virus*: implicações para a biologia do vírus; orientador, Daniel Santos Mansur – Florianópolis, SC, 2015.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. *Dengue virus*. 2. Proteína E. 3. Conservação evolutiva.
I Mansur, Daniel Santos. II Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III Título.

Anaclara Pincelli Cintra

Múltiplas mutações em peptídeo conservado da proteína E do *Dengue* vírus: implicações para a biologia do vírus

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado e adequado para obtenção do Título de Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas, e aprovado em sua forma final pelo Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 14 de outubro de 2015.

Prof.^a Maria Risoleta Freire Marques,
Dr.^a Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Daniel Santos Mansur
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Carlos Zanetti
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Patrícia Hermes Stoco
Universidade Federal de Santa Catarina

Agradecimentos

Agradeço com carinho meu orientador Professor Daniel Mansur. Obrigada por ter dedicado seu tempo para o meu aprendizado. Com você aprendi biologia e a importância de se ter leveza no dia a dia para lidar com as questões que muitas vezes não saem como o esperado.

À Renata Cristina Fleith por ter possibilitado esse trabalho.

Aos membros da banca, Professora Patrícia Stoco, Professor Carlos Zanetti e Professor Ricardo Mazzon por terem aceitado participar dessa etapa. À Doris Sobral Marques por ter avaliado o projeto deste trabalho.

Agradeço especialmente ao Daniel Patrício por ter dedicado seu tempo me ensinando e discutindo as técnicas mais bonitas do trabalho. Adara Áurea por ter me acolhido e me ajudado com uma porção de dúvidas. Mariana Maraschin, Livia Yamashiro e Carolina Eto, agradeço pelas orientações e pelas conversas de corredor. Stefanny Morales, por toda a ajuda e humor. Jéssica Copetti, Flávia Cardoso, Lorena Ramos e Murilo Delgobo, por terem deixado a vida no LiDI tão gostosa. Ao Daniel Mendes e ao Lucas Mascarin, por terem simplificado a informática. Agradeço a todos os alunos do LiDI; aprendi com cada um de vocês.

Ao professor André Báfica por ter contribuído para meu olhar científico.

Aos alunos e professores do laboratório de Protozoologia, especialmente Professor Mário Steindel, pela disponibilidade de equipamentos e atenção. À Laís Yamanaka por ter discutido as técnicas envolvendo RNA.

Agradeço ao professor Aguinaldo Pinto por ter me apresentado a Imunologia e por ter me ajudado a entrar em laboratórios que foram importantes para a minha trajetória.

Ao professor Paulo Simões por todas as alegriazinhas e por ter me ensinado tanto das belezas e das coisas da vida. Às professoras Maria Risoleta Freire Marques e Margherita Barracco por terem me apresentado a vida em sua forma pequena.

Agradeço com toda a ternura às minhas alegrias da biologia: Marina Bacha, Camila Claudino, Malu Rocha, Júlia Côrrea, Sarah Samuel, Ariana Sarmiento, Adriana Palau, Fernanda Linhares, Jéssica Niehues, Marcela Meyer e Luiza Becker. Flores que gosto tanto. Marina Sissini, pelas orientações e por ter me apresentado a biologia molecular.

Agradeço aos meus pais Ângela Pincelli e Fábio Suyama Ramos, pela vida e pelo dia a dia.

À minha avó Leoni, Gabriel Pincelli, Marília Pincelli, Isabella Pincelli, André Pincelli e Tatiana Kawata, por existirem junto comigo.

Resumo

Dengue vírus se relaciona com grande parte da humanidade. Foram identificados, até o momento, quatro sorotipos de dengue, que rapidamente se espalharam pelas regiões tropicais e subtropicais da Terra. É um arbovírus do gênero *Flavivirus*, envelopado, com material genético constituído por uma fita simples de RNA senso positivo. A entrada do vírus na célula acontece por endocitose. Nesse processo, a proteína de Envelope (E) é fundamental. Ela interage com receptores celulares de superfície da célula hospedeira, permitindo a entrada do vírus no meio intracelular. Diferentes estudos sugerem que mutações pontuais na proteína E têm impacto negativo para a biologia do vírus. A região E 250-270 foi identificada como uma das mais conservadas evolutivamente da proteína. Sob o olhar de que regiões conservadas são importantes para a biologia do vírus, foi elaborada a hipótese de que múltiplas mutações na sequência codante do peptídeo E 250-270 de DV1 possuem efeito sinérgico e interferem no fenótipo viral. O presente estudo teve como objetivo avaliar o fenótipo de *Dengue vírus* (sorotipo 1) que sofreu substituição de todos os aminoácidos polares e carregados da região E 250-270 por Alaninas, denominado pBACMut A. Há indicação de que as mutações de pBACMut A não resultam em perda do poder de replicação do material genético *in vitro*. Não foi possível avaliar o poder infectivo de pBACMut A sendo, portanto, necessários novos ensaios.

Palavras Chave: *Dengue vírus*; proteína de envelope; conservação evolutiva;

Abstract

The *Dengue virus* is related to a big part of humanity. Currently, there have been identified four dengue serotypes, which are spread through the tropical and subtropical regions of the planet. It is an arbovirus of the *Flavivirus* genus, enveloped, with a genetic material made by a single stranded RNA positive sense. The virus entry process in the cell happens by endocytosis, which demands a fundamental participation of the E protein. This protein interacts with receptors at the cell surface of the host cell, allowing the virus to enter into the intracellular medium. Many studies suggest that point mutations in the E protein have a negative impact in the virus biology. The region E 250-270 of the protein was identified as one of the most evolutionarily conserved. Being aware that conserved regions are important to the virus biology, a hypothesis was created that multiple mutations in codante peptide sequence E 250-270 of the DV1 have a synergistic effect and interfere in the viral phenotype. The present study aimed to evaluate the *Dengue virus* phenotype (serotype 1) which suffered replacement of all polar aminoacids and charged of the E region 250-270 by Alanines, named pBACMut A. There is an indication that the pBACMut mutations do not result in the loss of the replication capacity of the genetic material, in vitro. It wasn't possible to evaluate the infective power of pBACMut A requiring further assays.

Keywords: *Dengue virus*; envelope protein; evolutionary conservation;

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. NÚMERO DE SOROTIPOS DE DENGUE REPORTADOS POR DÉCADA, DE 1943 A 2013 | 13 |
| FIGURA 2. CASOS PROVÁVEIS DE DENGUE, POR SEMANA EPIDEMIOLÓGICA DE INÍCIO DE SINTOMAS, NO BRASIL, NOS ANOS DE 2013, 2014 E 2015 | 13 |
| FIGURA 3. ESTRUTURA DA PROTEÍNA E DE DV2 EM CONFORMAÇÃO DE DÍMERO, PRÉ FUSÃO, E DE TRÍMERO, PÓS-FUSÃO | 15 |
| FIGURA 4. MUDANÇA CONFORMACIONAL DA PROTEÍNA E DURANTE A MATURAÇÃO DA PARTÍCULA VIRAL | 16 |
| FIGURA 5. PERFIL DE CONSERVAÇÃO AMINOACÍDICA NA PROTEÍNA E DE DENGUE. EM DESTAQUE O PEPTÍDEO E250-270 E SEUS AMINOÁCIDOS | 17 |
| FIGURA 6. PROTEÍNA E COM DESTAQUE PARA REGIÕES CONSERVADAS | 17 |
| FIGURA 7. SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA DO VÍRUS SELVAGEM, PBACDV1, E DO VÍRUS MUTANTE, PBACMUT A | 21 |
| FIGURA 8. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DA PURIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL DE PBACDV1, DIGESTÃO DO PLASMÍDEO, E DA TRANSCRIÇÃO <i>IN VITRO</i> | 29 |
| FIGURA 9. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA DE RNA VIRAL EXTRAÍDO DE CÉLULAS TRANSFECTADAS, E DE SEUS SOBRENADANTES, COM 300NG E 1000NG DE PBACDV1 | 30 |
| FIGURA 10. PROPAGAÇÃO VIRAL EM CÉLULAS HUH7.5 TRANSFECTADAS COM PBACDV1 (1000NG) | 31 |
| FIGURA 11. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DA PURIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL DE PBACDV1, DIGESTÃO DO PLASMÍDEO, E DA TRANSCRIÇÃO <i>IN VITRO</i> | 33 |
| FIGURA 12. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DA PURIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL DE PBACMUT A, DIGESTÃO DO PLASMÍDEO, E DA TRANSCRIÇÃO <i>IN VITRO</i> | 33 |
| FIGURA 13. PROPAGAÇÃO VIRAL EM CÉLULAS HUH7.5 APÓS 120H DE TRANSFECCÃO COM PBACDV1 (300NG) | 34 |
| FIGURA 14. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA DE RNA VIRAL EXTRAÍDO DE CÉLULAS TRANSFECTADAS COM PBACDV1 E COM PBACMUT A (1000NG) | 35 |
| FIGURA 15. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA DE RNA VIRAL EXTRAÍDO DE SOBRENADANTE DE CÉLULAS TRANSFECTADAS COM PBACDV1 E COM PBACMUT A (1000NG) | 36 |
| FIGURA 16. PROPAGAÇÃO VIRAL EM CÉLULAS HUH7.5 APÓS 120H DE TRANSFECCÃO COM DV (CONTROLE POSITIVO), <i>Mock</i> , PBACDV1, E PBACMUT A (1000NG) | 38 |

Lista de abreviaturas

- BAC – cromossomo artificial bacteriano (*bacterial artificial chromosome*)
C – proteína do capsídeo
cDNA – DNA complementar
CMC – carboximetilcelulose
DV – *Dengue vírus*
DMEM/F12 – *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*
E – proteína de envelope
E-DI – Domínio I da proteína de envelope
E-DII – Domínio II da proteína de envelope
E-DIII – Domínio III da proteína de envelope
EDTA – ácido etilendiamino teracético
IFI – imunofluorescência indireta
IgG – Imunoglobulina tipo G
Kb – Quilobase
ORF – Sequência aberta de leitura
pb – pares de bases
PCR – reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)
pfu – unidades formadoras de placa
pH – potencial hidrogeniônico
PPM – padrão de peso molecular
prM – proteína precursora de membrana
qPCR – PCR quantitativo em tempo real
RNase – ribonuclease
SDS – dodecil sulfato de sódio
TB – *Terrific Broth*

Índice

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO | 11 |
| OBJETIVOS | 19 |
| OBJETIVO GERAL | 19 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 19 |
| METODOLOGIA | 20 |
| OBJETO DE ESTUDO | 20 |
| CRESCIMENTO BACTERIANO E EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL | 21 |
| TRANSCRIÇÃO <i>IN VITRO</i> | 22 |
| TRANSFEÇÃO | 23 |
| IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA | 25 |
| PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qPCR) | 25 |
| TITULAÇÃO VIRAL COM O SOBRENADANTE DE CÉLULAS TRANSFECTADAS | 27 |
| RESULTADOS | 29 |
| DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA DE PBACDV1 | 29 |
| OBTENÇÃO DO RNA DE PBACDV1 E PBACMUT A | 31 |
| ANÁLISES FENOTÍPICAS DE PBACDV1 E PBACMUTA EM CÉLULAS HUH7.5 | 34 |
| qPCR | 34 |
| TITULAÇÃO VIRAL ATRAVÉS DA DETECÇÃO DE PLACAS DE LISE | 36 |
| IMUNOFLUORESCÊNCIA | 37 |
| DISCUSSÃO | 40 |
| CONCLUSÕES | 43 |
| REFERÊNCIAS | 44 |

Introdução

Os vírus são entidades que infectam, até onde sabemos, todas as formas de vida (Knipe, D. M.; Howley, P. M., 2006). Possuímos relação muito próxima com esses organismos. Em nosso genoma existem fragmentos de DNA de origem viral. Os vírus fazem parte também da microbiota humana, que é fundamental para homeostasia do corpo. Assim, inseridos no DNA humano, infectando outros elementos da microbiota ou na forma latente, os vírus que nos habitam compõem o viroma (Virgin, 2014). Cada ser humano é constituído, portanto, por uma pluralidade de formas de vida. Essa pluralidade, associada aos fatores genéticos verticalmente herdados e às influências ambientais, definem o indivíduo biológico.

Ao olharmos o quão entrelaçada nossa vida está com diferentes vírus percebemos que a evolução dos seres vivos não acontece de forma independente. As inserções de material genético viral no genoma de diferentes espécies podem ter influências regulatórias e implicações evolutivas. No caso do ser humano, ao menos oito por cento do genoma é derivado de retrovírus, sendo que muitas destas seqüências estão presentes em todos os símios (Lander et al., 2001; Patel et al. 2011).

A interação vírus/ser humano está relacionada, ainda, com transformações na sociedade. As epidemias virais transformam a interação do homem com o meio, ao passo que as mudanças comportamentais humanas podem determinar os desfechos das epidemias. O surto de Ebola que acometeu a região Oeste do continente africano a partir de 2014 é exemplo recente de influência de infecção viral sobre a organização da sociedade, e da importância de mudanças comportamentais humanas para o desfecho epidêmico. O surto não só transformou o cotidiano dos habitantes das localidades atingidas, como direcionou o olhar de parte do mundo para uma das regiões mais pobres e esquecidas do planeta. Para Gostin, L. O. e Fredman, E. A. (2015), o surto revelou a incoerência e a desigualdade do sistema de saúde global.

Nota-se que a interação entre vírus e seres humanos tem implicações microscópicas, ao interferir na evolução biológica dos vírus e do hospedeiro, e macroscópica, ao transformar a sociedade humana. O presente trabalho se propõe a investigar a biologia de um vírus que se relaciona com grande parte da humanidade, o *Dengue vírus*.

O *Dengue virus* faz parte do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*. O gênero é constituído por mais de 70 espécies de arbovírus envelopados, dentre elas *West Nile virus*, *yellow fever virus*, *Japanese encephalitis virus* e *tick-borne encephalitis virus*. No caso da dengue, o principal vetor é o mosquito *Aedes aegypt* (*Stegomyia aegypti*) (Mukhopadhyay et al. 2005; Lindenbach, 2007).

Foram identificados até o momento quatro sorotipos de dengue (DENV-1 a 4), que rapidamente se espalharam pelas regiões tropicais e subtropicais da Terra, Figura 1. Clinicamente a cocirculação de vários sorotipos é crítica. Durante a infecção secundária, anticorpos não neutralizantes desenvolvidos na primeira infecção formam complexos antígeno-anticorpo. Os complexos formados facilitam a entrada dos vírus em macrófagos via receptores FCyR, que reconhecem as cadeias pesadas de IgG (Balsitis et al., 2010). Dessa maneira, há aumento da viremia e da probabilidade de desenvolvimento da forma grave da doença. Durante a primeira infância, anticorpos anti dengue de origem materna exercem papel ambíguo: em um primeiro momento têm função protetora, mas posteriormente aumentam o risco de desenvolvimento de febre hemorrágica (Kliks et al., 1988; Lindenbach, 2007).

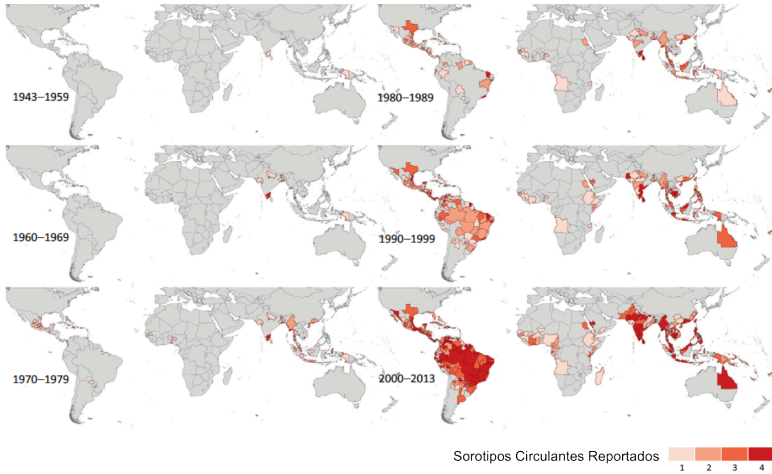


Figura 1. Número de sorotipos de dengue reportados por década, de 1943 a 2013. Adaptado de: Messina et al. (2014).

No Brasil há ocorrência dos quatro sorotipos virais, e a incidência de casos é grande: somente em 2015, até a semana epidemiológica 30 (04/01/15 a 01/08/15), foram registrados 1.350.406 casos prováveis de dengue, Figura 2.

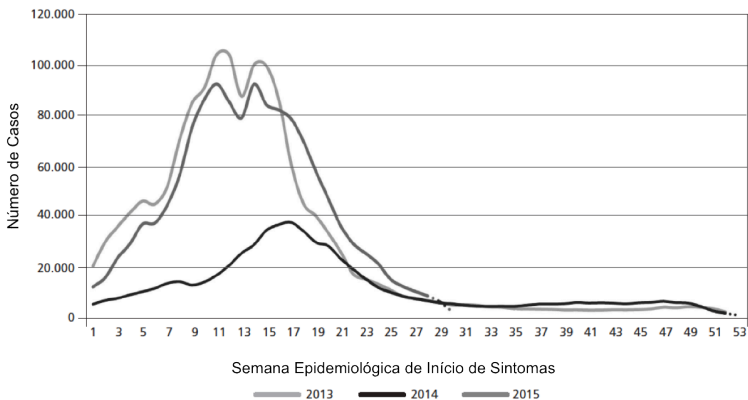


Figura 2. Casos prováveis de dengue, por semana epidemiológica de início de sintomas, no Brasil, nos anos de 2013, 2014 e 2015. Adaptado do: Boletim Epidemiológico nº 24 – 2015, da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde.

Assim como a maioria dos vírus que infectam vertebrados ¹, os *Flavivirus* possuem genoma constituído por RNA. A elevada taxa de erro durante a replicação do RNA - aproximadamente 10000 vezes maior do que a do DNA - confere ao RNA genômico plasticidade (Knipe, D. M.; Howley, P. M., 2006). O RNA dos *Flavivirus* é formado por uma fita simples senso positivo, de aproximadamente 11Kb, que codifica uma poliproteína. Essa poliproteína é processada pelo hospedeiro e por proteases do vírus em 10 proteínas: três proteínas estruturais - Capsídeo (C) , Proteína Precursora de Membrana (prM) e Proteína de Envelope (E) - e sete proteínas não estruturais, mas essenciais para a replicação viral - NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5 (Knipe, D. M.; Howley, P. M., 2006).

Constituída por 495 aminoácidos, a proteína E é a maior proteína de superfície dos *Flavivirus* e a porção com maior número de antígenos. Em 180 cópias, somadas a 180 cópias de prM, constitui o envelope viral. Seus monômeros são compostos por três domínios (E-DI, E-DII e E-DIII), Figura 3. O primeiro domínio é formado por um barril beta com oito folhas. O domínio dois, formado por 12 folhas beta e duas alfa hélices, concentra regiões conservadas evolutivamente. O domínio três, formado por 10 folhas beta, é o maior alvo de anticorpos neutralizantes e o provável responsável pela ligação do vírus ao receptor principal da célula hospedeira (Lindenbach et al., 2007).

A entrada dos *Flavivirus* na célula do hospedeiro acontece por endocitose: a proteína E interage com receptores celulares de superfície da célula hospedeira, permitindo a entrada do vírus no meio intracelular². A entrada é possibilitada pelo peptídeo de fusão do vírus,

¹ Para as famílias de vírus que infectam vertebrados, a proporção de vírus com RNA e DNA genômico é de aproximadamente 2:1 respectivamente. A diferença de proporção é ainda mais acentuada nas plantas. Para essas formas de vida, os vírus infectantes são, com exceção dos retrovírus, exclusivamente vírus com genoma de RNA. Ainda não foi elucidado o motivo dessa exclusividade. Uma possibilidade é que os vírus com material genético formado por DNA e que não fazem transcrição reversa tenham surgido posteriormente à divergência evolutiva entre plantas e animais (Knipe, D. M.; Howley, P. M., 2006).

² Os receptores que interagem com a proteína E dos *Flavivirus* são muitos e presentes em diferentes espécies. Vários deste receptores foram identificados, mas somente alguns foram caracterizados (Lindenbach et al., 2007).

uma pequena estrutura em forma de *loop*. O ambiente ácido do endossomo provoca mudanças conformacionais na proteína E que possibilitam a fusão da membrana viral com a membrana celular. Durante essa transição, os dímeros da proteína E se dissociam em monômeros e então se organizam em homotrímeros: E-DII e E-DIII fazem movimentos de rotação sobre E-DI, Figura 3. Nesse momento, anticorpos neutralizantes podem impedir o movimento de rotação de E-DIII. A eficiência da fusão depende da composição lipídica das membranas: colesterol e ácido oleico fortalecem a fusão, enquanto a presença de fosfatidilcolina inibe o processo. A composição lipídica está relacionada ainda com alterações de pH que podem afetar a eficiência de fusão. O núcleo capsídeo é liberado no citoplasma e a partícula é completamente desmontada. A fita simples de RNA senso positivo é traduzida em poliproteína e a montagem dos vírus acontece no retículo endoplasmático. O envelope viral da partícula, ainda imatura, se organiza em 60 heterotrímeros de prM-E. No trans-Golgi prM é clivada, há mudança conformacional, as 180 cópias de E se organizam em dímeros paralelos e a partícula se torna infecciosa, Figura 4. As partículas são liberadas para o meio extracelular por exocitose (Kuhn et al., 2002; Zhang et al., 2003; Mukhopadhyay et al., 2005; Lindenbach et al., 2007). Nota-se que durante o ciclo viral as proteínas E que constituem o envelope passam por duas grandes mudanças conformacionais.

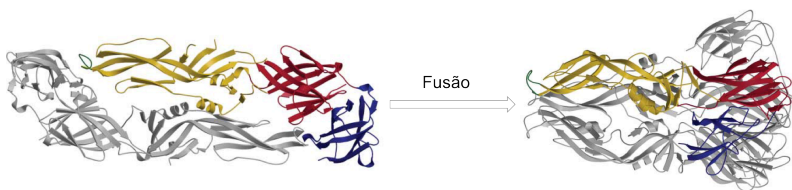


Figura 3. Estrutura da proteína E de DV2 em conformação de dímero, pré fusão, e de trímero, pós-fusão. E-DI em vermelho, E-DII em amarelo e E-DIII em azul. Peptídeo de fusão em verde. Em cinza estão representados os demais monômeros. Adaptado de: Mukhopadhyay et al. (2005).

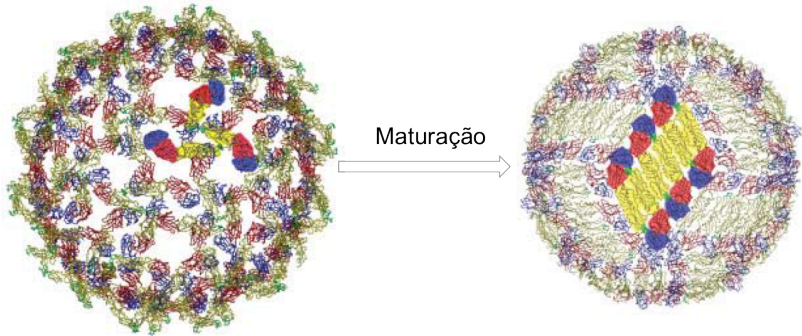


Figura 4. Mudança conformacional da proteína E durante a maturação da partícula viral. Adaptado de: Mukhopadhyay et al. (2005).

Diferentes estudos sugerem que mutações pontuais na proteína E têm impacto negativo para a biologia do vírus. Huang et al. (2010) demonstraram que vírus mutantes na região AA 98-111 da proteína E possuem cinética de crescimento diferente dos vírus selvagens e eficiência de fusão diminuída. Wispelaere e Yang (2012) sugeriram que mutações na região *DI/DII Linker* do *Dengue virus* afetam negativamente a montagem da partícula viral. Christian et al. (2013) avaliaram o efeito de mutações isoladas em cada um dos aminoácidos da proteína E e sugeriram alguns como sendo essenciais para os processos biológicos do vírus.

Através de análises de bioinformática estrutural, Fleith (2014) identificou as regiões do peptídeo de fusão e a região E 250-270, ambas localizadas no E-DII, como as mais conservadas da proteína E, Figura 5 e 6, sendo o último o maior peptídeo conservado da proteína. A manutenção evolutiva dos aminoácidos, sobretudo os codificados por genomas constituídos por RNA, exige forte mecanismo de proteção e/ou seleção negativa dos que tiveram mutação nessa região. Ambos os casos sugerem que regiões conservadas evolutivamente são importantes para a biologia do vírus.

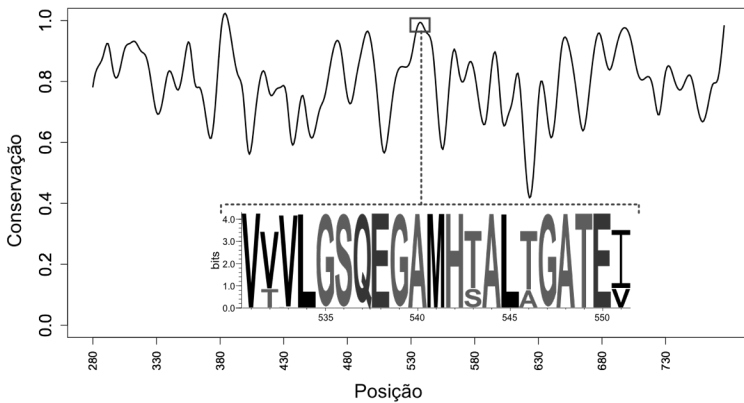


Figura 5. Perfil de conservação aminoacídica na proteína E de dengue. Em destaque o peptídeo E250-270 e seus aminoácidos. O gráfico foi construído a partir do alinhamento de 480 genomas de dengue, 120 de cada sorotipo, aleatoriamente selecionados no *GenBank*. Foi calculado o aminoácido mais presente de cada região. No eixo y, 1 representa 100% de conservação. O eixo x representa a sequência de todos os aminoácidos da proteína E (Fleith, manuscrito em preparação).

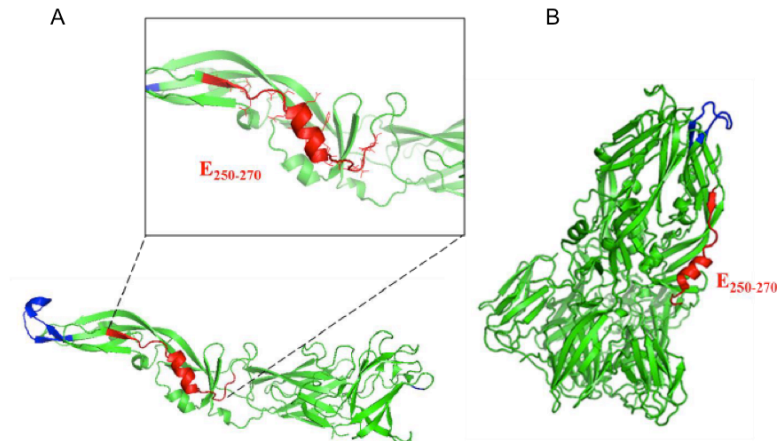


Figura 6. Proteína E com destaque para regiões conservadas. Em azul o peptídeo de fusão; em vermelho peptídeo E 250-270. Em A, um dos monômeros da estrutura dimérica. Em B, disposição dos peptídeos na estrutura trimérica. Adaptado de: Fleith (2014).

Sob o olhar de que regiões conservadas evolutivamente são importantes para a biologia do vírus, foi elaborada a hipótese de que múltiplas mutações na sequência codante do peptídeo E 250-270 de DV1 possuem efeito sinérgico e interferem no fenótipo viral.

O presente estudo, ao contribuir para o melhor entendimento do papel do peptídeo E 250-270, colabora para a compreensão do *Dengue virus*. Hoje não há medicamentos ou vacinas para a dengue, nesse contexto o conhecimento detalhado do vírus é imperativo.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar as implicações de aumento de apolaridade e eliminação de cargas negativas na porção E 250-270 da proteína E do vírus da dengue para a infectividade viral *in vitro*.

Objetivos Específicos

1. Avaliar o poder de replicação do material genético do vírus mutante em células Huh7.5 através de análises de qPCR;
2. Avaliar o potencial infeccioso do vírus mutante através da titulação viral do sobrenadante de células Huh7.5 transfectadas e de imunofluorescência.

Metodologia

Objeto de estudo

Cromossomo artificial bacteriano (BAC) codante para a poliproteína de DENV1, denominado pBACDV1, foi utilizado como ferramenta base. Através de subclonagens o fragmento E250-270 de pBACDV1 foi substituído por fragmento mutado, constituindo o chamado pBACMut A. Bactérias transformadas com pBACDV1 e com pBACMut A foram disponibilizadas por Renata Cristina Fleith.

O pBACMut A sofreu substituição de todos os aminoácidos polares e carregado da região E 250-270 por Alaninas - aminoácidos simples que não possuem cadeias laterais complexas e não alteram a cadeia principal - Figura 7. Há interesse em observar o efeito sinérgico dos aminoácidos substituídos. As análises bioquímicas que determinaram quais aminoácidos seriam mutados foram feitas por Brian Ferguson, *University of Cambridge*. O mutante foi desenhado de forma a causar o mínimo impacto sobre a estrutura geral da proteína. A acessibilidade das cadeias laterais da superfície da estrutura tridimensional da proteína E foi avaliada através do *software ASA*. Foram escolhidos para as mutações os aminoácidos com ao menos 50% de acessibilidade. O *software Pymol* foi utilizado para determinar as cargas dos resíduos (Fleith, 2014).

pBACDV1

pBACMut A

250 Valina-----Alanina
251 Valina
252 Valina
253 Leucina
254 Glicina
255 Serina
256 Glutamina-----Alanina
257 Glutâmico----- Alanina
258 Glicina-----Alanina
259 Alanina
260 Metionina
261 Histidina-----Alanina
262 Treonina-----Alanina
263 Alanina
264 Leucina
265 Treonina-----Alanina
266 Glicina
267 Alanina
268 Treonina
269 Glutâmico-----Alanina
270 Isoleucina

Figura 7. Sequência aminoacídica do vírus selvagem, pBACDV1, e do vírus mutante, pBACMut A. Os números representam a posição dos aminoácidos. Aminoácidos carregados negativamente estão em vermelho, hidrofóbicos em azul, resíduos com acessibilidade maior que 50% estão sublinhados (Fleith, 2014).

Crescimento bacteriano e extração de DNA Plasmidial

Bactérias, Dh5-Alpha (*Invitrogen*), transformadas com pBACMutA ou com pBACDV1, foram estriadas em meio *Terrific Broth* (TB - *Invitrogen*) ágar 15 µg/mL cloranfenicol e incubadas a 30° C até que surgissem colônias. A partir desse momento, as condições de incubação foram as seguintes: meio TB 15 µg/mL cloranfenicol, 150 rpm, 30° C. Uma colônia foi isolada, inoculada em 10 mL de meio, em tubo de 50 mL, por aproximadamente 16h ou até que crescessem bactérias. O meio inoculado foi transferido para um erlenmeyer estéril contendo 500 mL

de meio, e foi incubado por aproximadamente 16h. Para cada etapa do procedimento foi feito controle de esterilidade do meio.

As bactérias foram coletadas através de centrifugação a 4° C, 4000 rpm por 20 minutos. A extração do DNA de pBACMutA e de pBACDV1 foi feita com o *HiSpped Plasmid Maxi Kit (Qiagen)*, de acordo com as recomendações do fabricante.

O DNA extraído no processo descrito anteriormente foi avaliado através de eletroforese em gel de agarose 0,8 %.

Transcrição *in vitro*

O DNA plasmidial foi linearizado com a enzima de restrição SwaI (10 U μ L, *New England Biolabs*). Para a digestão foram utilizados 2,5 μ L de enzima, 2,5 μ g de DNA, 5 μ L de tampão 3.1 (*New England Biolabs*) e água livre de nucleases em quantidade suficiente para alcançar 50 μ L. A reação foi incubada a 30° C por 16 horas. A digestão do plasmídeo foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8 %.

O plasmídeo linearizado foi tratado com 150 μ g/mL de Proteinase K 0,5 % SDS, por 30 minutos a 50°C.

Para a purificação do DNA linearizado, foi acrescentado ao produto da digestão 60 μ L de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 25:24:1. Em seguida, a solução foi homogeneizada e centrifugada a 13400 rpm por 2 minutos; a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo. Foram adicionados mais 60 μ L de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, na proporção de 25:24:1, à fase aquosa e novamente a amostra foi homogeneizada, centrifugada e a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, como descrito anteriormente. À fase aquosa foram adicionados 60 μ L de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 24:1, a amostra foi homogeneizada e centrifugada a 13400 rpm por 2 minutos. A fase aquosa foi reservada em um novo microtubo e a ela foi acrescentado 200 μ L de etanol absoluto. A amostra foi incubada a - 20° C durante toda a noite. No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 14000 rpm, por 20 minutos a 4° C. O

sobrenadante foi descartado e foi acrescentado 200 μ l de etanol 70 %. A solução foi novamente centrifugada a 14000 rpm, por 20 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o microtubo foi incubado a 37° C para a secagem do etanol remanescente. O DNA precipitado foi eluído em 30 μ L de água livre de nucleases e quantificado no *NanoDrop*.

Para as reações de transcrição *in vitro*, os kits *mMESSAGE mMACHINE* e *MEGAscript T7 High Transcription* (ambos *Life Technologies*) foram utilizados. O primeiro kit foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. Para o segundo kit a solução da reação foi constituída de 2 μ L de ATP, 2 μ L de CTP, 2 μ L de UTP, 1 μ L de GTP, 4 μ L de tampão, 2 μ L de enzima, 1 μ L CAP 40 mM e 1 μ L de inibidor de RNase.

O RNA transcrito foi purificado com o *RNeasy minikit* (*Qiagen*), de acordo com as recomendações do fabricante.

Para verificação de integridade do RNA transcrito e purificado de pBACMut A foi realizada eletroforese em gel 0,8 % agarose livre de RNases . No caso de pBACDV1, a verificação se deu por transfecção seguida de imunofluorescência após 120h.

Transfecção

O procedimento foi realizado em placas de cultura celular de 24 poços com células de linhagem de hepatoma humano (Huh7.5) (Lin et al., 2000). Buscou-se atingir 70 a 80 % de confluência no momento da transfecção. Para isso, as placas foram preparadas no dia anterior com $6,4 \cdot 10^4$ células por poço. Como ferramenta de transfecção foram usados lipossomos, *Lipofectin* (*Invitrogen*).

O experimento foi desenhado para três tempos de coleta: 24, 72 e 120 horas após a transfecção - em triplicata para cada um dos tempos de coleta. As transfecções dos RNAs de pBACMut A e pBACDV1 foram feitas no mesmo dia. Porém, para evitar possíveis contaminações, pBACMut A e pBACDV1 foram transfectados em placas separadas e em momentos diferentes. Com o objetivo de evitar a exposição das células ao ambiente externo à estufa antes do momento de coleta, foram

utilizadas placas separadas para cada um dos três horários de coleta. Como controle, foram feitos poços que passaram pelo mesmo procedimento que os poços transfectados mas que não receberam RNA viral (*Mock*). Ainda como controle, em duplicata, foram feitos poços somente com células que permaneceram com o meio usual *DMEM/F12*.

O RNA viral utilizado na transfecção foi quantificado no aparelho *Picodrop* no mesmo dia do procedimento.

Solução de *Lipofectin* (*Invitrogen*) e meio *Opti-MEM* (*Gibco*) na proporção de 1:8 (2,5 µL de *Lipofectin* e 17,5 µL de *Opti-MEM* por reação) foi preparada. Essa solução foi mantida por 30 minutos em temperatura ambiente. Enquanto isso, o meio *DMEM/F12* (*Gibco*), com 10 % de SFB (*Gibco*) e 1 % de penicilina/estreptomicina (*Gibco*), das células foi substituído por 500 µL de meio *Opti-MEM*. As células permaneceram incubadas a 37° C, em atmosfera de 5 % CO₂, até o momento da transfecção. Foi preparada solução com 300 ng, 1000 ng ou com 2000 ng, de acordo com o experimento, de RNA viral, em 20 µL de *Opti-MEM* por reação. A solução com RNA foi adicionada à solução com *Lipofectin* e meio *Opti-MEM* que havia ficado incubada por 30 minutos, totalizando aproximadamente 40 µL de solução. A mistura das duas soluções foi transferida para um microtubo contendo 250 µL de *Opti-MEM* por reação. Em seguida, o meio das células foi retirado e substituído por 290 µL da solução contendo RNA viral, *Lipofectin* e meio *Opti-MEM* ou, no caso do *Mock*, contendo *Lipofectin* e meio *Opti-MEM*. As células foram incubadas a 37° C, em atmosfera de 5 % CO₂, por três horas. Depois das três horas passadas, o sobrenadante foi descartado e substituído por 1 mL de meio *DMEM/F12*, com 10 % de SFB e 1 % de penicilina/estreptomicina.

Em tempos de 24, 72 e 120 horas após a transfecção, o sobrenadante foi aspirado e armazenado a -80° C. As células foram removidas para extração de RNA quando destinadas às análises de PCR quantitativo em tempo real ou, quando destinadas à imunofluorescência, foram fixadas à placa pela adição de metanol/acetona na proporção e 1:1 e incubadas a -20° C por ao menos 16 horas.

Imunofluorescência Indireta

A Imunofluorescência foi feita 120h depois da transfecção.

A solução fixadora, metanol: acetona (concentração 1:1), foi retirada e a placa secou em temperatura ambiente. Para cada etapa do procedimento de imunofluorescência utilizou-se 200 µL de solução por poço (placa de 24 poços). Foi utilizado como anticorpo primário o anticorpo anti-E de *Flavivirus*, 4G2 - derivado de hibridoma D1-4G2-4-15 - ATCC HB-112 - , em diluição 1:100, em PBS 1x. O anticorpo primário permaneceu incubado por uma hora e meia a 37° C. Como anticorpo secundário, foi utilizado *Alexa Fluor 488 rabbit anti-mouse IgG* ou *Alexa Fluor 633 rabbit anti-mouse IgG* (ambos *Invitrogen*), em diluição de 1:500 e 5 µg/mL respectivamente, em PBS 1x. A incubação do anticorpo secundário foi de uma hora, a 37° C, protegido da luz. DAPI, na concentração de 1 µg/mL, por vinte minutos, em temperatura ambiente e protegido da luz, foi utilizado para marcar os núcleos celulares. Entre anticorpo primário e secundário e, entre anticorpo secundário e DAPI, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X. Ao final do processo as células foram lavadas cinco vezes e a elas foi adicionado 1 mL de solução de PBS 1 x 10 % glicerol por poço ou, dependendo do experimento, somente 1 mL de PBS 1x por poço.

As imagens de imunofluorescência foram feitas em microscópio de fluorescência invertido (*Olympus IX71*), acoplado à câmera (*Olympus DP72*). A formatação das imagens foi feita no programa *Photoshop*.

Os protocolos de purificação do produto de digestão do DNA plasmidial, de transfecção e de Imunofluorescência foram cedidos pelo laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas e sofreram pequenas adaptações nesse estudo.

PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A extração do RNA das células transfectadas e do sobrenadante foi feita com *RNeasy Mini Kit* (*Qiagen*) e *QIAamp Viral RNA mini Kit* (*Qiagen*) respectivamente, de acordo com as recomendações dos fabricantes. Para controle endógeno da extração de RNA, no caso do

sobrenadante, antes do processo de extração foi adicionado 1 µL de norovírus murino (titulação de $6,75 \cdot 10^6$ unidades formadoras de placas (pfu/mL). Todas as amostras de RNA foram quantificadas em um mesmo dia no aparelho *Nanodrop*.

Para a síntese do cDNA foi utilizado o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)*, segundo recomendações do fabricante. A quantidade de RNA utilizada para a reação variou com o momento de coleta e com a origem, célula ou sobrenadante:

24h – 500 ng para RNA extraído de células e 1500 ng para RNA extraído do sobrenadante;

72h – quando possível 1500 ng de RNA, tanto para células como para sobrenadante;

120h – 1500 ng de RNA, tanto para células como para sobrenadante.

Para as amostras provenientes de células a expressão do gene 18S do RNA ribossomal foi utilizada como gene de referência. O gene de referência das amostras derivadas do sobrenadante, como mencionado anteriormente, foi feito a partir da mensuração da amplificação do gene correspondente à junção ORF1-ORF2 de Norovírus murino. Para detecção do vírus da dengue foi utilizado como alvo a sequência nucleotídica correspondente à proteína NS5 do DENV-1.

Para PCR quantitativo em tempo real (qPCR), foi utilizado *SYBR Green PCR (Qiagen)*. O experimento foi feito em duplicata técnica. Em cada reação foi aplicado 5 µL de 2x *SYBR Green PCR*, 0,25 µL (250 nM) de cada um dos iniciadores, 2 µL de cDNA por amostra e 2,5 µL de água.

Antes de realizar o experimento foi feita padronização da qPCR. Foram testadas as amostras sem diluição, diluídas 5 e 10 vezes. Testou-se também diluições diferentes para o iniciador usado para DV1 e para o endógeno Noro vírus.

Os iniciadores utilizados para o qPCR se constituíram da seguintes sequências nucleotídicas (Fleith, 2014):

- DV1/NS5 – *Forward* GCAAACATCTTCAGGGGAAGT, *Reverse* GCTCCCGTACCTCTCCTACC;
- 18S – *Forward* TAGAGGGACAAGTGCGGTTTC, *Reverse* CGCTGAGCCAGTCAGTGT;
- Norovirus murino – *Forward* CACGCCACCGATCTGTTCTG, *Reverse* GCGCTGCGCCATCACTC.

As condições de amplificação foram as indicadas para *SYBR Green PCR* :

- Ativação inicial, 95°C por 10 minutos;
 - Desnaturação 95°C por 15 segundos;
 - Anelamento e extensão 60°C por 1minuto;
 - Curva de *Melting* 95°C por 15 segundos e 60°C por 1minuto;
- As etapas de desnaturação e de anelamento foram repetidas 40 vezes.

As reações foram preparadas em placas do tipo *MicroAmp 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems)* e a PCR foi realizada no aparelho *Applied Biosystems StepOne PCR System*. Os dados obtidos foram analisados no programa *StepOne Software v2.1* e no *Excel pelo método 2(-Delta Delta C(T))*. Os gráficos foram desenhados no programa *Graphpad Prism*.

Titulação Viral com o sobrenadante de células transfectadas

Para o procedimento de titulação foram utilizados os sobrenadantes das células transfectadas com pBACDV1, pBACMut A e do *Mock*, no tempo de 120h após transfecção. Para controle celular da titulação foi feito novo *Mock*. Foram feitas titulações com sobrenadantes que haviam sido congelados e armazenados a -80° C e com sobrenadantes que não foram congelados, mas foram diretamente retirados da placa com células transfectadas e transferidos para a placa de titulação.

Foram utilizadas placas de 12 poços com células de linhagem Huh7.5 com 70 a 80 % de confluência. Em microtubos, com meio *DMEM/F12*, 10 % de SFB, 1 % de penicilina/estreptomicina, foram feitas diluições de 10^{-1} a 10^{-5} do sobrenadante. O meio original das células (*DMEM/F12*, 10 % de SFB, 1 % de penicilina/estreptomicina) foi então substituído

por 400 µL da solução com o sobrenadante. Esse procedimento foi feito para cada uma das diluições seriadas do sobrenadante, em duplicata técnica. Para o *Mock*, o meio original foi substituído por meio novo sem adição de sobrenadante. Foi feito ainda um poço com sobrenadante sem diluição. As células permaneceram incubadas a 37° C, em atmosfera de 5 % CO₂, por 90 minutos. Em seguida, o meio das células foi substituído por 1 mL de meio DMEM/CMC por poço. As células permaneceram incubadas por seis dias, a 37° C, em atmosfera de 5 % CO₂, até o momento de revelação da titulação.

O processo de revelação da titulação foi realizado em temperatura ambiente. Foi adicionado a cada poço 1,5 mL de paraformaldeído 3 % (em PBS 1x, pH 7, por uma hora). Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS 1x e incubadas com solução de cristal violeta por 30 minutos. A placa foi lavada com água corrente.

Resultados

Determinação fenotípica de pBACDV1

A Figura 8 corresponde às corridas em gel de agarose dos produtos da purificação do DNA plasmidial de pBACDV1, do produto da digestão desse plasmídeo, e do produto da transcrição *in vitro* - representa todas as outras transcrições *in vitro* feitas nessa etapa do estudo.

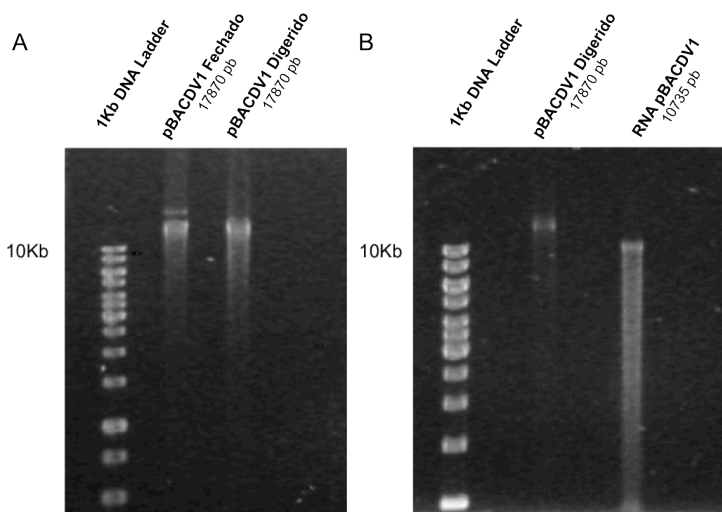


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose (0,8 %) dos produtos da purificação do DNA plasmidial de pBACDV1, digestão do plasmídeo, e da transcrição *in vitro*. Da esquerda para direita, Figura A: Padrão de peso molecular; pBACDV1 não digerido (observam-se duas bandas, característica de plasmídeo fechado); pBACDV1 digerido com SwaI (10U μ L, *New England Biolabs*). Figura B: padrão de peso molecular; pBACDV1 digerido; produto da transcrição *in vitro* de pBACDV1. O gel para o produto da transcrição *in vitro*, B, foi feito com tampão livre de RNase.

No tempo de 120h após transfecção foi avaliada por qPCR a expressão relativa - ao *Mock* - do RNA viral proveniente das células transfectadas e de seus sobrenadantes, Figura 9. Os resultados dessa avaliação

mostraram presença de RNA de DV1 nas células transfectadas e, em menor quantidade, nos sobrenadantes.

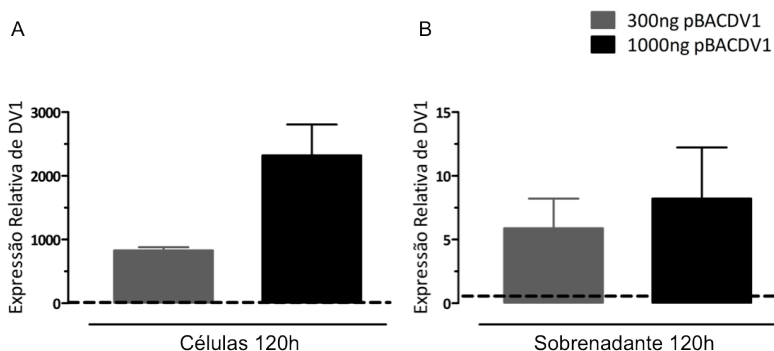


Figura 9. Avaliação da expressão relativa de RNA viral extraído de células transfectadas, e de seus sobrenadantes, com 300 ng e 1000 ng de pBACDV1. A expressão relativa do RNA viral foi avaliada por qPCR . A síntese do DNA complementar foi feita a partir de RNA proveniente de sobrenadante e de células transfectadas, no tempo de 120h após a transfecção. Representado em pontilhado, o *Mock*. Para as células foi usado o gene 18s como normalizador; para o sobrenadante, foi utilizada ORF1-ORF2 de Norovírus murino.

Por imunofluorescência foi avaliado o espalhamento viral, Figura 10. O resultado sugeriu viabilidade das partículas virais de pBACDV1.

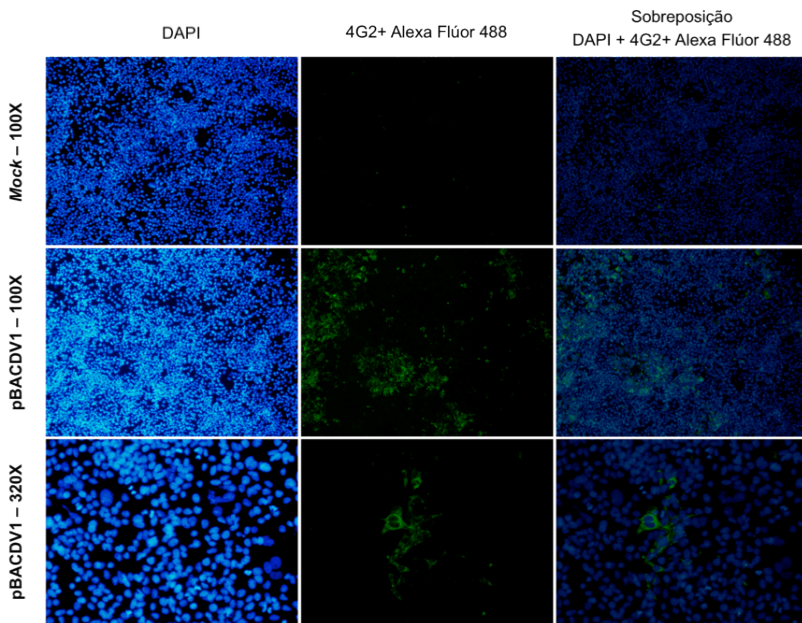


Figura 10. Propagação viral em células Huh7.5 transfectadas com pBACDV1 (1000 ng). Observa-se em verde o espalhamento viral (marcação da proteína E de *Flavivírus* com anticorpo primário 4G2, seguida pela marcação com anticorpo secundário, *Alexa Fluor 488 rabbit anti mouse IgG*) e, em azul, os núcleos celulares (marcação feita com DAPI). O aumento de 320x mostra visão detalhada desse espalhamento. As imagens em sobreposição permitem visualização da infecção viral concentrada nos citoplasmas das células.

A partir da avaliação dos resultados de imunofluorescência e da quantificação relativa do RNA viral por qPCR, foi decidido padronizar as transfecções deste estudo com 1000ng de RNA viral.

Obtenção do RNA de pBACDV1 e pBACMut A

Os produtos da purificação do DNA plasmidial de pBACDV1 e pBACMut A e suas respectivas digestões, estão ilustrados nas figuras 11A e 12A.

Com o objetivo de eliminar o possível viés de obtenção de RNAs com conformações diferentes de acordo com as condições da reação de transcrição *in vitro*, foi necessário atingir em uma única reação de

transcrição *in vitro* a concentração mínima requerida para o experimento de transfecção, 13 µg de RNA

Nas reações de transcrição *in vitro* feitas para determinação do fenótipo de pBACDV1, com *mMESSAGE mMACHINE Kit (Life Technologies)*, o rendimento da reação sempre foi menor que 13 µg de RNA. Em busca de melhor rendimento, foi testado *MEGAscript T7 High Transcription Kit (Life Technologies)*. Foi associado ao uso do novo kit pré tratamento das amostras com proteinase K e, durante a reação, inibidor de RNase. Assim, o rendimento mínimo de 13 µg de RNA foi ultrapassado.

A visualização do produto da transcrição em gel de agarose foi impossível para pBACDV1, Figura 11 B, e bastante fraca para pBACMut A, Figura 12 B. Apesar de ter apresentado banda fraca no gel de agarose, o RNA de pBACMut A foi considerado íntegro. Alternativamente ao gel, a confirmação da integridade do RNA transcrito de pBACDV1 foi feita por imunofluorescência, Figura 13.

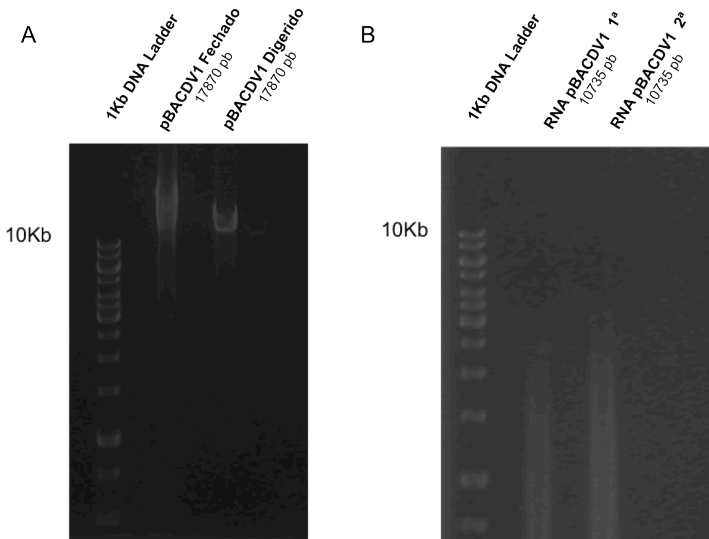


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose (0,8 %) dos produtos da purificação do DNA plasmidial de pBACDV1, digestão do plasmídeo, e da transcrição *in vitro*. Bandas de interesse possuem aproximadamente 11 kB. Da esquerda para direita, Figura A: Padrão de peso molecular; pBACDV1 não digerido; pBACDV1 digerido com Swal (10 U μ L, *New England Biolabs*). Figura B: padrão de peso molecular; produto da transcrição *in vitro* de pBACDV1 1^a eluição da purificação; produto da transcrição *in vitro* de pBACDV1 2^a eluição da purificação. O gel para o produto da transcrição *in vitro* foi feito com tampão livre de RNase

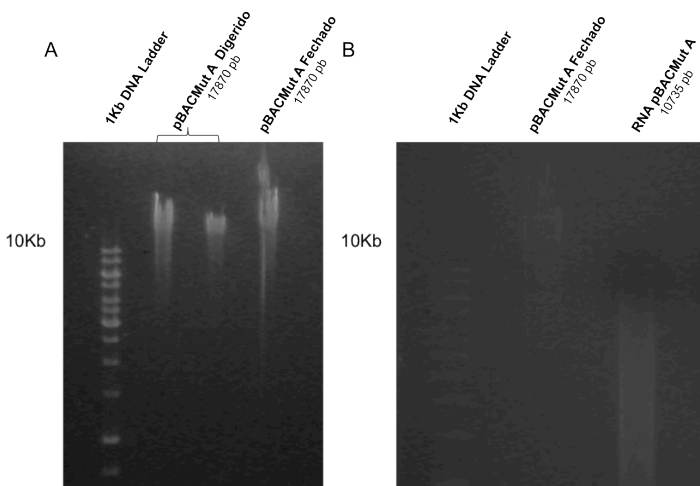


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose (0,8 %) dos produtos da purificação do DNA plasmidial de pBACMut A, digestão do plasmídeo, e da transcrição *in vitro*. Da esquerda para direita, Figura A: 1 Padrão de peso molecular; 2 e 3 pBACMut A digerido com Swal (10 U μ L, *New England Biolabs*); 4 pBACMut A não digerido. Figura B: 1 padrão de peso molecular; 2 pBACMut A não digerido; 3 produto da transcrição *in vitro* de pBACMut A. O gel para o produto da transcrição *in vitro* foi feito com tampão livre de RNase.

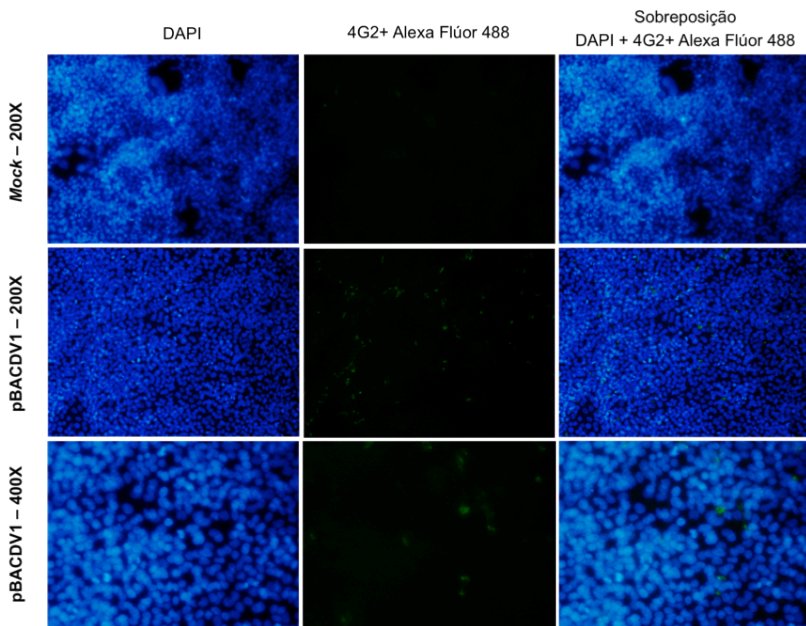


Figura 13. Propagação viral em células Huh7.5 após 120h de transfecção com pBACDV1 (300 ng). Observa-se em verde o espalhamento viral (marcação da proteína E de *Flavivírus* com anticorpo primário 4G2, seguida pela marcação com anticorpo secundário, *Alexa Fluor 488 rabbit anti mouse IgG*) e, em azul, os núcleos celulares (marcação feita com DAPI). O aumento de 400x mostra visão detalhada desse espalhamento. As imagens em sobreposição permitem a visão da infecção viral concentrada nos citoplasmas celulares.

Análises fenotípicas de pBACDV1 e pBACMutA em células Huh7.5

qPCR

As análises da replicação de pBACDV1 e pBACMut A em células Huh7.5 foram feitas a partir da comparação da expressão relativa de RNA de DV1: pBACDV1 ou pBACMut A com células não transfectadas. *Mock* e células que não receberam tratamento com *Lipofectin* (*Invitrogen*),

não apresentaram diferença de expressão do gene 18s ou de Noro. A presença de RNA viral foi observada, em todos os momentos de coleta, tanto em pBACDV1 como para pBACMut A, Figura 14. A expressão relativa de RNA viral foi maior em pBACMut A. Observou-se para pBACMut A leve queda de expressão de RNA no tempo de 72h. Ao contrário, para pBACDV1, no tempo de 72h, houve pequeno aumento de expressão relativa de RNA viral.

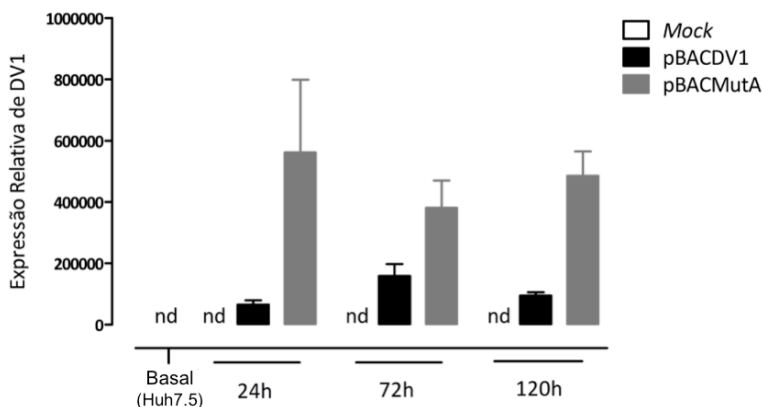


Figura 14. Avaliação da expressão relativa de RNA viral extraído de células transfectadas com pBACDV1 e com pBACMut A (1000 ng). A expressão de RNA viral foi avaliada para pBACDV1, em preto, e para pBACMut A, em cinza, após 24, 72 e 120h de transfecção. Para as células foi usado o gene 18s como normalizador; para o sobrenadante foi utilizada ORF1-ORF2 de Norovírus murino. Não foi detectada expressão de DV1 no Mock e no basal - Huh7.5 não transfectadas e que, diferente do Mock, não receberam Lipofectin (Invitrogen) e Opti-MEM (Gibco).

A expressão relativa de RNA de DV1 foi menor no sobrenadante do que nas células, Figura 15. As análises de qPCR revelaram grande queda na quantidade de RNA a partir de 72h após a transfecção. Por ser constituído pela sequência selvagem de DV1, essa queda não era esperada para pBACDV1.

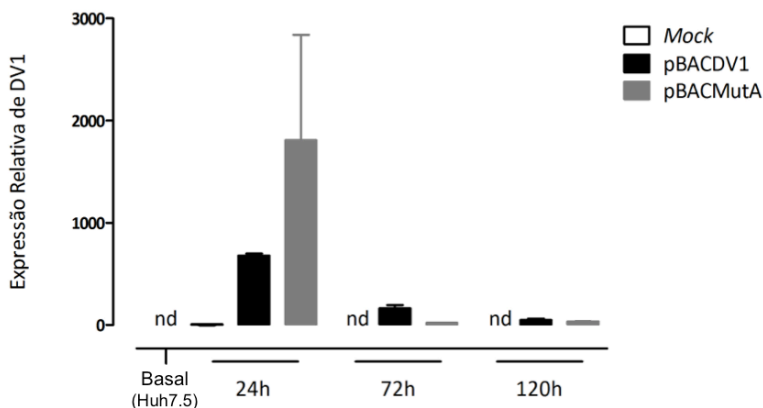


Figura 15. Avaliação da expressão relativa de RNA viral extraído de sobrenadante de células transfectadas com pBACDV1 e com pBACMut A (1000 ng). A expressão de RNA viral foi avaliada para pBACDV1, em preto, e para pBACMut A, em cinza, após 24, 72 e 120h de transfecção. Para as células foi usado o gene 18s como normalizador; para o sobrenadante, foi utilizada ORF1-ORF2 de Norovírus murino. Não foi detectada expressão de DV1 no *Mock* e no basal - Huh7.5 não transfectadas e que, diferente do *Mock*, não receberam *Lipofectin (Invitrogen)* e *Opti-MEM (Gibco)*.

Titulação viral através da detecção de placas de lise

A titulação do sobrenadante após 120h de transfecção com RNA de pBACDV1 e pBACMut A, não apresentou placas de lise. Esse resultado foi ao encontro da avaliação molecular que mostrou queda de expressão relativa de DV1 após 24h de transfecção. Considerando que o sobrenadante utilizado havia sido congelado e armazenado a - 80° C e que esse congelamento poderia afetar a viabilidade das possíveis partículas virais presentes no sobrenadante, foi feita nova transfecção seguida por titulação direta do sobrenadante.

Para a nova titulação optou-se por dobrar a quantidade de RNA viral transfectado: foram usados 2000 ng de RNA por poço. A titulação não apresentou placas de lise.

Imunofluorescência

A imunofluorescência, Figura 16, foi realizada após 120h de transfecção com 2000 ng de RNA. Sabendo que pBACDV1 não se comportou como esperado, e que, desta forma, não seria mais um controle positivo eficiente, como controle positivo da técnica de imunofluorescência foram utilizadas células infectadas com DV.

Foram encontrados regiões características de infecção viral tanto nos poços transfectados com pBACDV1, como nos poços de pBACMut A. Porém, regiões similares foram detectadas nos *Mocks*. O controle positivo apresentou o fenótipo esperado, validando a qualidade da técnica.

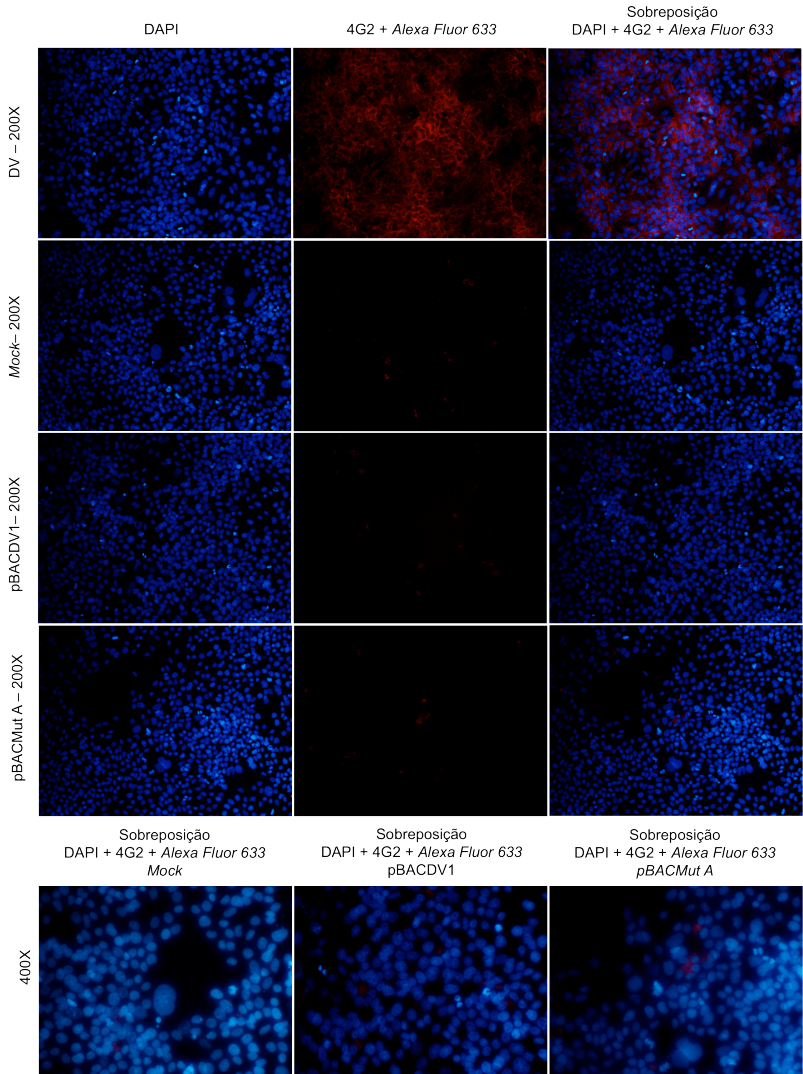


Figura 16. Propagação viral em células Huh7.5 após 120h de transfecção com DV (controle positivo), *Mock*, pBACDV1, e pBACMut A (2000 ng). Observa-se em vermelho o espalhamento viral (marcação da proteína E de *Flavivírus* com anticorpo primário 4G2, seguida pela marcação com anticorpo secundário, *Alexa Fluor 633 rabbit anti mouse IgG*) e, em azul, os núcleos celulares (marcação feita

com DAPI). O aumento de 400x mostra visão detalhada do espalhamento. Nota-se que o *Mock* apresentou níveis de fluorescência similares à pBACDV1 e pBACMut A. As imagens em sobreposição permitem a visão da infecção viral concentrada nos citoplasmas celulares.

Discussão

Através de análise de mutações isoladas em resíduos da proteína E, Christian et al. (2013) identificaram aminoácidos críticos para a infectividade viral. Os vírus com essas mutações tiveram a replicação viral muito diminuída. Dentre os aminoácidos identificados, três encontram-se na porção E250-270 da proteína: M260, H261 e A267. O resíduo H261 foi um dos resíduos substituídos por Alanina em pBACMut A. Christian et al. sugeriram que H261, ao ser exposto a baixo pH sofra protonação e que a ligação de M260, H261 e A267 com a proteína M seja desfeita. Desta forma é possibilitada a mudança conformacional da proteína E de dímero para trímero.

Fleith (2014) avaliou DV1 que sofreu substituições simultâneas dos resíduos E250-253 e 255 por Alaninas. Foram removidas as cadeias laterais hidrofóbicas presentes na região amino-terminal, o que resultou em drástica redução da infectividade em relação ao pBACDV1.

Apesar de pBACMut A possuir mutação em dois resíduos com indicação de serem importantes para a infectividade viral - H261, considerado crítico por Christian et al. (2013), e V250, um dos resíduos substituídos por Alanina no mutante analisado por Fleith (2014) - a manutenção de quantidade significativa de expressão relativa de RNA de pBACMut A em todos os tempos de coleta de células transfectadas sugere que as mutações não interferem na replicação do RNA viral.

A ausência de resultados conclusivos na imunofluorescência, de pouca quantidade de RNA viral nos sobrenadantes, somados à ausência de placas na titulação, indicam que a quantidade de RNA transfectado foi superestimada. A superestimação da amostra é a provável causa do comportamento inesperado de pBACDV1: não é conhecida a quantidade de RNA íntegro transfectado. Para melhorar a eficiência e a confiabilidade do RNA transfectado, e evitar superestimação da quantidade de amostra, uma possibilidade é a corrida em gel de

agarose de toda a amostra seguida por purificação da banda de interesse.

A diferença de quantidade de expressão relativa de RNA entre pBACDV1 e pBACMut A no tempo de 24h indica níveis de eficiência de transfecção não comparáveis. Portanto, não é possível afirmar que a maior quantidade de expressão relativa de pBACMut A nos tempos de 72h e 120h esteja relacionada com maior eficiência do vírus, Figura 14.

Os resultados aqui apresentados apontam a possibilidade de que as mutações de pBACMut A não alterem o poder de replicação de RNA. Não foi possível avaliar o poder infectivo das partículas de pBACMut A. Os níveis de expressão relativa de RNA detectados nas células transfectadas podem ser decorrentes de RNA de célula transfectadas que se dividiram e que mantiveram a replicação do RNA viral, sem que necessariamente tenha ocorrido formação de partícula viral.

Caso a infectividade de pBACMut seja confirmada, considerando H261 como aminoácido crítico para a mudança conformacional de dímero para trímero (Christian et al. 2013), haverá indicação de que o efeito sinérgico das mutações provocam compensação dos danos causados por mutações individuais.

Wispelaere e Yang (2012) substituíram resíduos, conservados em todos os sorotipos de DV e em parte dos *Flavivirus*, da região DI/DIII *Linker*³ de DV2. Nesse trabalho foi constatado que as mutações afetam drasticamente a montagem da partícula viral. Após cinco passagens do vírus em células Huh7.5, foi detectada ocorrência de mutação compensatória que corrigiu os efeitos negativos das substituições, e o fenótipo do vírus mutante se igualou ao fenótipo do vírus selvagem. Considerando a possibilidade de mutação compensatória, é importante que pBACMut A extraído com 120h de transfecção seja sequenciado e que a integridade de sua sequência gênica seja confirmada.

³ DI/DIII *Linker* é constituído por 11 aminoácidos, faz a ligação entre os domínios I e III da proteína E.

Para definição do fenótipo de pBACMut A é imperativo que pBACDV1 se comporte como controle positivo e que haja segurança na quantidade de RNA transfectado. São necessários novos experimentos para elucidação das implicações para a infectividade viral causadas pelo aumento da apolaridade e eliminação de cargas negativas na porção E 250-270 da proteína E do DV.

Conclusões

Há indicação de que as mutações de pBACMut A não resultam em perda do poder de replicação do material genético *in vitro*. Não foi possível avaliar o poder infectivo de pBACMut A sendo, portanto, necessários novos ensaios.

Referências

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

FLEITH, R. C. Implicações do peptide conservado E250-270 da proteína "E" na infectividade do vírus da dengue. **Dissertação (Mestre em Biotecnologia)** - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2014

GOSTIN, L. O.; FRIEDMAN, E. A. A retrospective and prospective analysis of the west African Ebola virus disease epidemic: robust national health systems at the foundation and an empowered WHO at the apex. **The Lancet**, n. 385, p. 1902-1910, mai. 2015.

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

KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M. *Fields Virology*. 5. Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

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

LANDER, E. S., et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, n. 409, p. 860-921, fev. 2001.

LIN, Y. L. et al. Infection of five human liver cell lines by dengue-2 virus. **Journal of Medical Virology**, v. 60, n. 4, p. 425-431, abr. 2000.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H. J.; RICE, C. M. **Flaviviridae: The viroses and their replication**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins, 2007. p. 1101-1152.

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

PATEL, M. R.; EMERMAN, M.; MALIK, H. S. Paleovirology – Ghosts and gifts of viruses past. **Current Opinion in Virology**, n. 4, p 304-309, out. 2011.

VIRGIN, H. W. The virome in Mammalian physiology and disease. **Cell**, n. 157, p142-151, mar. 2014.

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

WISPELAERE, M.; YANG, P. L. Mutagenesis of the DI/DIII Linker in dengue virus envelope protein impairs viral particle assembly. **Journal of Virology**, v. 86 n.13, p. 7072-7083, jul. 2012.