

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE GENÉTICA
REVERSA PARA O VÍRUS DENGUE TIPO 3, ISOLADO EM
RECIFE**

JEFFERSON JOSÉ DA SILVA SANTOS

VIRTUS IMPAVIDA

**RECIFE
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE GENÉTICA REVERSA
PARA O VÍRUS DENGUE TIPO 3, ISOLADO EM RECIFE**

JEFFERSON JOSÉ DA SILVA SANTOS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Genética da Universidade Federal
de Pernambuco como requisito
para obtenção do grau de Mestre
em Genética pela UFPE

Orientador: Dra. Laura H. V. G. Gil

Co-orientador: Dr. Giovani R. Bertani

**RECIFE
2010**

Santos, Jefferson, José da Silva

Desenvolvimento de um sistema de genética reversa para o vírus dengue tipo 3, isolado em Recife / Jefferson José da Silva Santos. – Recife: O Autor, 2010.

66 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Laura H. V. G. Gil.

Co-Orientador: Giovani R. Bertani.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Genética, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Dengue – Recife, Pernambuco 2. Genética I. Título.

616.91852

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2010-170

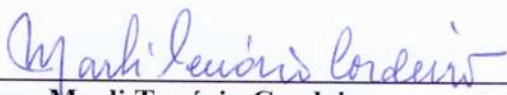
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

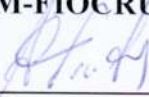
**Parecer da comissão examinadora da dissertação de:
Jefferson José da Silva Santos**

**intitulada:
Desenvolvimento de um sistema de genética reversa para o vírus Dengue tipo 3, isolado
em Recife**

**A comissão examinadora considera o presente trabalho
APROVADO**

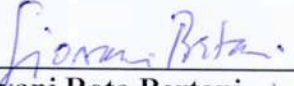
**Portanto, cumpridas todas as exigências regimentais, Jefferson José da Silva Santos faz
jus ao grau de Mestre em Genética pela UFPE. Recife, 27/05/2010.**

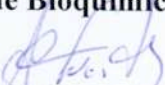

1º Examinador: **Dra. Marli Tenório Cordeiro**
LaViTE, CPqAM-FIOCRUZ


2º Examinador: **Dr. Antonio Carlos de Freitas**
Departamento de Genética, UFPE


3º Examinador: **Dr. Rafael Dhalia**
LaViTE, CPqAM-FIOCRUZ


Orientador: **Dra. Laura H. V. G. Gil**
LaViTE, CPqAM-FIOCRUZ


Co-orientador: **Dr. Giovanni Rota Bertani**
Departamento de Bioquímica, UFPE


Coordenador: **Dr. Antonio Carlos de Freitas**

Agradecimentos

À minha família, pela compreensão e apoio ao longo da jornada, principalmente, quando eu coloquei na cabeça a idéia de fazer ciência. Em especial, à minha mãe (Solange), meu irmão (Roger), Edgar, minha tia (Dila) e minha avó (Dona Maria).

À Dra. Laura Gil, minha orientadora, pelo apoio, empenho e energia a mim dedicados. Por acreditar no meu potencial e dar suporte ao meu desenvolvimento profissional como virologista.

Ao meu co-orientador Dr. Giovani Bertani, por sempre estar disponível quando eu precisava.

Aos meus amigos Fabiana (Fabaceae), Suzanne, Otoniel, Anekecia, Jonatan, Natália (Poia), Adma, Alessandra e Kimberly, pela amizade e incentivo. Por entenderem, quando eu fico semanas sem entrar em contato e por não deixarem a “peteca” cair, mesmo distantes (alguns).

Aos meus colegas de bancada, a nova geração de virologistas (Rangel, Sabrina, Ana Lisa, Georgia, José Valter, Ana Silva, Amanda, Sandra e Mayara) pelas idéias, sugestões e todo o suporte e cooperação.

À “turma do almoço” (Fábia, Isabelle, Georgia, Gerusa, André, Thiego, Renato, Mariana, Andrea Melo, Liciane e Michelle), pelos momentos de descontração e discussão.

À equipe do Departamento de Virologia e Terapia Experimental - LaViTE (a nação Laviteana), pelo apoio e ajuda no desenvolvimento deste projeto. Em especial, à Dra. Marli Tenório e ao pós-doc Eduardo Nascimento, pela colaboração.

Às minhas professoras Socorro e Cristina, pelo exemplo de determinação.

Aos professores Ederson Kido (meu antigo orientador) e Paulo Andrade, pela disciplina Genética Molecular que me fez vislumbrar a biologia sob uma nova dimensão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, pela oportunidade e aos colegas da minha turma de mestrado, pelo apoio e cooperação.

Ao CNPq e à FACEPE, pelo suporte financeiro.

E a Deus, por tudo.

“I almost wish I hadn’t gone down that rabbit-hole—and yet—and yet—it’s rather curious, you know, this sort of life!”

- Alice.

SUMÁRIO

Item	Página
Lista de Abreviaturas	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	x
Resumo	xi
Abstract	xii
Introdução	xiii
1. Revisão da Literatura	14
1.1. Aspectos epidemiológicos da dengue	14
1.2. O vírus dengue	17
1.2.1. Ciclo replicativo viral	21
1.3. Sistemas de genética reversa em flavivírus	25
1.3.1. Técnica de recombinação homóloga em levedura	27
2. Objetivos	29
2.1. Objetivo geral	29
2.2. Objetivos específicos	29
3. Materiais e Métodos	30
3.1. Cultivo de células e vírus	30
3.2. Construção e recuperação do clone infeccioso DENV3	30
3.2.1. Amplificação dos fragmentos de recombinação por PCR	30
3.2.2. Transformação em levedura	31
3.2.3. Extração de DNA plasmidial de levedura	32
3.2.4. Confirmação dos clones por sequenciamento	33
3.2.5. Recuperação do genoma completo do clone infeccioso DENV3 por ligação <i>in vitro</i>	33
3.2.6. Transcrição <i>in vitro</i>	33
3.2.7. Transfecção de células BHK-21 por eletroporação	33
3.2.8. Ensaios de imunofluorescência	34
3.3. Caracterização do clone infeccioso DENV3 <i>in vitro</i>	34
3.3.1. Infecção viral	34
3.3.2. Confirmação da identidade dos vírus recuperados	35

3.3.3. Sequenciamento dos vírus recuperados após sucessivas passagens em células BHK-21		35
3.3.4. Caracterização dos vírus recuperados por ensaio de placa		35
4. Resultados		37
4.1. Abordagem inicial		37
4.2. Construção e recuperação do clone infeccioso DENV3 em sistema de 2 plasmídeos		39
4.3. Caracterização do clone infeccioso DENV3 <i>in vitro</i>		43
5. Discussão		46
6. Conclusões		50
7. Perspectivas		51
8. Referências Bibliográficas		52
9. Anexos		65
Anexo A – Lista de resumos publicados em anais de congressos		65
10. Memorial do aluno		66

Lista de abreviaturas

3'CS	<i>3' cyclization sequence</i>
3'SL	<i>3' stem-loop</i>
3'UAR	<i>3' Upstream AUG region</i>
5'CS	<i>5' cyclization sequence</i>
5'UAR	<i>5' Upstream AUG region</i>
ADE	<i>Antibody-dependent enhancement</i>
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
cHP	<i>C-coding-region hairpin</i>
DB1	<i>Dumbbell-shaped structure 1</i>
DB2	<i>Dumbbell-shaped structure 2</i>
DC	D engue cl ássica
DC-SIGN	<i>Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)- grabbing nonintegrin</i>
DENV	<i>Dengue virus</i> , vírus dengue
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
FHD	F ebre h emorrágica da d engue
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> , isotiocianato de fluoresceína
IFN	<i>Interferon</i>
IgG	I munoglobulina G
IL-8	<i>Interleukin 8</i> , interleucina 8
LiOAc	<i>Lithium acetate</i> , acetato de lítio
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MTT	<i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i>
PEG	<i>Polyethylene glycol</i>
RC	<i>Replication complex</i> , complexo replicativo
RF	<i>Replicative form</i>
RI	<i>Replicative intermediate</i>
SCD	S índrome do c hoque da d engue
SLA	<i>Large stem-loop</i>
VR	<i>Variable region</i>
YFV 17D	<i>Yellow fever virus 17D</i> , vírus da febre amarela 17D (cepa vacinal)

Lista de Figuras

Figura 1	Distribuição geográfica dos casos de dengue nas regiões tropicais	15
Figura 2	Organização genômica dos flavivírus e suas proteínas virais	17
Figura 3	Proteína E, a principal glicoproteína da superfície viral	19
Figura 4	Ciclo replicativo dos flavivírus	22
Figura 5	Regiões 5'-UTR e 3'-UTR de DENV e suas funções na circularização do genoma viral	23
Figura 6	Diagrama esquemático da abordagem inicial da construção do clone infeccioso DENV3	37
Figura 7	Abordagem inicial da construção do clone infeccioso DENV3	38
Figura 8	Eletoferograma representativo do sequenciamento dos clones DENV3- <i>linker</i> , evidenciando a qualidade das sequências obtidas	38
Figura 9	Diagrama esquemático da estratégia de construção do clone infeccioso DENV3 em sistema de 2 plasmídeos	39
Figura 10	Construção do clone infeccioso DENV3 em sistema de 2 plasmídeos	40
Figura 11	Avaliação da expressão de antígenos virais em células transfectadas por ensaio de imunofluorescência (IF)	42
Figura 12	Confirmação da identidade dos vírus recuperados por RT-PCR e fragmentos de restrição	43
Figura 13	Caracterização dos vírus recuperados por ensaio de placa	45

Lista de Tabelas

Tabela 1	Mutação entre o pBSC-DENV3-pB #2 e o vírus parental, identificada por sequenciamento	41
Tabela 2	Mutação entre o pBSC-DENV3-pB #3 e o vírus parental, identificada por sequenciamento	41
Tabela 3	Ocorrência de mutações no vírus IC-DENV3 #L42 recuperado após sucessivas passagens em cultivo celular, identificadas pela análise de sequenciamento	44
Tabela 4	Ocorrência de mutações no vírus IC-DENV3 #L43 recuperado após sucessivas passagens em cultivo celular, identificadas pela análise de sequenciamento	44

Resumo

Os vírus dengue (DENV) são responsáveis por um amplo espectro de manifestações clínicas em diversas partes do mundo. Muitos mecanismos moleculares da biologia do DENV, incluindo replicação do genoma e patogênese viral, ainda não foram totalmente compreendidos. Novos avanços na elucidação destes mecanismos vêm sendo facilitados pelo desenvolvimento dos sistemas de genética reversa nas últimas décadas. No presente trabalho, nós descrevemos o desenvolvimento de um sistema de genética reversa para o vírus dengue tipo 3 (DENV3). Usando um sistema de dois plasmídeos, o genoma do DENV3 foi dividido em duas partes por PCR e os fragmentos gerados foram clonados em separado num vetor plasmidial. Um sítio de restrição foi inserido em ambas as construções, permitindo a posterior recuperação do genoma completo por ligação *in vitro*. Todos os plasmídeos foram construídos pela técnica de recombinação homóloga em levedura e propagados nela para prevenir qualquer instabilidade dos insertos em *E. coli*. A identidade das construções foi confirmada por sequenciamento, no qual foram identificadas mutações no genoma clonado. Para a recuperação do clone infeccioso *in vitro*, as duas partes dos genomas foram amplificadas por PCR, digeridas e unidas por ligação *in vitro*. Dois clones infecciosos foram recuperados e a transcrição *in vitro*, do produto das ligações, produziram RNAs virais genômicos. Células BHK-21, transfectadas por eletroporação com os RNAs sintetizados, foram avaliadas por ensaio de imunofluorescência, mostrando que estes RNAs são infecciosos. Após sucessivas passagens em cultivo celular, os DENV3 recuperados foram caracterizados *in vitro*. RT-PCR, a partir de RNA viral, e a análise de fragmentos de restrição confirmaram que ambos os vírus recuperados foram derivados do nosso sistema de dois plasmídeos. No ensaio de placa, os clones apresentaram fenótipos distintos. Após coloração convencional, enquanto o clone IC-DENV3 #L43 apresentou placas com morfologia similar ao DENV3 selvagem, o clone IC-DENV3 #L42 foi incapaz de formar placas. A análise de sequenciamento, a partir dos produtos de RT-PCR, identificou mutações específicas em cada um dos clones, as quais podem facilitar o crescimento dos vírus recuperados em cultivo celular. Este sistema é uma poderosa ferramenta que nos ajudará a elucidar aspectos moleculares da biologia do DENV, bem como a entender a relação entre mutações específicas e a patogênese do DENV.

Palavras-chave: clone infeccioso, genética reversa, vírus dengue sorotipo 3

Abstract

Dengue viruses (DENV) are responsible for a wide spectrum of clinical outcomes around the world. Many molecular mechanisms of DENV biology, including genome replication and viral pathogenesis, have not been completely elucidated. New insights on those mechanisms have been facilitated by the development of reverse genetic systems in the past decades. Here, we describe the successful development of a reverse genetic system to dengue virus 3 (DENV3). Using a two-plasmid strategy, DENV3 genome was divided in two parts by PCR and the fragments were cloned apart into a yeast-*E.coli* shuttle vector. A restriction site was inserted in both constructs to allow the further recovery of the full-length genome by *in vitro* ligation. All plasmids were assembled in yeast by homologous recombination technique and propagated in it to prevent any possible instability of their inserts in *E.coli*. The identity of the constructs was demonstrated by sequence analysis, which also identified mutations in the cloned genome. To assemble the full-length genome, the two pieces of the genome were amplified by PCR, digested and joined together by *in vitro* ligation. We were able to assembly two infectious clones and *in vitro* transcription of the *in vitro* ligations produced full-length RNA transcripts. BHK-21 cells electroporated with each RNA transcript were assayed by immunofluorescence, which showed that these RNA transcripts are infectious. After serial passage in cell culture, infectious DENV3 rescued from BHK-electroporated cells were *in vitro* characterized. RT-PCR from viral RNA and restriction fragment analysis confirmed both rescued viruses were derived from our two-plasmid system. In plaque assays, the clones had distinct phenotypes. After conventional stain, while one clone (IC-DENV3 #L43) showed plaque morphology resembling to wild-type DENV3 phenotype, the other one (IC-DENV3 #L42) were unable to produce plaques at all. Sequence analysis from RT-PCR products identified specific mutations in each one of the clones, which may allow the rescued viruses to grow in cell culture. This system is a powerful tool that will help us to shed light on molecular features of DENV biology, as the relationship of specific mutations and DENV pathogenesis.

Keywords: infectious clone, reverse genetics, dengue virus type 3

Introdução

A dengue é uma infecção causada por arbovírus (*arthropod-borne virus*) da família *Flaviviridae*. O vírus dengue (DENV) apresenta quatro sorotipos distintos (DENV1-4), dos quais três (DENV1, DENV2 e DENV3) ocorrem no Brasil. Pertencente ao gênero *Flavivirus*, o DENV apresenta um capsídeo icosaédrico, envolto por um envelope viral. Seu genoma viral é estruturado de maneira similar ao RNA mensageiro (RNAm) celular, exceto pela ausência de uma cauda poli-A na extremidade 3'.

Considerada um problema de saúde pública de proporções globais, estimativas indicam que 50 milhões de infecções por DENV ocorram anualmente em mais de 100 países nas regiões tropicais, com cerca de 500 mil casos de febre hemorrágica da dengue, a forma mais grave da doença. Apesar dos avanços, não há vacina ou terapia antiviral disponível contra o DENV. Somado a isso, muitos aspectos da biologia viral ainda não são bem compreendidos.

Um sistema de genética reversa é uma poderosa ferramenta que permite a direta manipulação do genoma de um vírus de RNA, a partir de seu cDNA clonado. Nos últimos anos, os sistemas de genética para flavivírus vem ajudando a elucidar importantes aspectos do ciclo viral, bem como o desenvolvimento de vacinas e a triagem de drogas antivirais.

Um das principais dificuldades no estabelecimento de um sistema de genética reversa para flavivírus é a instabilidade do cDNA clonado do genoma viral em sistemas procariotos, apesar das razões para esta instabilidade não serem bem compreendidas. Dentre as abordagens empregadas para superar os problemas de instabilidade, podemos destacar o uso de levedura. A técnica de recombinação homóloga em levedura vem sendo utilizada com sucesso na clonagem de genomas. Além disso, ela é amplamente usada em diferentes aplicações, demonstrando ser uma técnica simples, robusta e eficiente.

Neste trabalho, nós propomos o desenvolvimento de um sistema de genética reversa, baseado no DENV3, usando a técnica de recombinação homóloga em levedura. O DENV3 é o sorotipo de introdução mais recente no Brasil e foi responsável por surtos epidêmicos de grande magnitude em diversos estados brasileiros. Nós acreditamos que este trabalho é de grande importância para a pesquisa do DENV, contribuindo para o aprimoramento da virologia molecular dos flavivírus, bem como de uso potencial no desenvolvimento de novas estratégias de controle do DENV no país.

1. Revisão da Literatura

1.1. Aspectos epidemiológicos da dengue

A dengue é uma infecção causada por um arbovírus da Família *Flaviviridae*. O vírus dengue (*Dengue virus*, DENV) apresenta quatro sorotipos (DENV1-4) antigenicamente distintos (GUBLER; KUNO; MARKOFF, 2007), dos quais três (DENV1, DENV2 e DENV3) ocorrem no Brasil (SIQUEIRA *et al.*, 2005; CORDEIRO *et al.*, 2007). Sua transmissão se dá através da picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes* infectadas, sendo a espécie *A. aegypti* o principal vetor da dengue nas Américas (GUBLER, 1997).

Os primeiros registros epidêmicos de uma doença compatível com a dengue ocorreram entre 1779 e 1780 na Ásia, África e América do Norte, sugerindo uma ampla distribuição geográfica da doença já no século 18. Contudo, os primeiros relatos de uma doença com apresentação clínica similar a dengue são muito mais antigos e remontam ao período da dinastia chinesa Chin. Ainda assim, foi apenas durante a II Guerra Mundial que o DENV foi isolado e identificado como o agente etiológico da doença (GUBLER, 1997; MAIRUHU *et al.*, 2004).

A dengue apresenta duas formas clínicas principais: a dengue clássica (DC) e a febre hemorrágica da dengue/síndrome do choque da dengue (FHD/SCD). A DC apresenta um amplo espectro clínico desde formas inaparentes até quadros graves atípicos. Pacientes com DC podem apresentar febre, associada à cefaléia, prostração, mialgia, artralgia, dor retro-orbitária, com presença ou não de exantema e/ou prurido. Anorexia, náuseas, vômitos e diarreia também podem ser observados. A FHD/SCD é marcada por um aumento na permeabilidade vascular/extravasamento plasmático, trombocitopenia e manifestações hemorrágicas, podendo levar ao óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009).

Ainda não está bem estabelecido os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das formas mais graves da doença. Atualmente, a hipótese mais aceita é a da infecção sequencial proposta por Halstead (HALSTEAD; NIMMANNITYA; COHEN, 1970). Nesta hipótese, a presença de anticorpos heterólogos de uma infecção prévia por dengue ou níveis subneutralizantes de anticorpos sorotipo-específicos podem facilitar a entrada do vírus nas células alvo. Este fenômeno, denominado imunoamplificação da infecção dependente de anticorpos ou ADE (*antibody-dependent enhancement*), parece ter papel importante no desenvolvimento de FHD/SCD em infantes e infecções secundárias (HALSTEAD;

NIMMANNITYA; COHEN, 1970; CORDEIRO *et al.*, 2008). Esta hipótese tem sido suportada por evidências *in vitro* e *in vivo* (HALSTEAD; PORTERFIELD; O'ROURKE, 1980; GONCALVEZ *et al.*, 2007; ZELLWEGER; PRESTWOOD; SHRESTA, 2010).

Apesar da infecção secundária ser o fator de risco principal, outros fatores têm sido implicados no desenvolvimento da FHD, incluindo genótipo e sorotipo viral envolvido na infecção (ROSEN, 1977; GUBLER *et al.*, 1981; MESSER *et al.*, 2003), fatores genéticos do hospedeiro (HALSTEAD *et al.*, 2001; SAKUNTABHAI *et al.*, 2005; ACIOLI-SANTOS *et al.*, 2008) e idade (GUZMAN *et al.*, 2002).

Estimativas indicam que 50 milhões de infecções causadas por dengue ocorram anualmente em mais de 100 países nas regiões tropicais (Figura 1), com cerca de 500 mil casos de FHD/SCD. Aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas endêmicas com risco de infecção (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009). No Brasil, foram notificados 585.769 casos de dengue em 2008, sendo 4.232 casos de FHD/SCD (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Esta situação é alarmante porque estes números tendem a aumentar nos próximos anos como consequência dos efeitos do aquecimento global (JETTEN; FOCKS, 1997; SUTHERST, 2004; TABACHNICK, 2010).



Figura 1. Distribuição geográfica dos casos de dengue nas regiões tropicais. Em amarelo, países ou áreas onde a doença tem sido notificada. **Fonte:** (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009), modificado pelo autor.

Apesar dos inúmeros avanços, não há uma terapia antiviral ou tratamento específico para a dengue (KUHN *et al.*, 2002; NOBLE *et al.*, 2010). O tratamento disponível é sintomático, incluindo a reposição de líquido e eletrólitos nos casos mais graves (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Atualmente, os esforços estão focados no desenvolvimento de uma vacina tetravalente capaz de proteger contra os quatro sorotipos.

Diferentes estratégias vem sendo empregadas, incluindo: vírus quiméricos (GUY *et al.*, 2008), vírus atenuados (SUN *et al.*, 2003; DURBIN *et al.*, 2005), vírus inativados (ROBERT PUTNAK *et al.*, 2005), replicons (SUZUKI; WINKELMANN; MASON, 2009) e DNA (LU *et al.*, 2003). Uma das principais dificuldades na formulação de uma vacina segura e eficaz contra a dengue é a falta de um modelo animal que reproduza o desenvolvimento da FHD (PANG; CARDOSA; GUZMAN, 2007).

Sem uma vacina ou terapia antiviral disponível, o controle da dengue é limitado ao combate do mosquito vetor *A. aegypti*. O programa de erradicação iniciado nas Américas para prevenir os surtos urbanos epidêmicos da febre amarela, foi capaz de reduzir a densidade populacional do mosquito vetor e até erradicá-lo em alguns países. Contudo, a descontinuação do programa em 1970, aliado a incapacidade de erradicar o *A. aegypti* na região, levou a uma rápida re-infestação do mosquito, seguido por surtos epidêmicos no Caribe, América Central e América do Sul (GUBLER, 1997; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009; SAN MARTIN *et al.*, 2010).

A introdução do DENV1 em 1986 no Brasil, aliada às dificuldades de combate ao vetor, resultou numa rápida dispersão do vírus pelo país e, conseqüentemente, na ocorrência de epidemias em diversos estados da federação, incluindo Pernambuco em 1987. Em 1990, a situação da dengue foi agravada pela introdução do DENV2 e pelo aparecimento dos primeiros casos de FHD. Em 1995, o vírus chegou a Pernambuco dando início a segunda epidemia de dengue no estado. A introdução do DENV3 ocorreu em 2000, ocasionando epidemias de grande magnitude em vários estados brasileiros em 2002, incluindo Pernambuco (CORDEIRO *et al.*, 2008).

O DENV4 foi isolado no Brasil durante um surto ocorrido no estado de Roraima, entre os anos de 1981 e 1982 (OSANAI *et al.*, 1983). Desde então, não há casos registrados deste sorotipo no país, exceto recentes relatos descrevendo o seu isolamento no estado do Amazonas (FIGUEIREDO *et al.*, 2008; DE MELO; ROMANO; DE ANDRADE ZANOTTO, 2009), não confirmados pelo Ministério da Saúde. Apesar disso, devido a circulação do DENV4 em países que fazem fronteira com o Brasil, o risco de re-introdução deste sorotipo no país é eminente (GUBLER; MELTZER, 1999).

1.2. O vírus dengue

Pertencente ao gênero *Flavivirus*, o DENV é um vírus envelopado contendo um capsídeo icosaédrico denso. Seu genoma se apresenta na forma de um RNA de fita simples e orientação positiva (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). Dentro do gênero, também se destacam outros vírus de importância médica, incluindo o vírus da febre do oeste do Nilo (*West Nile virus*, WNV), o vírus da encefalite japonesa (*Japanese Encephalitis virus*, JEV) e o vírus da febre amarela (*Yellow Fever virus*, YFV), os quais também são transmitidos por artrópodes (GUBLER; KUNO; MARKOFF, 2007).

O genoma viral dos flavivírus (Figura 2), com aproximadamente 11.000 pares de bases (pb), é estruturado de maneira similar a um RNA mensageiro (RNAm). Ele apresenta um cap tipo I (7-metil-guanosina) na extremidade 5', uma região 5'-UTR (*untranslated region*), uma *open reading frame* (ORF) e uma região 3'-UTR. Contudo, diferente do RNAm, o RNA viral não é poliadenilado (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007), sugerindo um mecanismo de tradução distinto do empregado pelos RNAm celulares (EDGIL; POLACEK; HARRIS, 2006).

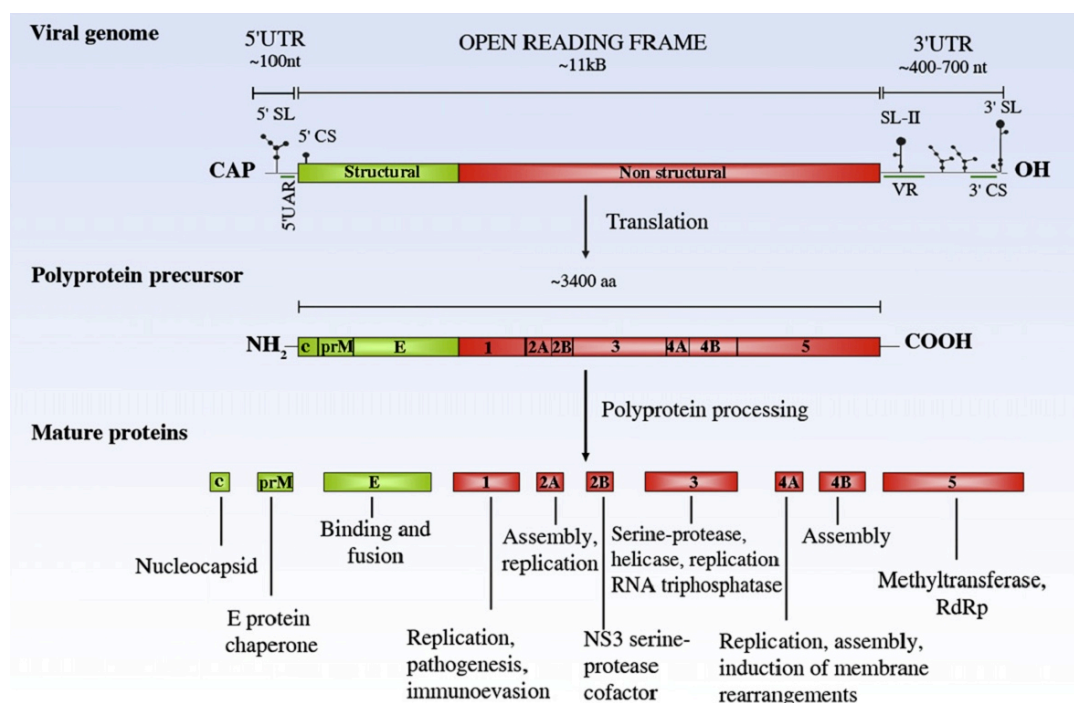


Figura 2. Organização genômica dos flavivírus e suas proteínas virais. Fonte: (FERNANDEZ-GARCIA *et al.*, 2009).

A tradução do RNA viral origina uma poliproteína de aproximadamente 3.400 aminoácidos (aa), a qual é processada por proteases celulares e virais, gerando dez produtos gênicos (Figura 2): três proteínas estruturais [C (capsídeo), prM/M (membrana), E (envelope)], presentes em proporções estequiométricas na partícula viral, e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (KUHN *et al.*, 2002; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

A proteína do capsídeo (C) é uma proteína básica com aproximadamente 11 quilodáltons (kDa), apresentando 4 α -hélices ($\alpha 1$ - $\alpha 4$). Ela é positivamente carregada nas extremidades N- e C-terminais e contém uma região interna hidrofóbica envolvida na associação com a membrana. A proteína C nascente também possui um domínio hidrofóbico (*anchC*) que funciona como sequência sinal para a translocação da proteína prM/M no retículo endoplasmático. Em solução, a proteína C se encontra na forma de dímero, a unidade básica na montagem do capsídeo (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

O precursor da proteína M (prM) é uma glicoproteína com aproximadamente 26 kDa. A principal função de prM é prevenir a fusão prematura das partículas virais imaturas com as membranas celulares durante a via de secreção. Ela também assiste no correto enovelamento da proteína E durante a sua heterodimerização (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). A conversão de partículas virais imaturas em partículas virais infecciosas é mediada pela clivagem de prM em M por uma furina residente do complexo de Golgi e é dependente de pH. Após a clivagem, o heterodímero prM-E dissocia-se, levando a formação de homodímeros de E (LI *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2008).

A proteína E é a principal glicoproteína na superfície viral e está envolvida na ligação ao receptor, penetração viral e hemaglutinação. Com aproximadamente 53 kDa, ela é formada por três domínios (Figura 3a): o domínio I (domínio central); o domínio II (domínio de dimerização) que contém o peptídeo de fusão; e o domínio III, similar ao domínio das imunoglobulinas e no qual se localiza o sítio de ligação ao receptor (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

Nas partículas virais infecciosas, a proteína E se apresenta na forma de um homodímero (Figura 3b), com o peptídeo de fusão inacessível. Durante a penetração viral, a proteína E sofre um rearranjo conformacional sob condições de baixo pH, levando a formação irreversível de homotrímeros e a exposição do peptídeo de fusão, o qual medeia a fusão das membranas no endossomo (MODIS *et al.*, 2004; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

Como principal proteína de superfície, a proteína E é o alvo da resposta imune protetora, induzindo a geração de anticorpos neutralizantes. Esta resposta imune humoral é

altamente dependente da conformação nativa da proteína (GUBLER; KUNO; MARKOFF, 2007; WHITEHEAD *et al.*, 2007).

Além de produzir partículas virais, células infectadas com flavivírus também secretam partículas subvirais durante o curso natural da infecção. As partículas subvirais são compostas apenas de prM/E imersas num envelope lipídico, não contendo capsídeo e genoma viral (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; GUBLER; KUNO; MARKOFF, 2007). Estas partículas também são secretadas através da co-expressão de prM/E em células eucarióticas (MASON; SHUSTOV; FROLOV, 2006; WANG *et al.*, 2009). Apesar das diferenças no tamanho e estrutura comparados as partículas virais (KUHN *et al.*, 2002), as partículas subvirais retêm a capacidade hemaglutinante e de fusão, conferindo proteção quando avaliadas como imunizante (KONISHI; FUJII, 2002).

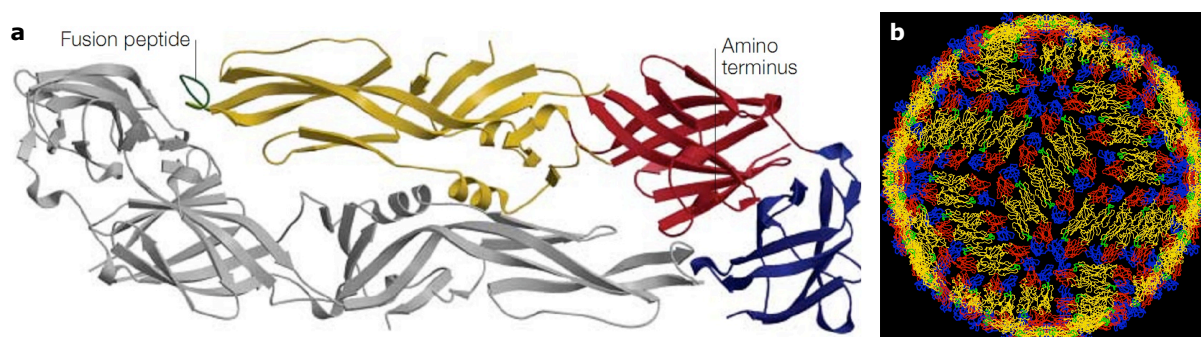


Figura 3. Proteína E, a principal glicoproteína da superfície viral. Em (a), a proteína E é apresentada na sua estrutura homodimérica. Em (b), a mesma estrutura mostrada em (a) distribuída na superfície viral. Os domínios I, II e III são representados em vermelho, amarelo e azul, respectivamente. **Fonte:** (a) (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005); (b) (KUHN *et al.*, 2002).

Envolvida nos estágios iniciais da replicação, a glicoproteína NS1 apresenta doze resíduos de cisteína conservados entre os flavivírus. É uma proteína glicosilada, encontrada na matriz intracelular, na superfície celular (na forma de dímeros) e extracelularmente (na forma de hexâmeros). Sua glicosilação é de fundamental importância para a sua função, secreção e processamento (CHANG, 1997; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). A forma secretada da proteína NS1 estimula a geração de anticorpos com atividade de fixação do complemento e sua imunização é capaz de gerar proteção (CHANG, 1997; COSTA; FREIRE; ALVES, 2006). A proteína NS1 também tem sido implicada na patogenicidade da infecção (ALCON-LEPODER *et al.*, 2005; CHUNG *et al.*, 2006) e, mais recentemente, vem sendo utilizada como marcador precoce da infecção por DENV (ALCON *et al.*, 2002).

Com aproximadamente 22 kDa, a proteína NS2a é uma pequena proteína associada a membrana. Suas regiões hidrofóbicas, importantes para a sua localização, são conservadas em posição entre os flavivírus. Ela é fundamental no processamento da proteína NS1 e parece

coordenar a transição entre a replicação do RNA viral e o seu empacotamento na partícula viral (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). A proteína NS2a está associada aos sítios de replicação do genoma viral e é capaz de interagir com componentes do complexo de replicação (RC, *replication complex*) (MACKENZIE *et al.*, 1998). Uma mutação nesta proteína bloqueou a secreção de partículas virais, indicando o envolvimento dela na formação da partícula viral (LEUNG *et al.*, 2008).

A proteína NS2a também está envolvida nos mecanismos de evasão da resposta imune, atuando como antagonista da via de sinalização do interferon (IFN) tipo I em DENV (MUNOZ-JORDAN *et al.*, 2003) e inibindo a via de indução do IFN tipo I em WNV (LIU *et al.*, 2006). Além disso, tem sido associado a ela um papel na disseminação viral no mosquito vetor (MCELROY *et al.*, 2006a).

Assim como a proteína NS2a, a proteína NS2b é hidrofóbica e está associada a membrana. Ela atua como cofator para a proteína NS3, sendo fundamental para a atividade proteolítica do complexo NS3-NS2b, a protease viral (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). Com aproximadamente 70kDa, a proteína NS3 é uma proteína multifuncional, envolvida no processamento da poliproteína viral e na replicação do genoma viral (CHANG, 1997). Ambas as funções requerem domínios distintos da proteína: a atividade proteolítica está localizada na região N-terminal, a qual interage com a proteína NS2b; As atividades RNA helicase, nucleosídeo 5'-trifosfatase (NTPase) e RNA trifosfatase (RTPase) residem na região C-terminal da proteína e são essenciais na replicação do RNA viral (MATUSAN *et al.*, 2001; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

Mais recentemente, foi mostrado que a proteína NS3 desempenha um papel fundamental na formação da partícula viral, independente das suas funções enzimáticas conhecidas (PATKAR; KUHN, 2008). Ela também parece estar envolvida na patogenicidade, induzindo apoptose (SHAFEE; ABUBAKAR, 2003). Por ser amplamente conservada entre os flavivírus e desempenhar função crucial em diversas etapas do ciclo replicativo, a inibição da proteína NS3 tem sido considerada uma valiosa estratégia de intervenção para o tratamento das infecções causadas por flavivírus (LESCAR *et al.*, 2008).

As proteínas NS4a e NS4b são pequenas proteínas hidrofóbicas, associadas a membrana. Assim como as proteínas NS2a e NS2b, apresentam suas regiões hidrofóbicas conservadas em posição entre os flavivírus (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). Ambas as proteínas estão envolvidas na replicação do genoma viral: a proteína NS4a está presente nos sítios de replicação do genoma viral, onde interage com a proteína NS1. Ela também é capaz de induzir alterações de membrana no RC (MACKENZIE *et al.*, 1998; LINDENBACH; RICE, 1999; MILLER *et al.*, 2007); a proteína NS4b também é um dos componentes do RC.

Nele, ela interage com a proteína NS3 e com o RNA viral de fita dupla, um intermediário da replicação do genoma viral (MILLER; SPARACIO; BARTENSCHLAGER, 2006; UMAREDDY *et al.*, 2006).

Ambas as proteínas também estão envolvidas nos mecanismos de evasão da resposta imune. Em DENV, as proteínas NS4a e NS4b, juntamente com a proteína NS2a, inibem a via de sinalização do IFN tipo I. A proteína NS4b é o principal antagonista desta via e esta função é compartilhada por proteínas NS4b de outros flavivírus (MUNOZ-JORDAN *et al.*, 2003; MUNOZ-JORDAN *et al.*, 2005). Além disso, ela tem sido implicada, juntamente com a proteína NS2a, na disseminação viral no mosquito vetor (MCELROY *et al.*, 2006a).

Amplamente conservada entre os flavivírus, a proteína NS5 é uma proteína multifuncional fosforilada, envolvida na replicação viral. Apresenta dois domínios funcionais: o domínio 5'-metiltransferase (MTase), localizado na região N-terminal da proteína e o domínio RdRP (*RNA-dependent RNA polymerase*), residindo na região C-terminal (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007; BHATTACHARYA *et al.*, 2009; ISSUR *et al.*, 2009).

Apresentando um sítio de ligação para o trifosfato de guanosina (GTP), o domínio MTase participa da formação do cap tipo I nos RNA virais, a qual é dependente de elementos específicos na região 5'-UTR (RAY *et al.*, 2006). O domínio RdRP atua como a polimerase viral, responsável pela síntese dos RNAs virais (ACKERMANN; PADMANABHAN, 2001). Localizada nos sítios de replicação do genoma viral, a proteína NS5 forma o complexo replicativo com a proteína NS3. Ela é capaz de estimular as atividades NTPase e RTPase da proteína NS3, envolvidas na replicação (YON *et al.*, 2005; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

Além da sua função na replicação do RNA, a proteína NS5 também tem sido implicada em mecanismos de evasão da resposta imune, atuando como antagonista da via de sinalização do IFN tipo I em diversos flavivírus (LIN *et al.*, 2006; ASHOUR *et al.*, 2009; LAURENT-ROLLE *et al.*, 2010) e patogenicidade, induzindo a transcrição e tradução de IL-8 (MEDIN; FITZGERALD; ROTHMAN, 2005). A proteína NS5 é também um dos principais alvos no desenvolvimento de compostos antivirais (DONG; ZHANG; SHI, 2008).

1.2.1. Ciclo replicativo viral

Diferentes linhagens celulares são permissivas a infecção *in vitro* e *in vivo* por DENV e outros flavivírus. Após a adsorção do vírion na superfície celular, sua entrada na célula

ocorre via endocitose mediada por receptor específico para a proteína E [Figura 4, (1)]. Apesar dos inúmeros receptores descritos (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007), o receptor DC-SIGN é o receptor mais bem caracterizado e medeia a infecção por DENV em células dendríticas (TASSANEETRITHEP *et al.*, 2003). Contudo, é possível que mais de um receptor esteja envolvida na adsorção e entrada do vírus na célula (POKIDYSHEVA *et al.*, 2006).

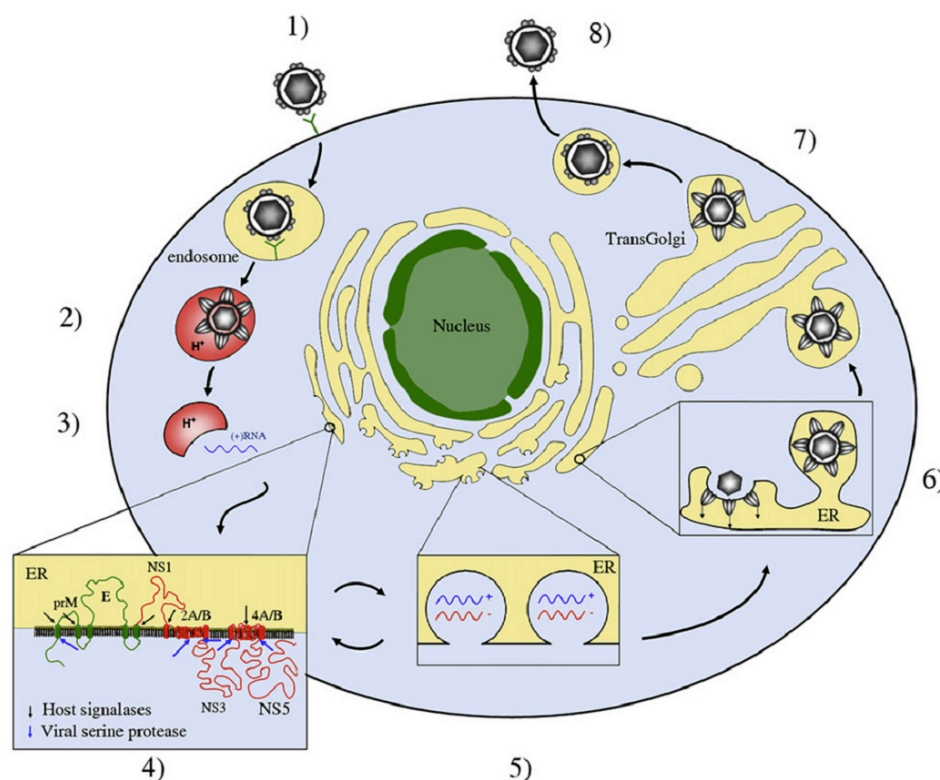


Figura 4. Ciclo replicativo dos flavivírus. Os flavivírus são internalizados via endocitose mediada por receptor (1) e direcionados ao endossomo precoce, onde a acidificação da organela induz a fusão (2) entre sua membrana e o envelope viral, levando a liberação do genoma viral (3). A tradução do RNA viral é seguida pelo processamento da poliproteína viral por proteases virais e celulares (4). Após a tradução, o complexo replicativo é formado e associado a estruturas membranosas induzidas pelo vírus, onde a replicação ocorre (5). A partir do RNA (+), o RC sintetiza o RNA (-), o qual serve de molde para síntese de novos RNA (+). A progênie de RNA (+) pode iniciar um novo ciclo de tradução ou ser empacotado em partículas virais. O empacotamento viral (6) ocorre na superfície do retículo endoplasmático (RE), seguido pelo brotamento das proteínas estruturais e da progênie de RNA (+) no lúmen do RE. As partículas virais imaturas resultantes são transportadas para o *trans*-Golgi, onde a clivagem de prM em M pela furina leva a maturação das partículas virais (7) que são liberadas por exocitose (8). **Fonte:** (FERNANDEZ-GARCIA *et al.*, 2009).

Uma vez internalizado, o vírus é direcionado ao compartimento endossomal precoce (CHANG, 1997; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). Nele, o baixo pH induz um rearranjo conformacional irreversível na proteína E [Figura 4, (2)], levando a sua trimerização e exposição do peptídeo de fusão. Isto resulta na fusão do envelope viral com a membrana endossomal e liberação do capsídeo viral no citoplasma [Figura 4, (3)] (KUHN *et al.*, 2002;

MODIS *et al.*, 2004; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). A eficiência de fusão é influenciada pela composição das membranas lipídicas (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

No citoplasma, o capsídeo viral dissocia-se liberando o RNA viral. Conforme descrito anteriormente, o RNA viral apresenta uma estrutura similar ao RNAm celular, exceto pela ausência de uma cauda poli-A na sua extremidade 3'. A tradução do genoma origina uma poliproteína viral, a qual é processada por proteases virais e celulares [Figura 4, (4)] (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). A tradução e a replicação dos flavivírus ocorre em associação a estruturas intracelulares membranosas derivadas do retículo endoplasmático (RE) (MACKENZIE *et al.*, 1998; WELSCH *et al.*, 2009).

Diversos domínios e estruturas secundárias conservadas nas regiões 5'-UTR, 3'-UTR e na região codificante da proteína C (Figura 5a e 5b) têm sido identificadas como importantes para a tradução ou replicação do genoma viral (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; VILLORDO; GAMARNIK, 2009). Na tradução, os domínios DB1, DB2, VR e, particularmente 3'SL, todos na região 3'UTR (Figura 5b), contribuem para aumentar a eficiência de tradução e é dependente de cap (HOLDEN; HARRIS, 2004; CHIU; KINNEY; DREHER, 2005). O domínio cHP (Figura 5a), uma estrutura secundária localizada na região codificante da proteína C, é crucial na seleção do códon de iniciação da tradução pelo ribossomo, além de ter um papel importante na replicação do genoma (CLYDE; HARRIS, 2006).

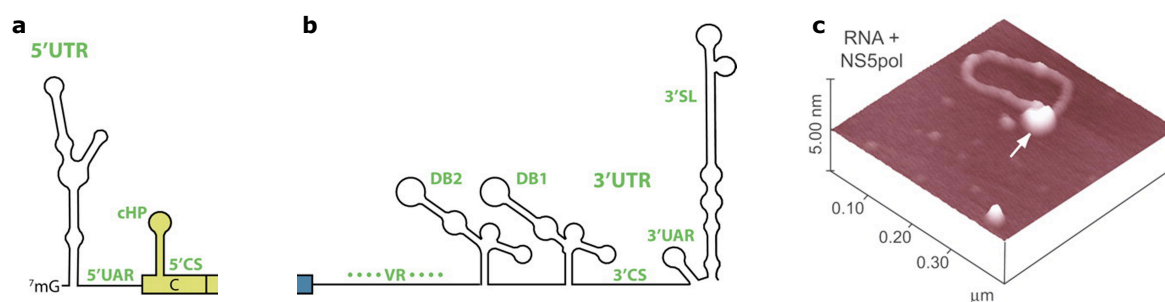


Figura 5. Regiões 5'-UTR e 3'-UTR de DENV e suas funções na circularização do genoma viral. Em (a) e (b), as regiões 5'UTR e 3'UTR de DENV, respectivamente. Ambas as regiões apresentam estruturas secundárias conservadas em outros flavivírus e importantes na tradução e replicação do genoma viral. Em (c), uma micrografia de microscopia de força atômica, mostrando a importância das estruturas secundária nas regiões 5'-UTR e 3'-UTR na circularização do genoma viral e na interação com a proteína NS5, a polimerase viral. **Fonte:** (a) e (b) (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006), modificado pelo autor; (c) (FILOMATORI *et al.*, 2006).

Como os flavivírus utilizam o mesmo RNA (+) para a tradução e replicação do genoma, os dois processos não podem ocorrer simultaneamente. Assim, após a tradução das proteínas virais inicia-se a replicação do genoma (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006). Os

domínios 5'CS, 3'CS, 5'UAR e 3'UAR são elementos específicos nas regiões 5'-UTR e 3'-UTR que apresentam seqüências complementares invertidas. Eles são requeridos para a circularização do genoma (Figura 5c), a estratégia de replicação dos flavivírus (ALVAREZ; LODEIRO *et al.*, 2005; ALVAREZ; FILOMATORI; GAMARNIK, 2008; VILLORDO; GAMARNIK, 2009). Além de atuarem na tradução, os domínios DB1, DB2, VR e 3'SL da região 3'UTR também estão envolvidos na regulação da síntese de RNA viral (ALVAREZ; DE LELLA EZCURRA *et al.*, 2005; ALVAREZ; FILOMATORI; GAMARNIK, 2008; VILLORDO; GAMARNIK, 2009).

A replicação inicia-se com a síntese do RNA de orientação negativa [RNA (-)], o qual serve de molde para a síntese de novas moléculas de RNA (+) [Figura 4, (5)]. Durante a replicação, o RNA (+) é produzido em excesso em relação ao RNA (-). Assim, a replicação dos flavivírus é dita assimétrica (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). A proteína NS5 é recrutada ao sítio de iniciação da síntese pelo promotor SLA, localizado na região 5'-UTR (FILOMATORI *et al.*, 2006). O RC dos flavivírus está associado a membranas, derivadas do RE e induzidas pelas proteínas virais (WELSCH *et al.*, 2009). Nele, o RNA viral interage com as diversas proteínas NS e, possivelmente, fatores celulares (MACKENZIE *et al.*, 1998; LINDENBACH; RICE, 1999; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007; MILLER *et al.*, 2007). Distintos tipos de RNA tem sido detectados nas células infectadas com flavivírus, incluindo: o RNA genômico, o RF (a forma replicativa em dupla fita) e o RI (o intermediário replicativo). Mais recentemente, um RNA não-codificante, derivado da região 3'-UTR, tem sido detectado em células infectadas por flavivírus. Ele é requerido para a patogenicidade (PIJLMAN *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2010).

A progênie de RNA (+) formada pode iniciar um novo ciclo de tradução ou ser empacotado em partículas virais [Figura 4, (6)]. A morfogênese viral ocorre em associação com membranas intracelulares (WELSCH *et al.*, 2009). A interação da proteína C com o RNA viral genômico leva a formação do capsídeo, o qual adquire o envelope viral via brotamento no lúmen do RE (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). O envelope viral apresenta as proteínas prM/E na sua forma heterodimérica, que protege a exposição do peptídeo de fusão na proteína E. A partir daí, a partícula viral imatura segue pela via secretória celular. No complexo de Golgi, a proteína prM sofre uma clivagem dependente de pH pela furina [Figura 4, (7)] (LI *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2008). Após a clivagem, o heterodímero prM-E dissocia-se, levando a formação de homodímeros de E, encontrado na partícula viral madura (KUHN *et al.*, 2002; MODIS *et al.*, 2004). A partícula viral madura é, então, liberada por exocitose [Figura 4, (8)].

1.3. Sistemas de genética reversa em flavivírus

Um sistema de genética reversa é uma poderosa ferramenta que permite a direta manipulação do genoma de um vírus de RNA, a partir de seu cDNA clonado (RUGGLI; RICE, 1999). Diferentes estratégias têm sido desenvolvidas, levando em consideração a organização do genoma viral (POLO *et al.*, 1997; PEKOSZ; HE; LAMB, 1999; NEUMANN *et al.*, 2005; KOBAYASHI *et al.*, 2007; MISCHKALE *et al.*, 2010).

O primeiro sistema de genética reversa para flavivírus foi desenvolvido a cerca de 20 anos, com a descrição da construção do clone infeccioso do YFV (RICE *et al.*, 1989). Desde então, foram descritos a construção de clones infecciosos para diversos flavivírus: DENV1 (PURI *et al.*, 2000), DENV2 (KINNEY *et al.*, 1997; POLO *et al.*, 1997), DENV3 (BLANEY *et al.*, 2004), DENV4 (LAI *et al.*, 1991), WNV (YAMSHCHIKOV *et al.*, 2001) e JEV (YUN *et al.*, 2003), entre outros.

Uma das principais dificuldades no estabelecimento de um sistema de genética reversa para flavivírus é a instabilidade do cDNA clonado do genoma viral em sistemas procariotos (RUGGLI; RICE, 1999). A ocorrência de mutações indesejadas é um problema recorrente nestes sistemas (BOYER; HAENNI, 1994; POLO *et al.*, 1997). Tem sido sugerido que a junção entre NS1-E no genoma viral, ou um produto tóxico derivado desta região, seja responsável pela instabilidade destes clones infecciosos, apesar das razões para esta instabilidade não serem bem compreendidas (POLO *et al.*, 1997; BLANEY *et al.*, 2004).

Diferentes abordagens têm sido empregadas para superar estes problemas de instabilidade, incluindo uso de plasmídeos *low-copy* (BREDENBEEK *et al.*, 2003), *Bacterial Artificial Chromosomes* (BACs) (SUZUKI *et al.*, 2007), diferentes linhagens de *Escherichia coli* (BREDENBEEK *et al.*, 2003), introdução de um *linker* (BLANEY *et al.*, 2004), uso de levedura (POLO *et al.*, 1997) e clonagem do genoma viral em sistema de dois plasmídeos (RICE *et al.*, 1989; SUMIYOSHI; HOKE; TRENT, 1992; KAPOOR *et al.*, 1995).

Com o intuito de expandir as ferramentas experimentais para o estudo dos flavivírus, os sistemas de genética reversa baseado em *replicons* subgenômicos ou RNAs auto-replicativos vêm ganhando grande importância nos últimos anos (KHROMYKH; WESTAWAY, 1997). Apresentando uma ou mais proteínas estruturais deletadas, os *replicons* são competentes em replicação autônoma, mas incapazes de formar partículas virais infecciosas (KOFER *et al.*, 2004; JONES; PATKAR; KUHN, 2005; WIDMAN *et al.*, 2008). Uma das grandes vantagens dos *replicons* é o isolamento da replicação do genoma da

morfogênese viral, os quais são acoplados (KHROMYKH *et al.*, 2001), permitindo um mapeamento preciso das proteínas, domínios e seqüências no RNA diretamente envolvidas na replicação viral (KHROMYKH; WESTAWAY, 1997).

A construção de *replicons* já foi descrita para diversos flavivírus, incluindo: DENV2 (JONES *et al.*, 2005), DENV3 (MOSIMANN *et al.*, 2010), YFV (JONES; PATKAR; KUHN, 2005), JEV (ISHIKAWA *et al.*, 2008), WNV (WIDMAN *et al.*, 2008), vírus da encefalite transmitida por carrapatos (*Tick-borne Encephalitis virus*, TBEV) (KOFLEER *et al.*, 2004) e vírus Kunjin (*Kunjin virus*, KUNV) (KHROMYKH; WESTAWAY, 1997).

Os sistemas de genética reversa para flavivírus têm permitido a elucidação de vários aspectos do ciclo de vida viral, incluindo: o papel das proteínas virais no ciclo replicativo (LINDENBACH; RICE, 1999; MATUSAN *et al.*, 2001; LEUNG *et al.*, 2008; PATKAR; KUHN, 2008), na disseminação viral no mosquito vetor (MCELROY *et al.*, 2006a; MCELROY *et al.*, 2006b) e na patogenicidade e/ou nos mecanismos de evasão da resposta imune (LIU *et al.*, 2006; HERSHKOVITZ *et al.*, 2008; LAURENT-ROLLE *et al.*, 2010); nas seqüências e domínios no RNA viral, envolvidos na regulação da tradução (HOLDEN; HARRIS, 2004; CLYDE; HARRIS, 2006) e replicação (ALVAREZ; DE LELLA EZCURRA *et al.*, 2005; ALVAREZ; LODEIRO *et al.*, 2005; ALVAREZ; FILOMATORI; GAMARNIK, 2008). Eles também têm facilitado a avaliação de drogas antivirais (PUIG-BASAGOITI *et al.*, 2005; ROSSI *et al.*, 2005; NG *et al.*, 2007).

Contudo, um dos principais usos dos sistemas de genética reversa é o desenvolvimento de vacinas. Uma das estratégias mais promissoras é a tecnologia ChimeriVax®, na qual os genes prM/E do YFV 17D são substituídos pelos respectivos genes do DENV1-4. Em ensaios clínicos, a vacina mostrou-se segura e imunogênica (GUY *et al.*, 2008). A mesma tecnologia tem sido aplicada a outros flavivírus (MONATH *et al.*, 2003; ARROYO *et al.*, 2004).

Numa outra estratégia, uma deleção de 30 nt introduzida na região 3'-UTR do DENV4 foi capaz de atenuar o vírus sem perder imunogenicidade (DURBIN *et al.*, 2005). Apesar de promissora, o grupo vem encontrando dificuldades em atenuar outros sorotipos com a mesma deleção (BLANEY *et al.*, 2004; BLANEY *et al.*, 2008).

Usando *replicons*, uma das estratégias mais inovadoras é a tecnologia RepliVax®. Nela, um *replicon* de WNV contendo a proteína C deletada (WIDMAN *et al.*, 2008) tem os genes prM/E substituídos pelos do DENV2. A vacina apresentou eficácia e imunogenicidade em camundongos (SUZUKI; WINKELMANN; MASON, 2009). Estratégia similar também se mostrou promissora para JEV (ISHIKAWA *et al.*, 2008).

Como vetores vacinais ou vetores de expressão para genes heterólogos, os *replicons* apresentam uma série de vantagens em relação aos vetores convencionais, incluindo: altos

níveis de expressão gênica pela capacidade de replicação autônoma; replicação exclusivamente citoplasmática, eliminando qualquer possibilidade de integração cromossômica; incapacidade de realizar mais de um ciclo de infecção, fazendo deles um instrumento seguro para o desenvolvimento de vacinas; e genoma pequeno que permite fácil manipulação (VARNAVSKI; YOUNG; KHRONYKH, 2000; ANRAKU *et al.*, 2002). Outra qualidade dos *replicons* são as diferentes formas nas quais eles podem ser utilizados como imunizante: DNA (CHANG *et al.*, 2008), RNA (ABERLE *et al.*, 2005) ou partículas defectivas (ISHIKAWA *et al.*, 2008; WIDMAN *et al.*, 2008; SUZUKI; WINKELMANN; MASON, 2009).

1.3.2. Técnica de recombinação homóloga em levedura

A capacidade que fragmentos lineares de DNA tem de estimular recombinação em *Saccharomyces cerevisiae* tem levado ao rápido desenvolvimento de metodologias para a manipulação de DNA em levedura (OLDENBURG *et al.*, 1997).

Uma das metodologias mais amplamente empregadas é a clonagem baseada na técnica de recombinação homóloga em levedura (SHANKS *et al.*, 2009). Nesta estratégia, um fragmento qualquer de DNA, contendo seqüências homólogas ao vetor nas suas extremidades, pode ser diretamente clonado por recombinação *in vivo* neste vetor linearizado. Múltiplos fragmentos de DNA podem ser corretamente recombinados numa única molécula, demonstrando a robustez da técnica (GIBSON, 2009; GIBSON *et al.*, 2009).

Um dos requerimentos básicos da técnica de recombinação homóloga em levedura é a presença de homologia suficiente nas extremidades dos fragmentos ou do vetor a serem recombinados para recrutar a maquinaria de recombinação. Inicialmente, acreditava-se que uma homologia maior que 100 pb era necessária para induzir recombinação. Contudo, diferentes trabalhos tem demonstrado que uma homologia entre 15 – 50 pb é suficiente para mediar o processo (OLDENBURG *et al.*, 1997; GIBSON, 2009).

Além de ser um método simples, eficiente e robusto, a técnica de recombinação homóloga em levedura não é limitada a presença de sítios de restrição, como os sistemas procariotos convencionais, nos quais múltiplas etapas de amplificação e clonagem são necessárias (SHANKS *et al.*, 2009).

Suas aplicações incluem a clonagem de genes e construção de genes quiméricos (OLDENBURG *et al.*, 1997), a clonagem de grandes fragmentos de DNA em projetos de

sequenciamento genômico (RAYMOND; SIMS; OLSON, 2002) e a construção de vetores (SHANKS *et al.*, 2009). Mais recentemente, a técnica de recombinação homóloga em levedura tem sido empregada com sucesso na construção de genomas procariotos (GIBSON; BENDERS; ANDREWS-PFANNKOCH *et al.*, 2008; GIBSON; BENDERS; AXELROD *et al.*, 2008). Visando superar o problema da instabilidade dos genomas virais em *E. coli*, ela também vem sendo utilizada na construção de clones infecciosos de flavivírus (POLO *et al.*, 1997; PURI *et al.*, 2000).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

- Desenvolver um sistema de genética reversa para o vírus dengue tipo 3 (DENV3), isolado em Recife.

2.2. Objetivos específicos

1. Construir um clone infeccioso do DENV3, isolado em Recife.
2. Recuperar vírus infeccioso a partir do clone infeccioso construído.
3. Realizar a caracterização *in vitro* do vírus recuperado a partir do clone infeccioso.

3. Materiais e Métodos

3.1. Cultivo de células e vírus

Nos experimentos, células BHK-21 e Vero foram mantidas em meio MEM (*Minimum Essential Medium*), suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (penicilina e estreptomicina). Os estoques de vírus recuperados foram crescidos em células BHK-21. O DENV3 selvagem (*wild type*) foi crescido em células C6/36, mantidas em meio L-15 (*Leibovitz*) suplementado com 2% SFB e antibióticos (penicilina e estreptomicina). Todos os vírus foram titulados em células BHK-21 e/ou Vero por ensaio de placa.

3.2. Construção e recuperação do clone infeccioso DENV3

3.2.1. Amplificação dos fragmentos de recombinação por PCR

Plasmídeo pBSC-IC-DENV3-pA

O plasmídeo pA foi construído por recombinação homóloga em levedura com dois fragmentos (vetor pBSC + inserto). Inicialmente, cerca de 4 µg do plasmídeo pBSC-HDR, um vetor *shuttle* com capacidade de se replicar em *E. coli* e em levedura, foi digerido com as enzimas EcoRI/RsrII. Durante o curso dos experimentos, houve uma série de dificuldades em digerir o plasmídeo eficientemente. As principais razões foram o grande tamanho do plasmídeo (aproximadamente 25 Kb) e a qualidade do DNA extraído. Por estas razões, optou-se por amplificar o vetor por PCR.

O segundo fragmento, contendo a região das proteínas estruturais, foi amplificado por PCR e contém um sítio para a enzima BamHI na extremidade 3'. Para 50 µL de reação de PCR foram utilizados 1X do tampão KlenTaq-LA polimerase (Clontech), 1,3% DMSO, 0,4 M *betaine* (Sigma), 200 µM de cada dNTP, 1U KlenTaq-LA polimerase (Clontech), 20 pmol de primer específicos e 100 ng de DNA molde. As condições de PCR foram: 5 min à 95°C para

desnaturação inicial, seguida de 30 ciclos, cada ciclo composto de 1 min de desnaturação à 93°C, 1 min de pareamento à 56°C, 2,5 min de extensão a 72°C, e 15 min finais de extensão.

O vetor e o inserto foram separados em gel de agarose. As bandas, correspondentes aos segmentos necessários a recombinação, foram excisadas do gel e purificadas com o kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante.

Plasmídeo pBSC-IC-DENV3-pB

Os fragmentos necessários para a recombinação foram amplificados por PCR e denominados por PCRI, PCRII e PCRIII. Estes três fragmentos compõem praticamente toda a região das proteínas não-estruturais mais a região 3'-UTR. O PCRI apresenta um sítio para a enzima BamHI na extremidade 5'. Para 50 µL de reação de PCR foram utilizados 1X do tampão KlenTaq-LA polimerase (Clontech), 1,3% DMSO, 0,4 M *betaine* (Sigma), 200 µM de cada dNTP, 1U KlenTaq-LA polimerase (Clontech), 20 pmol de primer específicos e 100 ng de DNA molde. As condições de PCR foram: 5 min à 95°C para desnaturação inicial, seguida de 30 ciclos, cada ciclo composto de 1 min de desnaturação à 93°C, 1 min de pareamento à 56°C, 2,5 min de extensão a 72°C para os PCRI e PCRII ou 4,5 min para o PCRIII, e 15 min finais de extensão a 72°C.

Como descrito anteriormente, dadas as dificuldades encontradas em digerir o plasmídeo pBSC-HDR, optou-se por amplificá-lo por PCR. O vetor e os produtos de PCR (PCRI, PCRII e PCRIII) foram separados em gel de agarose. As bandas, correspondentes aos segmentos necessários a recombinação, foram excisadas do gel e purificadas com o kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante.

3.2.2. Transformação em levedura

Uma colônia da linhagem RFY206 (MATa *his3Δ200 leu2-3 lys2Δ201 ura3-52 trp1Δ::hisG*) (FINLEY; BRENT, 1994) de *S. cerevisiae* foi crescida em 5 mL de meio YPB (*Yeast Peptone Dextrose*), a 30°C *overnight* (O/N). No dia seguinte, foi preparado um inóculo com uma densidade ótica (*Optical Density*, OD) de 0,2 em meio YPB. Este inóculo foi incubado a 30°C até alcançar uma OD de 0,55. Então, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas uma vez com ddH₂O e transformadas por acetato de lítio (LiOAc), como descrito anteriormente (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Sucintamente, o *pellet* foi ressuscitado em 3 mL da solução 1X TE/LiOAc e distribuído em três tubos. As células foram concentradas por centrifugação e lavadas mais uma vez com a mesma solução. Em outros três tubos foi adicionado em cada um 6 µL do vetor pBSC, 30 µg DNA carreador *Salmon Sperm* (Invitrogen), 2 µL 1X TE e 2 µL 1X LiOAc. Em um dos tubos (recombinação, pA) foi adicionado 4 µL do produto de PCR (descrito anteriormente) mais 10 µL de ddH₂O. No segundo tubo (recombinação, pB) foi adicionado 8 µL PCRI, 3 µL PCRII e 3 µL PCRIII (descritos anteriormente). Como controle, no último tubo (vetor vazio), foi adicionado 14 µL de ddH₂O. Estas reações foram utilizadas para ressuspender os *pellets* de levedura.

Em seguida, foram adicionado 140 µL da solução 1X TE/LiOAc/PEG. A suspensão de células foi homogeneizada e incubada a 30°C por 40 min. Depois, foi adicionado 20 µL de DMSO. A suspensão foi levemente homogeneizada e incubada à 42°C, por 20 min. Por fim, as células foram coletadas por centrifugação e o *pellet* ressuscitado em 500 µL de uma solução de aminoácidos sem Triptofano (Trp). A suspensão foi plaqueada em placas contendo meio *Yeast Nitrogen Base* na ausência de Trp [YNB (-Trp)] e incubadas a 30° C por 3 dias.

3.2.3. Extração de DNA plasmidial de levedura

Colônias positivas foram selecionadas e crescidas em 5 mL de meio YNB (-Trp) a 30°C O/N. Este pré-inóculo foi diluído em 500 mL de meio YNB (-Trp) e crescido a 30°C por 2 dias. Após o período de incubação, as células foram concentradas por centrifugação e lavadas uma vez com ddH₂O.

O *pellet* foi ressuscitado em 4 mL de tampão SCE (1M Sorbitol, 100mM NaAc e 60 mM EDTA). Em seguida, 50 µL de zimolase (200 mg/mL) e 30 µL β-mercaptoetanol foram adicionados. As células foram incubadas a 37°C por 2 horas e depois concentradas por centrifugação. A partir desta etapa, a extração de DNA plasmidial foi realizada utilizando o kit *Plasmid Midi* (QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante.

3.2.4. Confirmação dos clones por sequenciamento

As regiões clonadas nos plasmídeos pA e pB foram amplificadas por PCR (conforme descrito anteriormente), purificadas e utilizadas nas reações de sequenciamento. As reações foram realizadas com o kit *ABI BigDye terminator cycle sequencing* (Applied Biosystems) e os produtos desta reação foram separados em um seqüenciador *ABI 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). As seqüências adquiridas foram analisadas com o auxílio do pacote de *softwares Lasergene* (DNA Star).

3.2.5. Recuperação do genoma completo do clone infeccioso DENV3 por ligação *in vitro*

As regiões clonadas nos plasmídeos pA e pB foram amplificadas por PCR, purificadas e digeridas com a enzima BamHI. Após uma segunda purificação, os dois fragmentos foram ligados *in vitro* pela T₄ DNA ligase, numa proporção molar 1:1. As reações de ligação foram incubadas a 16°C O/N e depois inativadas a 65°C.

3.2.6. Transcrição *in vitro*

O genoma do IC-DENV3, recuperado por ligação *in vitro*, foi purificado por fenol-clorofórmio, seguido por precipitação com etanol. A transcrição *in vitro* foi mediada pelo promotor T7. Os RNAs do IC-DENV3 foram produzidos com o kit *T7 MEGAscript in vitro transcription* (Ambion) com a adição do análogo ao cap tipo I (7-metil-guanosina), segundo as recomendações do fabricante.

3.2.7. Transfecção de células BHK-21 por eletroporação

Para a eletroporação, 2×10^6 células BHK-21 foram ressuspensas em 100 µL de *cytomix* (ANSARI *et al.*, 2004) e a suspensão de células foi misturada com 10-20 µg do RNA

transcrito *in vitro*. A eletroporação foi feita em cuvetas de 2 mm, seguindo as seguintes condições para o eletroporador ECM-830 (BTX): 1200 V (voltagem), 100 μ seg (duração do pulso) e 2 pulsos com intervalo de 1 seg entre pulsos. Após a transfecção, as células foram transferidas para meio MEM completo.

3.2.8. Ensaio de imunofluorescência

Células BHK-21, com 3-8 dias após a transfecção, foram fixadas em acetona/PBS (1:1, v/v) a 4°C por 10 min. Para a detecção de antígenos virais, as células foram incubadas a 37°C por 1 h com um anticorpo policlonal para flavivírus (diluído 1:100 em PBS), lavadas duas vezes com PBS, seguida pela incubação a 37°C por 1 h com um anticorpo secundário contra imunoglobulina G (α -IgG) de camundongo, marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), diluído 1:100 em PBS (Sigma). Por fim, as células foram marcadas com 0,1 mg/mL de *Hoechst* 33258. A microscopia de fluorescência foi realizada em nosso laboratório, utilizando o microscópio *DMI 4000B* (Leica).

3.3. Caracterização do clone infeccioso DENV3 *in vitro*

3.3.1. Infecção viral

Células BHK-21 foram infectadas com cada vírus recuperado à partir de cada clone infeccioso a uma MOI (*Multiplicity of Infection*) de 1-3. Após um período de adsorção de 2 horas, o inóculo foi removido e substituído com meio MEM contendo 5% de SFB e antibióticos (penicilina e estreptomicina). Após o aparecimento de efeito citopático, os vírus foram coletados, aliquotados e congelados a -80°C. O ensaio de infecção foi repetido por 3 passagens sucessivas para cada um dos vírus recuperados.

3.2.2. Confirmação da identidade dos vírus recuperados

Após a terceira passagem, o RNA dos vírus recuperados foi extraído a partir do sobrenadante de células infectadas, utilizando o kit *QIAamp Viral RNA* (QIAGEN). O DENV3 selvagem, crescido em células C6/36, foi usado como controle positivo. Os RNAs foram reversamente transcritos pela enzima *SuperScript III* (Invitrogen) e os cDNAs produzidos, amplificados por PCR usando o kit *HotStar HiFidelity Polymerase* (QIAGEN). Os produtos de PCR amplificados foram digeridos com enzima de restrição.

3.3.3. Sequenciamento dos vírus recuperados após sucessivas passagens em células BHK-21

Após a terceira passagem, o RNA dos vírus recuperados foi extraído a partir do sobrenadante de células infectadas, utilizando o kit *QIAamp Viral RNA* (QIAGEN). Os RNAs foram reversamente transcritos pela enzima *SuperScript III* (Invitrogen) e os cDNAs produzidos, amplificados por PCR usando o kit *HotStar HiFidelity Polymerase* (QIAGEN).

Os produtos de PCR amplificados foram purificados e utilizados nas reações de sequenciamento. As reações foram realizadas com o kit *ABI BigDye terminator cycle sequencing* (Applied Biosystems) e os produtos desta reação foram separados em um seqüenciador *ABI 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). As seqüências adquiridas foram analisadas com o auxílio do pacote de *softwares Lasergene* (DNA Star).

3.3.4. Caracterização dos vírus recuperados por ensaio de placa

Para os ensaios de placa, células BHK-21 ou Vero foram semeadas em placas de 6 poços, numa concentração de 4×10^5 células por poço 24 horas antes do ensaio. No dia do ensaio, as células foram infectadas com diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) de cada vírus em teste. O DENV3 selvagem, crescido em células C6/36, foi usado como controle positivo. Após 1 hora de adsorção a 37°C, o inóculo viral foi removido e as células cobertas com meio MEM semi-sólido, contendo 1% de agarose, 5% SFB e antibióticos (penicilina, estreptomicina e anfotericina B). As células foram incubadas a 37°C por nove dias.

Após o período de incubação, as placas ou *foci* formados foram revelados. Para os ensaios de placa em células BHK-21, as placas foram reveladas através da coloração com MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*), um solução de 5 mg/mL MTT em PBS. Nas células Vero, os *foci* foram revelados pela técnica de imunoperoxidase. Após a remoção do meio semi-sólido, as células foram fixadas em acetona/PBS (3:7, v/v) e incubadas a 37°C por 1 h com um anticorpo policlonal para flavivírus (diluído 1:100). Após as lavagens, as células foram incubadas a 37°C por 1 h com *HRP-rec-Protein G* (Zymed), diluído 1:500. Após as lavagens, os *foci* foram revelados pela adição do substrato da enzima.

4. Resultados

4.1. Abordagem inicial

Inúmeras tentativas sem sucesso foram realizadas na recuperação do clone infeccioso DENV3, a partir do genoma clonado em nosso laboratório. Visando eliminar os problemas de instabilidades encontrados, um *linker* foi introduzido próximo a junção E-NS1 do genoma viral (Figura 6). Este *linker* continha códons de terminação nas três fases de leitura, tanto na fita *sense* como na fita *anti-sense*, impedindo a expressão de qualquer produto tóxico que porventura estivesse sendo expresso. Após a construção do clone infeccioso, o *linker*, flanqueado por sítios de restrição, poderia ser removido por digestão enzimática e recircularizado por ligação *in vitro*, antes da transcrição *in vitro*.

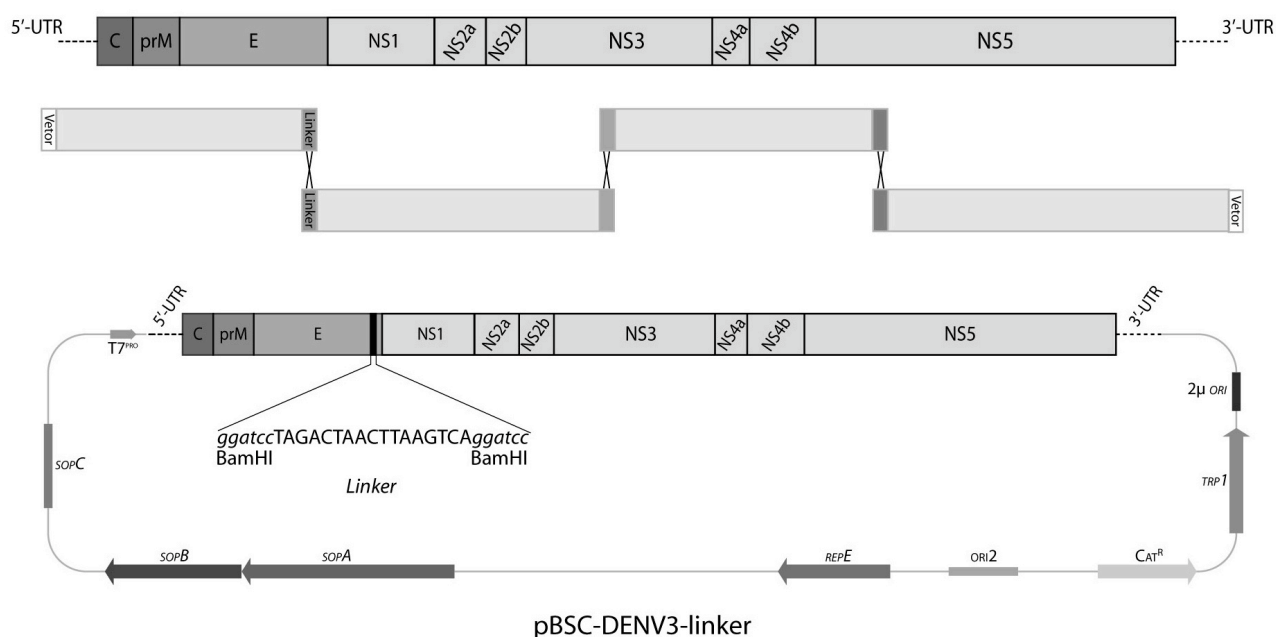


Figura 6. Diagrama esquemático da abordagem inicial da construção do clone infeccioso DENV3. O genoma viral do DENV3, amplificado em quatro fragmentos, foi clonado no vetor pBSC. Todos os fragmentos apresentam sequências homólogas nas extremidades. Próximo a junção entre E-NS1 foi introduzido um linker, flanqueado por sítios de restrição conforme descrito no texto.

O genoma do DENV3 foi amplificado por PCR em quatro fragmentos (Figura 7a), usando uma DNA polimerase de alta fidelidade. O *linker*, no nosso sistema flanqueado por sítios de restrição para a enzima *Bam*HI, foi introduzido entres os fragmentos F1 e F2 que

corresponde à região da junção E-NS1. A construção do clone infeccioso foi realizada através da técnica de recombinação homóloga em levedura. Os fragmentos, juntamente com o vetor *shuttle* pBSC linearizado (capaz de se replicar tanto em *E. coli* como em *Saccharomyce cerevisiae*), eram flanqueados por regiões homólogas e foram introduzidos na linhagem RFY206 da levedura *S. cerevisiae* por transformação com acetato de lítio (LiOAc). As colônias foram selecionadas em meio YNB (-Trp).

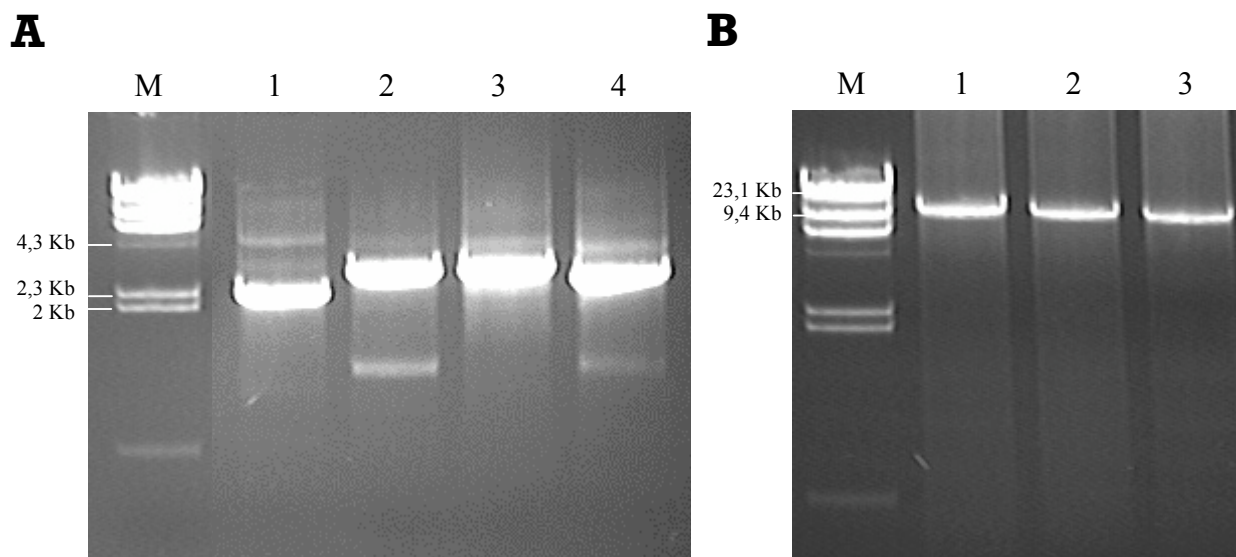


Figura 7. Abordagem inicial da construção do clone infeccioso DENV3. (a) O genoma viral foi amplificado em quatro fragmentos (F1-4, poços 1-4). O *linker* foi introduzido entre os fragmentos F1 e F2, correspondente a junção E-NS1. (b) PCR do genoma completo do clone infeccioso DENV3-*linker*, amplificado a partir de diferentes clones (poços 1-3).

Colônias positivas foram utilizadas para extração de DNA plasmidial e o DNA extraído (pBSC-DENV3-*linker*) usado na amplificação do genoma completo do DENV3 por PCR (Figura 7b). Os produtos de PCR (DENV3-*linker*) foram purificados e enviados para sequenciamento. A identidade da construção foi confirmada por sequenciamento (Figura 8). Os resultados do sequenciamento também mostraram que o *linker* introduzido não foi capaz de conferir estabilidade ao clone infeccioso na levedura nos diferentes clones analisados.

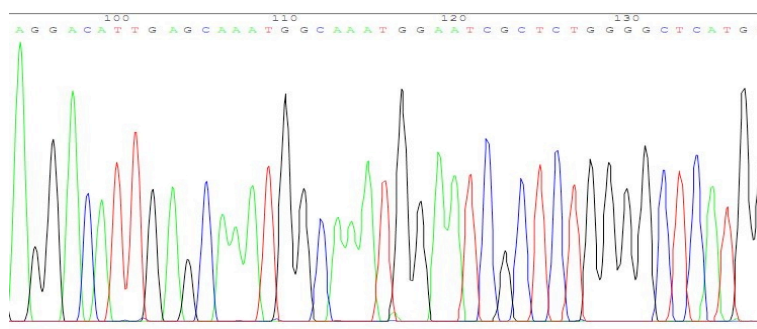


Figura 8. Eletroferograma representativo do sequenciamento dos clones DENV3-*linker*, evidenciando a qualidade das sequências obtidas.

Para excluir qualquer possibilidade de que as mutações encontradas no clone infeccioso já estivessem presentes nos fragmentos usados na recombinação, os mesmos também foram sequenciados. Nenhuma das mutações presentes no clone infeccioso foi encontrada nos fragmentos sequenciados.

4.2. Construção e recuperação do clone infeccioso DENV3 em sistema de 2 plasmídeos

Uma estratégia bastante difundida para resolver o problema da instabilidade nos sistemas de genética reversa é o uso do sistema de dois plasmídeos (Figura 9), no qual o cDNA do genoma viral é dividido em duas partes que são clonadas isoladamente. Para recuperar o clone infeccioso, as duas partes são ligadas *in vitro* e o produto da ligação transcrito *in vitro*. O RNA viral produzido é, então, introduzido em células suscetíveis para a recuperação do vírus.

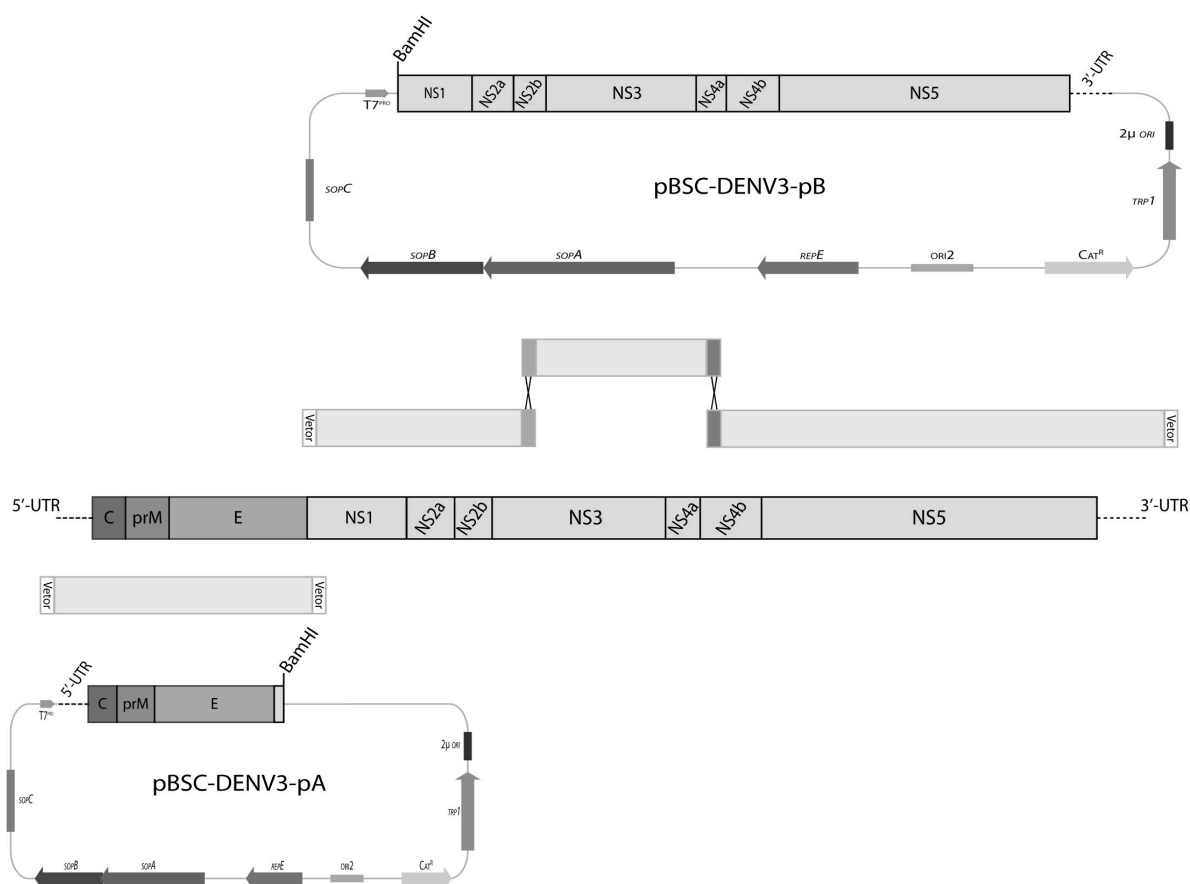


Figura 9. Diagrama esquemático da estratégia de construção do clone infeccioso DENV3 em sistema de 2 plasmídeos. Nesta estratégia, genoma viral é dividido em duas partes (pA e pB) que são clonadas isoladamente. Para a recuperação do clone infeccioso, as duas partes são unidas por ligação *in vitro*. Os plasmídeos pA e pB foram amplificados em um e três fragmentos, respectivamente.

Neste sistema, o genoma do DENV-3 foi dividido e clonado em dois plasmídeos (Figura 9). Todos os fragmentos foram amplificados por PCR, usando uma DNA polimerase de alta fidelidade. Ambos os plasmídeos foram construídos através da técnica de recombinação homóloga em levedura, conforme descrito anteriormente, usando o plasmídeo pBSC. No plasmídeo pBSC-DENV3-pA (pA), um único fragmento (Figura 10a) englobando a região 5'-UTR, a região codificante das proteínas estruturais e a porção inicial da sequência de NS1, seguida por um sítio de restrição para a enzima BamHI na extremidade 3' foi clonado. No plasmídeo pBSC-DENV3-pB (pB), toda a sequência de nucleotídeos, amplificada por PCR em três fragmentos (Figura 10a), correspondente a região codificante das proteínas não-estruturais mais a região 3'-UTR, além de um sítio de restrição para a enzima BamHI na extremidade 5', foi clonada.

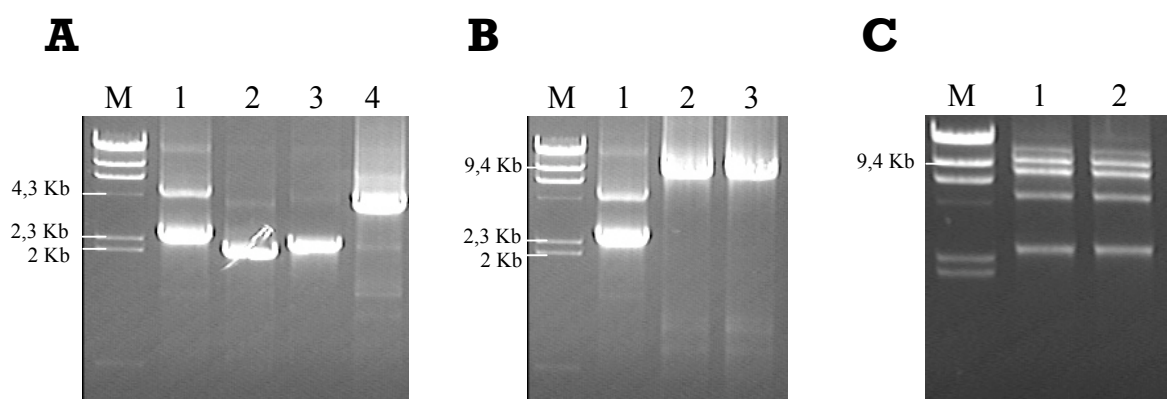


Figura 10. Construção do clone infeccioso DENV3 em sistema de 2 plasmídeos. (a) Fragmentos utilizados na construção dos plasmídeos pA (poço 1) e pB (poços 2-4), amplificados por PCR. (b) As duas partes (pA e pB) do genoma viral após amplificação por PCR e digestão enzimática: pA#4 (poço 1), pB#2 (poço 2) e pB#3 (poço 3). (c) Ligação *in vitro* dos fragmentos pA e pB, após digestão enzimática: IC-DENV3 #L42 (poço 1) e IC-DENV3 #L43 (poço 2). * Banda correspondente ao genoma viral completo, recuperado por ligação *in vitro*.

Colônias positivas foram utilizadas para extração de DNA plasmidial. As duas partes do genoma, clonadas nos plasmídeos pA e pB, foram amplificadas por PCR e enviadas para sequenciamento. A identidade das construções foi confirmada por sequenciamento. Pela análise de sequenciamento, um clone do plasmídeo pA (pBSC-DENV3-pA #4) e dois clones do plasmídeo pB (pBSC-DENV3-pB #2 e pBSC-DENV3-pB #3) foram selecionados.

Nenhuma mutação foi identificada no plasmídeo pBSC-DENV3-pA #4 selecionado. No plasmídeo pBSC-DENV3-pB, apenas uma mutação em cada um dos clones foi identificada. No clone pBSC-DENV3-pB #2, a mutação foi localizada na posição 7878 (Tabela 1). A mutação leva a uma mudança de aminoácido no gene da proteína NS5

(mudança de lisina para arginina). No clone pBSC-DENV3-pB #3, a mutação identificada na posição 10.165 (Tabela 2) é silenciosa.

Tabela 1. Mutação entre o pBSC-DENV3-pB #2 e o vírus parental, identificada por sequenciamento

Nº mutação	nº nt	Seqüência		Região	Mudança aa
		Clone infeccioso	Vírus Parental		
1	7878	A	G	NS5	K105R

Para a construção do clone infeccioso *in vitro*, as duas partes do genoma clonadas nos plasmídeos pA (pA#4) e pB (pB#2 e pB#3) foram amplificadas por PCR, purificadas e digeridas com a enzima BamHI (Figura 10b). Após a digestão, os produtos foram purificados e ligados *in vitro* (Figura 10c), usando a T4 DNA ligase. Os produtos da ligação (IC-DENV3 #L42 e IC-DENV3 #L43) foram purificados por extração fenol/clorofórmio, precipitado por etanol e utilizado em reações de transcrição *in vitro* para a síntese de RNA viral. A transcrição foi mediada pelo promotor da enzima T7 RNA polimerase.

Tabela 2. Mutação entre o pBSC-DENV3-pB #3 e o vírus parental, identificada por sequenciamento

nº mutação	nº nt	Seqüência		Região	Mudança aa
		Clone infeccioso	Vírus Parental		
1	10165	T	C	NS5	Não (silenciosa)

Os RNAs virais produzidos foram transfectados em células BHK-21 por eletroporação. Células BHK-21 transfectadas foram fixadas em diferentes períodos de tempo e avaliadas em ensaios de imunofluorescência (Figura 11) para a detecção de antígenos virais. As primeiras células positivas foram detectadas quatro dias após a transfecção em ambos os clones (IC-DENV3 #L42 e IC-DENV3 #L43) e os primeiros sinais de efeito citopático foram observados oito dias após a transfecção.

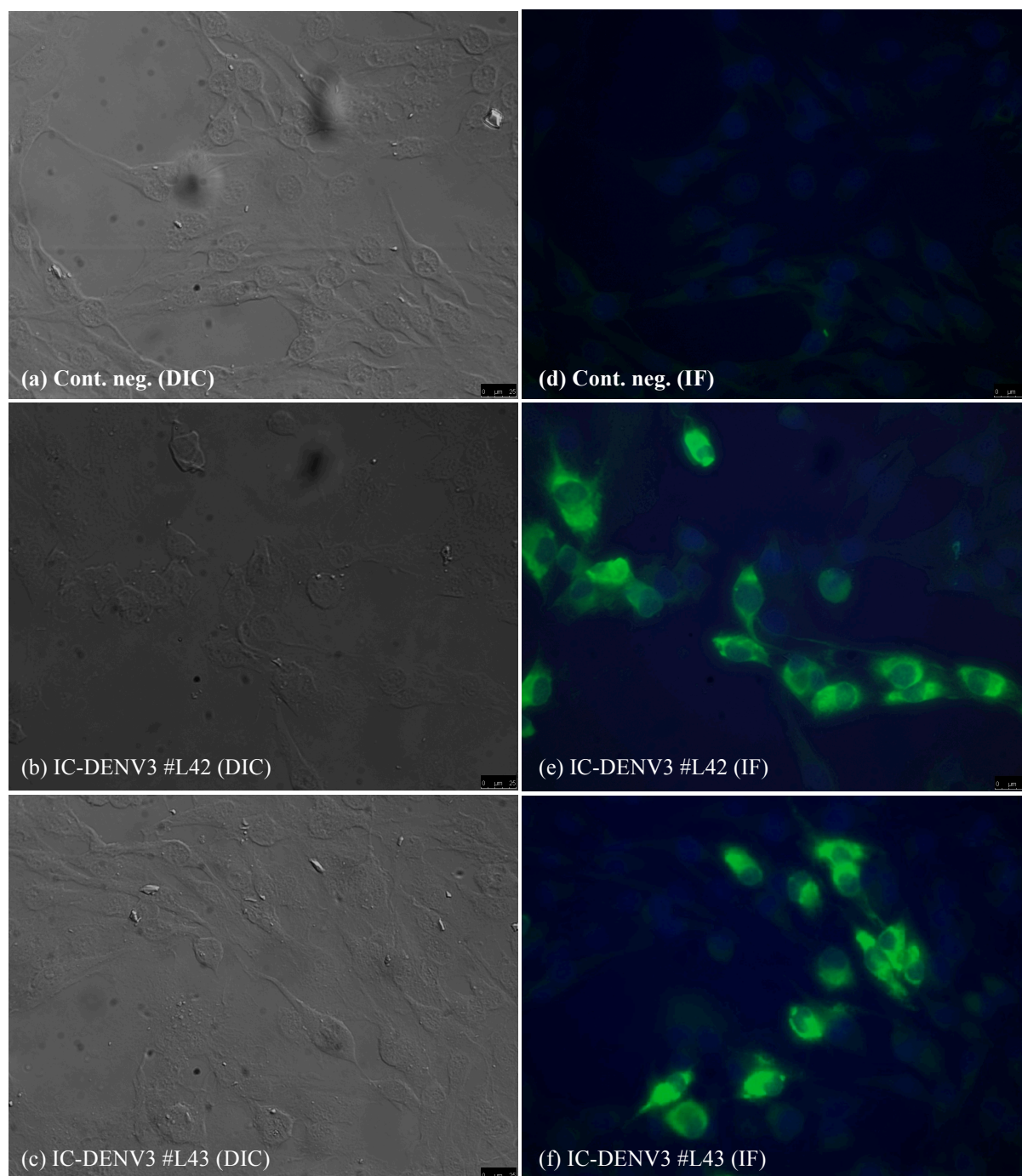


Figura 11. Avaliação da expressão de antígenos virais em células transfectadas por ensaio de imunofluorescência (IF). Células BHK-21 transfectadas com os RNAs virais, 5 dias após a transfecção. (a), (b) e (c) microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC, *Differential interference contrast*). (d), (e) e (f) microscopia de imunofluorescência (células marcadas com FITC e *hoechst* 33258). (a) e (d) controle negativo, (b) e (e) IC-DENV3 #L42 e (c) e (f) IC-DENV3 #L43. Aumento: 400X.

4.2. Caracterização do clone infeccioso DENV3 *in vitro*

Após o aparecimento de efeito citopático nas células BHK-21 transfectadas, o sobrenadante clarificado da cultura foi usado como inóculo para infectar novas células. Após três sucessivas passagens em células BHK-21, os vírus recuperados foram caracterizados *in vitro*. Para confirmar que os vírus recuperados foram derivados do nosso sistema de genética reversa, o RNA viral, extraído a partir do sobrenadante clarificado da terceira passagem, foi reversamente transcrito em cDNA. Nesta reação, O DENV3 selvagem (WT-DENV3) e o sobrenadante de células não infectada foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente.

Usando o cDNA produzido e primers específicos para a região E-NS1, um fragmento de tamanho esperado foi amplificado por PCR no controle positivo (Figura 12, poço 1) e nos vírus recuperados (Figura 12, poços 3 e 5). Contudo, nenhuma banda foi amplificada no controle negativo (Figura 12, poço 7). A digestão dos produtos de PCR com enzima de restrição gerou duas bandas de tamanho esperados nos vírus recuperados (Figura 12, poços 4 e 6). Este sítio único de restrição foi introduzido na estratégia de clonagem do nosso sistema de dois plasmídeos, confirmando que os vírus recuperados foram derivados deste sistema. No controle positivo, não houve digestão do produto de PCR (Figura 12, poço 2).

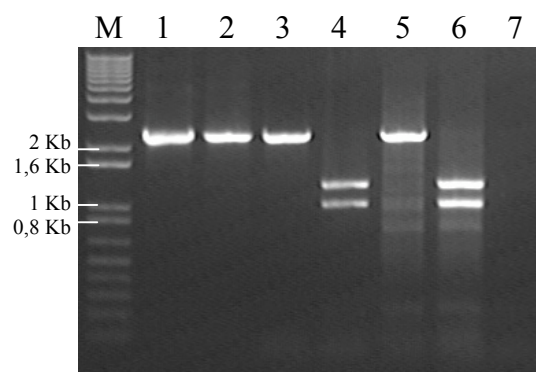


Figura 12. Confirmação da identidade dos vírus recuperados por RT-PCR e fragmentos de restrição. O RNA viral foi extraído a partir do sobrenadante da cultura e usado em reações de RT-PCR (poços 1, 3 e 5). Em seguida, os produtos de PCR foram digeridos por enzima de restrição (poços 2, 4 e 6). Controle positivo (poços 1 e 2), IC-DENV3 #L42 (poços 3 e 4), IC-DENV3 #L43 (poços 5 e 6) e controle negativo (poço 7).

Para avaliar o surgimento de mutações, decorrentes das sucessivas passagens em cultivo celular, os vírus recuperados foram sequenciados após a terceira passagem em cultivo celular. Usando primers que cobriam toda a extensão do RNA viral, o genoma viral de ambos os clones foi amplificado por RT-PCR em cinco fragmentos e enviados para sequenciamento.

O sequenciamento do vírus IC-DENV3 #L42 identificou cinco mutações no genoma viral (Tabela 3), além daquela gerada durante o processo de clonagem (A7878G). Todas as mutações estão localizadas na região das proteínas não-estruturais. Mais especificamente, as mutações foram mapeadas dentro das regiões codificantes para as proteínas NS3 e NS5. Três das mutações identificadas são silenciosas (G5419A, A7684G e T8527C). As outras três mutações levaram a uma mudança de aminoácido: C4551T (treonina para isoleucina), G5732C (valina para leucina) e A7878G (lisina para arginina).

Tabela 3. Ocorrência de mutações no vírus IC-DENV3 #L42 recuperado após sucessivas passagens em cultivo celular, identificadas pela análise de sequenciamento

nº mutação	nº nt	Seqüência		Região	Mudança aa
		Clone infeccioso	Vírus Parental		
1	4551	C	T	NS3	T13I
2	5419	G	A	NS3	Não (silenciosa)
3	5732	G	C	NS3	V407L
4	7684	A	G	NS5	Não (silenciosa)
5	7878	A	G	NS5	K105R
6	8527	T	C	NS5	Não (silenciosa)

Além da mutação gerada durante a etapa de clonagem (T10165C), a análise do sequenciamento do vírus IC-DENV3 #L43 identificou mais seis mutações (Tabela 4).

Tabela 4. Ocorrência de mutações no vírus IC-DENV3 #L43 recuperado após sucessivas passagens em cultivo celular, identificadas pela análise de sequenciamento

nº mutação	nº nt	Seqüência		Região	Mudança aa
		Clone infeccioso	Vírus Parental		
1	1446	C	T	E	A171V
2	3027	A	G	NS1	Q205R
3	3146	A	G	NS1	K245E
4	4909	T	C	NS3	Não (silenciosa)
5	7403	A	G	NS4b	T195A
6	7904	G	A	NS5	I114V
7	10165	T	C	NS5	Não (silenciosa)
8	10285	<i>ins A</i>	-	3'-UTR	-

De todas as mutações identificadas, seis estão localizadas na região das proteínas não-estruturais (Tabela 4). As mutações mapeadas estão distribuídas na região codificante das proteínas NS1, NS3, NS4b e NS5. Duas delas são silenciosas (T4909C E T10165C). As outras quatro são mutações de sentido trocado: A3027G (glutamina para arginina), A3146G (lisina para glutamato), A7403G (treonina para alanina) e G7904A (isoleucina para valina). Apenas uma mutação foi identificada na região das proteínas estruturais. A mutação está localizada dentro da região codificante da proteína E e levou a uma mudança de aminoácido: C1446T (alanina para valina). Durante a análise, também foi identificada a inserção de um único nucleotídeo (10285A *ins*) no genoma viral, localizada na região 3'-UTR.

Para caracterizar o fenótipo dos vírus recuperados, eles foram avaliados por ensaio de placa. No ensaio, células BHK-21, semeadas em placas de seis poços, foram inoculadas com diluições seriadas dos vírus recuperados. O WT-DENV3 foi usado como controle positivo. Após a remoção do inóculo, as células foram cobertas com meio semi-sólido e incubadas por nove dias. No nono dia, as placas foram reveladas pela coloração com MTT. O vírus IC-DENV3 #L43 (Figura 13c) apresentou placas com morfologia e tamanho similares as encontradas no WT-DENV3 (Figura 13a). Diferentemente, o vírus IC-DENV3 #L42 (Figura 13b) não foi capaz de formar placas em nenhuma das diluições avaliadas.

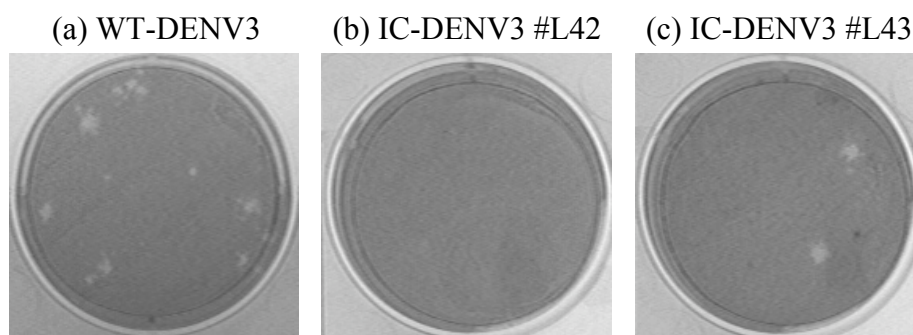


Figura 13. Caracterização dos vírus recuperados por ensaio de placa. No ensaio, células BHK-21, semeadas em placas de seis poços, foram inoculadas com diluições seriadas dos vírus recuperados. O WT-DENV3 foi usado como controle positivo. Após a remoção do inóculo, as células foram cobertas com meio semi-sólido e incubadas por nove dias. No nono dia, as placas foram reveladas pela coloração com MTT. (a) WT-DENV3, (b) IC-DENV3 #L42 e (c) IC-DENV3 #L43.

5. Discussão

A dengue é uma das principais doenças transmitidas por artrópodes no mundo. Cerca de 2,5 bilhões de pessoas estão sob o risco de infecção em áreas endêmicas (MALAVIGE *et al.*, 2004; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009). Como consequência dos efeitos do aquecimento global, este número tende a se expandir nos próximos anos (JETTEN; FOCKS, 1997; SUTHERST, 2004). O DENV, o agente etiológico da doença, apresenta quatro sorotipos (DENV1-4), dos quais três (DENV1, DENV2 e DENV3) ocorrem no Brasil (CORDEIRO *et al.*, 2007).

Atualmente, não há vacina ou terapia antiviral disponível contras as infecções causadas por DENV. Apesar dos avanços (KUHN *et al.*, 2002; TASSANEETRITHEP *et al.*, 2003; VILLORDO; GAMARNIK, 2009; WELSCH *et al.*, 2009), muitos aspectos da biologia do DENV ainda não são totalmente compreendidos. O uso de sistemas de genética reversa tem facilitado o entendimento da biologia molecular dos flavivírus, incluindo replicação viral e patogênese, e fornecido novas estratégias para o desenvolvimento de vacinas e antivirais (BOYER; HAENNI, 1994; RUGGLI; RICE, 1999; WHITEHEAD *et al.*, 2007; ALVAREZ; FILOMATORI; GAMARNIK, 2008).

No presente trabalho, nós descrevemos o desenvolvimento do primeiro sistema de genética reversa para o DENV3, baseado na técnica de recombinação homóloga em levedura. É também o primeiro relato de um clone infeccioso para um DENV3, isolado no Brasil. Até o momento, apenas um clone infeccioso para um DENV1, isolado no Brasil, tem sido descrito (SUZUKI *et al.*, 2007).

Uma das principais dificuldades no estabelecimento de uma sistema de genética reversa para flavivírus é a instabilidade do genoma viral clonado em sistemas procariotos (POLO *et al.*, 1997; RUGGLI; RICE, 1999). Apesar das razões para esta instabilidade não estejam bem estabelecidas, tem sido atribuído o envolvimento da junção entre E-NS1 no genoma viral ou um produto tóxico derivado desta região (POLO *et al.*, 1997; BLANEY *et al.*, 2004).

Diferentes abordagens têm sido empregadas na tentativa de superar esta instabilidade (YAMSHCHIKOV *et al.*, 2001; BREDENBEEK *et al.*, 2003; BLANEY *et al.*, 2004; SUZUKI *et al.*, 2007). Uma delas é uso de levedura na construção do sistema de genética reversa no lugar da *E. coli* (POLO *et al.*, 1997; PURI *et al.*, 2000). A técnica de recombinação homóloga em levedura é um método simples, robusto e eficiente (GIBSON, 2009),

apresentando grandes vantagens sobre os sistemas procariotos convencionais (SHANKS *et al.*, 2009).

Enfrentando os mesmos problemas de instabilidade descritos anteriormente, Blaney *et al* (2004) inseriram um *linker* na junção E-NS1 do genoma viral. O *linker* introduzido, flanqueado por sítios de restrição, continha códon de terminação nas três fases de leitura em ambas as fitas. Com esta estratégia, os autores foram capazes de recuperar um DENV3 viável. Baseados nesta estratégia, nós desenvolvemos a abordagem inicial de construção do nosso clone infeccioso DENV3 (Figura 6). Amplificado em quatro fragmentos (Figura 7a), o genoma viral foi recombinado com o vetor pBSC, através da técnica de recombinação homóloga em levedura. A partir do DNA plasmidial extraído, o genoma viral foi amplificado por PCR e sequenciado. A análise de sequenciamento indicou que o *linker* introduzido não foi capaz de conferir estabilidade ao genoma viral, pois diferentes clones analisados (Figura 7b) apresentaram um elevado número de mutações. Nenhuma das mutações identificadas nos clones analisados estavam presentes nos fragmentos usados na recombinação, confirmando que as mutações foram resultados da instabilidade do genoma viral. É possível que as diferenças no vetor ou na linhagem hospedeira utilizados [levedura, na nossa abordagem, enquanto Blaney *et al* (2004) utilizaram *E. coli*], como têm sido descrito (LAI *et al.*, 1991; BOYER; HAENNI, 1994), expliquem a discrepância dos resultados observados.

Outra estratégia bastante difundida para resolver o problema da instabilidade é o uso do sistema de dois plasmídeos, que tem sido empregada com sucesso na recuperação de clones infecciosos para diversos flavivírus (SUMIYOSHI; HOKE; TRENT, 1992; KAPOOR *et al.*, 1995). Baseado num sistema de 2 plasmídeos (Figura 9), nós fomos capazes de construir o clone infeccioso DENV3. Nela, o genoma viral foi clonado em duas partes isoladamente no vetor pBSC (pBSC-DENV3-pA, pA e pBSC-DENV3-pB, pB). A clonagem neste sistema foi relativamente estável. A partir da análise de sequenciamento, um clone do plasmídeo pA (pBSC-DENV3-pA #4) e dois clones do plasmídeo pB (pBSC-DENV3-pB #2 e pBSC-DENV3-pB #3) foram selecionados.

Nenhuma mutação foi identificada no plasmídeo pA #4. Nos plasmídeos pB, uma única mutação foi encontrada em cada clone. No plasmídeo pB #2, a mutação A7878G (Tabela 1) levou a uma mudança de aminoácido (lisina para arginina). Contudo, ambos os aminoácidos pertencem ao mesmo grupo químico (polar básico), minimizando os efeitos da mutação. No plasmídeo pB #3, a mutação T10165C (Tabela 2) identificada foi silenciosa. Apesar disso, ela é encontrada em outros genomas virais do DENV3, depositados no *National Center for Biotechnology Information* – NCBI (números de acesso: AY679147, AY676352 e DQ401690). A ocorrência de mutações, decorrentes do processo de clonagem, também foi

observada para DENV1 (SUZUKI *et al.*, 2007), DENV2 (POLO *et al.*, 1997) e DENV4 (LAI *et al.*, 1991).

A partir dos clones pA e pB selecionados, nós conseguimos recuperar dois clones infecciosos (IC-DENV3 #L42 e IC-DENV3 #L43) por ligação *in vitro* (Figura 10c) e ambas as ligações produziram RNAs virais genômicos. A introdução destes RNAs em células suscetíveis por eletroporação, levou a uma infecção produtiva, mostrando que ambos os RNAs são infecciosos (Figura 11). As primeiras células positivas em ensaios de imunofluorescência foram observadas com quatro dias após a transfecção. Resultados similares foram descritos para DENV2 (POLO *et al.*, 1997). Para DENV1, as primeiras células positivas foram observadas com apenas dois dias após a transfecção (SUZUKI *et al.*, 2007). Já para DENV4, foram necessários pelo menos dez dias para o aparecimento de células positivas (LAI *et al.*, 1991). Nos nossos experimentos, o número de células positivas aumenta ao longo do tempo, até o aparecimento dos primeiros sinais de efeito citopático com oito dias. As mutações identificadas no sequenciamento não parecem ser deletérias, visto que fomos capazes de recuperar vírus infecciosos. Contudo, o possível efeito da mutação A7878G na infectividade do RNA viral ou em outros aspectos do ciclo viral precisam ser mais bem estudados.

Os vírus recuperados sofreram três passagens consecutivas em cultura de células, antes de serem caracterizados *in vitro*. Uma característica interessante observada foi que o vírus IC-DENV3 #L42 recuperado não apresentou qualquer efeito citopático aparente nas três passagens realizadas. Por efeito citopático entende-se qualquer alteração morfológica induzida nas células pela infecção viral. Apesar de nem todos os vírus serem capazes de causar efeito citopático em cultivo celular, esta propriedade é comum a muitos vírus, incluindo o vírus parental (WT-DENV3) utilizado no presente trabalho (MATSUDA *et al.*, 2005; CONDIT, 2007; UMAREDDY *et al.*, 2007). Por RT-PCR e análise de fragmentos de restrição (Figura 12), nós confirmamos que ambos os vírus recuperados foram derivados do nosso sistema de genética reversa.

O sequenciamento dos vírus recuperados identificou algumas mutações no genoma viral. Este é um fenômeno comum quando os vírus são passados em cultivo celular (KINNEY *et al.*, 1997; BLANEY *et al.*, 2004; BLANEY *et al.*, 2008). No vírus IC-DENV3 #L42 foram identificados cinco mutações adaptativas (Tabela 3): três delas foram silenciosas (G5419A, A7684G e T8527C). Apesar de ser silenciosa, a mutação G5419A é encontrada em outros genomas virais do DENV3, depositados no NCBI (números de acesso: AY676350, DQ402694 e AY876494). As outras duas mutações levaram a mudança de aminoácido:

C4551T (treonina para isoleucina, pertencentes a grupos químicos distintos) e G5732C (valina para leucina, pertencentes ao grupo apolar).

No vírus IC-DENV3 #L43, seis mutações adaptativa foram mapeadas (Tabela 4). Apenas uma mutação foi silenciosa: T4909C. Entre as mutações de sentido trocado identificadas, duas mutações levaram a mudança de aminoácido dentro do mesmo grupo químico (apolar): G7904A (isoleucina para valina) e C1446T (alanina para valina). As outras três mutações levaram a mudança de aminoácido entre grupos químicos distintos: A3027G (glutamina para arginina), A3146G (lisina para glutamato) e A7403G (treonina para alanina). Adicionalmente, uma inserção de um único nucleotídeo foi identificada, dentro da região 3'-UTR (*insA* 10285). Esta inserção está localizada dentro do domínio VR, conhecido pela variabilidade de tamanho e sequência, mesmo dentro de isolados do mesmo sorotipo (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

Baseado nos ensaios de placa, os vírus recuperados (IC-DENV3 #L42 e IC-DENV3 #L43) apresentaram fenótipos completamente distintos. Usando coloração convencional, o vírus IC-DENV3 #L43 (Figura 13c) formou placas de tamanho e morfologia semelhantes ao WT-DENV3, o vírus parental (Figura 13a). Contudo, ao contrário do vírus IC-DENV3 #L43, o WT-DENV3 apresentou placas com tamanho heterogêneo (algumas maiores, outras menores). Este fenótipo também foi observado em DENV4, crescido em células C6/36 (LAI *et al.*, 1991). O IC-DENV3 #L42 (Figura 13b) foi incapaz de formar placas em qualquer das diluições avaliadas. Este fenótipo está de acordo com a incapacidade do vírus de induzir efeito citopático em cultivo celular.

Esperamos que o sistema de genética reversa, desenvolvido no presente estudo, contribua para a pesquisa do DENV, levando ao aprimoramento da virologia molecular dos flavivírus.

6. Conclusões

No presente estudo, nós descrevemos, pela primeira vez, o desenvolvimento de um sistema de genética reversa para o DENV3, usando a técnica de recombinação homóloga em levedura. Trata-se do primeiro relato da construção de um clone infeccioso para um isolado brasileiro do DENV3.

Duas estratégias distintas foram empregadas na construção do clone infeccioso DENV3. Na abordagem inicial, o *linker* introduzido foi incapaz de conferir estabilidade ao genoma viral clonado. Utilizando o sistema de 2 plasmídeos na segunda estratégia, nós fomos capazes de construir dois clones infecciosos (IC-DENV3 #L42 e IC-DENV3 #L43). Este sistema se mostrou adequado e, relativamente, estável para o genoma viral.

Ambos os clones infecciosos construídos (IC-DENV3 #L42 e IC-DENV3 #L43) produziram RNAs virais infecciosos. Estes RNAs, quando transfectados em células suscetíveis, levaram a produção de partículas virais infecciosas.

Ambos os vírus recuperados (IC-DENV3 #L42 e IC-DENV3 #L43) foram derivados do nosso sistema de genética reversa. Após sucessivas passagens em cultivo celular, mutações adaptativas foram identificadas em cada um dos vírus recuperados.

Os vírus recuperados (IC-DENV3 #L42 e IC-DENV3 #L43) apresentaram fenótipos distintos em ensaio de placa. O IC-DENV3 #L43 produziu placas de tamanho e morfologia similares ao DENV3 parental, enquanto o IC-DENV3 #L42 não formou placas. O IC-DENV3 #L42 recuperado também foi incapaz de causar efeito citopático em cultivo celular.

7. Perspectivas

Baseados nos resultados obtidos, será importante estudar o envolvimento das mutações identificadas (C4551T, G5732C e A7878G), em conjunto ou isoladas, no fenótipo observado do clone IC-DENV3 #L42. Também será necessário avaliar o fenótipo deste clone em ensaio de placa por outras metodologias, como a visualização de *foci* na técnica de imunoperoxidase.

Posteriormente, a determinação da curva de crescimento nos fornecerá importantes dados na caracterização dos vírus recuperados, podendo ajudar a compreender o comportamento do fenótipo apresentado pelo IC-DENV3 #L42.

8. Referências Bibliográficas

ABERLE, J. H.; ABERLE, S. W.; KOFLER, R. M.; MANDL, C. W. Humoral and cellular immune response to RNA immunization with flavivirus replicons derived from tick-borne encephalitis virus. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 24, p. 15107-15113, 2005.

ACIOLI-SANTOS, B.; SEGAT, L.; DHALIA, R.; BRITO, C. A.; BRAGA-NETO, U. M.; MARQUES, E. T.; CROVELLA, S. MBL2 gene polymorphisms protect against development of thrombocytopenia associated with severe dengue phenotype. **Human Immunology**, New York, v. 69, n. 2, p. 122-128, 2008.

ACKERMANN, M.; PADMANABHAN, R. De novo synthesis of RNA by the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 43, p. 39926-39937, 2001.

ALCON, S.; TALARMIN, A.; DEBRUYNE, M.; FALCONAR, A.; DEUBEL, V.; FLAMAND, M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 2, p. 376-381, 2002.

ALCON-LEPODER, S.; DROUET, M. T.; ROUX, P.; FRENKIEL, M. P.; ARBORIO, M.; DURAND-SCHNEIDER, A. M.; MAURICE, M.; LE BLANC, I.; GRUENBERG, J.; FLAMAND, M. The secreted form of dengue virus nonstructural protein NS1 is endocytosed by hepatocytes and accumulates in late endosomes: implications for viral infectivity. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 17, p. 11403-11411, 2005.

ALVAREZ, D. E.; DE LELLA EZCURRA, A. L.; FUCITO, S.; GAMARNIK, A. V. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. **Virology**, New York, v. 339, n. 2, p. 200-212, 2005.

ALVAREZ, D. E.; FILOMATORI, C. V.; GAMARNIK, A. V. Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3'UTRs. **Virology**, New York, v. 375, n. 1, p. 223-235, 2008.

ALVAREZ, D. E.; LODEIRO, M. F.; LUDUENA, S. J.; PIETRASANTA, L. I.; GAMARNIK, A. V. Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 11, p. 6631-6643, 2005.

ANRAKU, I.; HARVEY, T. J.; LINEDALE, R.; GARDNER, J.; HARRICH, D.; SUHRBIER, A.; KHROMYKH, A. A. Kunjin virus replicon vaccine vectors induce protective CD8⁺ T-cell immunity. **Journal of Virology**, Washington, v. 76, n. 8, p. 3791-3799, 2002.

ANSARI, I. H.; CHEN, L. M.; LIANG, D.; GIL, L. H.; ZHONG, W.; DONIS, R. O. Involvement of a bovine viral diarrhea virus NS5B locus in virion assembly. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, n. 18, p. 9612-9623, 2004.

ARROYO, J.; MILLER, C.; CATALAN, J.; MYERS, G. A.; RATTERREE, M. S.; TRENT, D. W.; MONATH, T. P. ChimeriVax-West Nile virus live-attenuated vaccine: preclinical

evaluation of safety, immunogenicity, and efficacy. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, n. 22, p. 12497-12507, 2004.

ASHOUR, J.; LAURENT-ROLLE, M.; SHI, P. Y.; GARCIA-SASTRE, A. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. **Journal of Virology**, Washington, v. 83, n. 11, p. 5408-5418, 2009.

BHATTACHARYA, D.; MAYURI; BEST, S. M.; PERERA, R.; KUHN, R. J.; STRIKER, R. Protein kinase G phosphorylates mosquito-borne flavivirus NS5. **Journal of Virology**, Washington, v. 83, n. 18, p. 9195-9205, 2009.

BLANEY, J. E., JR.; HANSON, C. T.; FIRESTONE, C. Y.; HANLEY, K. A.; MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. Genetically modified, live attenuated dengue virus type 3 vaccine candidates. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 71, n. 6, p. 811-821, 2004.

BLANEY, J. E., JR.; SATHE, N. S.; GODDARD, L.; HANSON, C. T.; ROMERO, T. A.; HANLEY, K. A.; MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. Dengue virus type 3 vaccine candidates generated by introduction of deletions in the 3' untranslated region (3'-UTR) or by exchange of the DENV-3 3'-UTR with that of DENV-4. **Vaccine**, Amsterdam, v. 26, n. 6, p. 817-828, 2008.

BOYER, J. C.; HAENNI, A. L. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. **Virology**, New York, v. 198, n. 2, p. 415-426, 1994.

BREDENBEEK, P. J.; KOOL, E. A.; LINDENBACH, B.; HUIJKMAN, N.; RICE, C. M.; SPAAN, W. J. A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. **The Journal of General Virology**, London, v. 84, n. Pt 5, p. 1261-1268, 2003.

CHANG, D. C.; LIU, W. J.; ANRAKU, I.; CLARK, D. C.; POLLITT, C. C.; SUHRBIER, A.; HALL, R. A.; KHROMYKH, A. A. Single-round infectious particles enhance immunogenicity of a DNA vaccine against West Nile virus. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 5, p. 571-577, 2008.

CHANG, G.-J. Molecular biology of dengue viruses. In: GUBLER, D. J. KUNO, G. (Ed.). **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. 1 ed. Cambridge: CABI publishing, 1997. v. único, p. 175-198.

CHIU, W. 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**, Washington, v. 79, n. 13, p. 8303-8315, 2005.

CHUNG, K. M.; LISZEWSKI, M. K.; NYBAKKEN, G.; DAVIS, A. E.; TOWNSEND, R. R.; FREMONT, D. H.; ATKINSON, J. P.; DIAMOND, M. S. West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, Washington, v. 103, n. 50, p. 19111-19116, 2006.

CLYDE, K.; HARRIS, E. RNA secondary structure in the coding region of dengue virus type 2 directs translation start codon selection and is required for viral replication. **Journal of Virology**, Washington, v. 80, n. 5, p. 2170-2182, 2006.

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

CONDIT, R. C. Principles of Virology. In: KNIPE, D. M. HPWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. v. 1, p. 26-57.

CORDEIRO, M. T.; FREESE, E.; SCHATZMAYR, H.; NOGUEIRA, R. M. R. **Vinte anos de evolução da dengue no estado de Pernambuco**. 1 ed. Recife: Ed. Universitária UFPE, 2008. 225 p.

CORDEIRO, M. T.; SILVA, A. M.; BRITO, C. A.; NASCIMENTO, E. J.; MAGALHAES, M. C.; GUIMARAES, G. F.; LUCENA-SILVA, N.; DE CARVALHO, E. M.; MARQUES, E. T., JR. Characterization of a dengue patient cohort in Recife, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 77, n. 6, p. 1128-1134, 2007.

COSTA, S. M.; FREIRE, M. S.; ALVES, A. M. DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. **Vaccine**, Amsterdam, v. 24, n. 21, p. 4562-4564, 2006.

DE MELO, F. L.; ROMANO, C. M.; DE ANDRADE ZANOTTO, P. M. Introduction of dengue virus 4 (DENV-4) genotype I into Brazil from Asia? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 3, n. 4, p. e390, 2009.

DONG, H.; ZHANG, B.; SHI, P. Y. Flavivirus methyltransferase: a novel antiviral target. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 80, n. 1, p. 1-10, 2008.

DURBIN, A. P.; WHITEHEAD, S. S.; MCARTHUR, J.; PERREAULT, J. R.; BLANEY, J. E., JR.; THUMAR, B.; MURPHY, B. R.; KARRON, R. A. rDEN4delta30, a live attenuated dengue virus type 4 vaccine candidate, is safe, immunogenic, and highly infectious in healthy adult volunteers. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 191, n. 5, p. 710-718, 2005.

EDGIL, D.; POLACEK, C.; HARRIS, E. Dengue virus utilizes a novel strategy for translation initiation when cap-dependent translation is inhibited. **Journal of Virology**, Washington, v. 80, n. 6, p. 2976-2986, 2006.

FERNANDEZ-GARCIA, M. D.; MAZZON, M.; JACOBS, M.; AMARA, A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 5, n. 4, p. 318-328, 2009.

FIGUEIREDO, R. M.; NAVECA, F. G.; BASTOS, M. S.; MELO, M. N.; VIANA, S. S.; MOURAO, M. P.; COSTA, C. A.; FARIAS, I. P. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 14, n. 4, p. 667-669, 2008.

FILOMATORI, C. V.; LODEIRO, M. F.; ALVAREZ, D. E.; SAMSA, M. M.; PIETRASANTA, L.; GAMARNIK, A. V. A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. **Genes & Development**, New York, v. 20, n. 16, p. 2238-2249, 2006.

FINLEY, R. L., JR.; BRENT, R. Interaction mating reveals binary and ternary connections between Drosophila cell cycle regulators. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, Washington, v. 91, n. 26, p. 12980-12984, 1994.

GIBSON, D. G. Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, n. 20, p. 6984-6990, 2009.

GIBSON, D. G.; BENDERS, G. A.; ANDREWS-PFANNKOCH, C.; DENISOVA, E. A.; BADEN-TILLSON, H.; ZAVERI, J.; STOCKWELL, T. B.; BROWNLEY, A.; THOMAS, D. W.; ALGIRE, M. A.; MERRYMAN, C.; YOUNG, L.; NOSKOV, V. N.; GLASS, J. I.; VENTER, J. C.; HUTCHISON, C. A., 3RD; SMITH, H. O. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. **Science**, New York, v. 319, n. 5867, p. 1215-1220, 2008.

GIBSON, D. G.; BENDERS, G. A.; AXELROD, K. C.; ZAVERI, J.; ALGIRE, M. A.; MOODIE, M.; MONTAGUE, M. G.; VENTER, J. C.; SMITH, H. O.; HUTCHISON, C. A., 3RD. One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, Washington, v. 105, n. 51, p. 20404-20409, 2008.

GIBSON, D. G.; YOUNG, L.; CHUANG, R. Y.; VENTER, J. C.; HUTCHISON, C. A., 3RD; SMITH, H. O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature Methods**, New York, v. 6, n. 5, p. 343-345, 2009.

GONCALVEZ, A. P.; ENGLE, R. E.; ST CLAIRE, M.; PURCELL, R. H.; LAI, C. J. Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, Washington, v. 104, n. 22, p. 9422-9427, 2007.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: GUBLER, D. J. KUNO, G. (Ed.). **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. 1 ed. Cambridge: CABI publishing, 1997. v. único, p. 1-22.

GUBLER, D. J.; KUNO, G.; MARKOFF, L. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M. HPWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. v. 1, p. 1154-1252.

GUBLER, D. J.; MELTZER, M. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. **Advances in Virus Research**, New York, v. 53, n., p. 35-70, 1999.

GUBLER, D. J.; SUHARYONO, W.; LUBIS, I.; ERAM, S.; GUNARSO, S. Epidemic dengue 3 in central Java, associated with low viremia in man. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 30, n. 5, p. 1094-1099, 1981.

GUY, B.; NOUGAREDE, N.; BEGUE, S.; SANCHEZ, V.; SOUAG, N.; CARRE, M.; CHAMBONNEAU, L.; MORRISSON, D. N.; SHAW, D.; QIAO, M.; DUMAS, R.; LANG, J.; FORRAT, R. Cell-mediated immunity induced by chimeric tetravalent dengue vaccine in naive or flavivirus-primed subjects. **Vaccine**, Amsterdam, v. 26, n. 45, p. 5712-5721, 2008.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G.; BRAVO, J.; VALDES, L.; VAZQUEZ, S.; HALSTEAD, S. B. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 6, n. 2, p. 118-124, 2002.

HALSTEAD, S. B.; NIMMANNITYA, S.; COHEN, S. N. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody

response and virus recovered. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, New Haven, v. 42, n. 5, p. 311-328, 1970.

HALSTEAD, S. B.; PORTERFIELD, J. S.; O'ROURKE, E. J. Enhancement of dengue virus infection in monocytes by flavivirus antisera. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 29, n. 4, p. 638-642, 1980.

HALSTEAD, S. B.; STREIT, T. G.; LAFONTANT, J. G.; PUTVATANA, R.; RUSSELL, K.; SUN, W.; KANESA-THASAN, N.; HAYES, C. G.; WATTS, D. M. Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 65, n. 3, p. 180-183, 2001.

HERSHKOVITZ, O.; ZILKA, A.; BAR-ILAN, A.; ABUTBUL, S.; DAVIDSON, A.; MAZZON, M.; KUMMERER, B. M.; MONSOENGO, A.; JACOBS, M.; PORGADOR, A. Dengue virus replicon expressing the nonstructural proteins suffices to enhance membrane expression of HLA class I and inhibit lysis by human NK cells. **Journal of Virology**, Washington, v. 82, n. 15, p. 7666-7676, 2008.

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, n. 1, p. 119-133, 2004.

ISHIKAWA, T.; WIDMAN, D. G.; BOURNE, N.; KONISHI, E.; MASON, P. W. Construction and evaluation of a chimeric pseudoinfectious virus vaccine to prevent Japanese encephalitis. **Vaccine**, Amsterdam, v. 26, n. 22, p. 2772-2781, 2008.

ISSUR, M.; GEISS, B. J.; BOUGIE, I.; PICARD-JEAN, F.; DESPINS, S.; MAYETTE, J.; HOBDEY, S. E.; BISAILLON, M. The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. **Rna**, New York, v. 15, n. 12, p. 2340-2350, 2009.

JETTEN, T. H.; FOCKS, D. A. Potential changes in the distribution of dengue transmission under climate warming. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 57, n. 3, p. 285-297, 1997.

JONES, C. T.; PATKAR, C. G.; KUHN, R. J. Construction and applications of yellow fever virus replicons. **Virology**, New York, v. 331, n. 2, p. 247-259, 2005.

JONES, M.; DAVIDSON, A.; HIBBERT, L.; GRUENWALD, P.; SCHLAAK, J.; BALL, S.; FOSTER, G. R.; JACOBS, M. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 9, p. 5414-5420, 2005.

KAPOOR, M.; ZHANG, L.; MOHAN, P. M.; PADMANABHAN, R. Synthesis and characterization of an infectious dengue virus type-2 RNA genome (New Guinea C strain). **Gene**, Amsterdam, v. 162, n. 2, p. 175-180, 1995.

KHROMYKH, A. A.; VARNAVSKI, A. N.; SEDLAK, P. L.; WESTAWAY, E. G. Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin virus. **Journal of Virology**, Washington, v. 75, n. 10, p. 4633-4640, 2001.

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

KINNEY, R. M.; BUTRAPET, S.; CHANG, G. J.; TSUCHIYA, K. R.; ROEHRIG, J. T.; BHAMARAPRAVATI, N.; GUBLER, D. J. Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. **Virology**, New York, v. 230, n. 2, p. 300-308, 1997.

KOBAYASHI, T.; ANTAR, A. A.; BOEHME, K. W.; DANTHI, P.; EBY, E. A.; GUGLIELMI, K. M.; HOLM, G. H.; JOHNSON, E. M.; MAGINNIS, M. S.; NAIK, S.; SKELTON, W. B.; WETZEL, J. D.; WILSON, G. J.; CHAPPELL, J. D.; DERMODY, T. S. A plasmid-based reverse genetics system for animal double-stranded RNA viruses. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 1, n. 2, p. 147-157, 2007.

KOFLER, R. M.; ABERLE, J. H.; ABERLE, S. W.; ALLISON, S. L.; HEINZ, F. X.; MANDL, C. W. 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. 7, p. 1951-1956, 2004.

KONISHI, E.; FUJII, A. Dengue type 2 virus subviral extracellular particles produced by a stably transfected mammalian cell line and their evaluation for a subunit vaccine. **Vaccine**, Amsterdam, v. 20, n. 7-8, p. 1058-1067, 2002.

KUHN, R. J.; ZHANG, W.; ROSSMANN, M. G.; PLETNEV, S. V.; CORVER, J.; LENCHES, E.; JONES, C. T.; MUKHOPADHYAY, S.; CHIPMAN, P. R.; STRAUSS, E. G.; BAKER, T. S.; STRAUSS, J. H. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, Cambridge, v. 108, n. 5, p. 717-725, 2002.

LAI, C. J.; ZHAO, B. T.; HORI, H.; BRAY, M. 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, n. 12, p. 5139-5143, 1991.

LAURENT-ROLLE, M.; BOER, E. F.; LUBICK, K. J.; WOLFINBARGER, J. B.; CARMODY, A. B.; ROCKX, B.; LIU, W.; ASHOUR, J.; SHUPERT, W. L.; HOLBROOK, M. R.; BARRETT, A. D.; MASON, P. W.; BLOOM, M. E.; GARCIA-SASTRE, A.; KHROMYKH, A. A.; BEST, S. M. The NS5 protein of the virulent West Nile virus NY99 strain is a potent antagonist of type I interferon-mediated JAK-STAT signaling. **Journal of Virology**, Washington, v. 84, n. 7, p. 3503-3515, 2010.

LESCAR, J.; LUO, D.; XU, T.; SAMPATH, A.; LIM, S. P.; CANARD, B.; VASUDEVAN, S. G. Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses: the case for the multifunctional NS3 protein from Dengue virus as a target. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 80, n. 2, p. 94-101, 2008.

LEUNG, J. Y.; PIJLMAN, G. P.; KONDRATIEVA, N.; HYDE, J.; MACKENZIE, J. M.; KHROMYKH, A. A. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. **Journal of Virology**, Washington, v. 82, n. 10, p. 4731-4741, 2008.

LI, L.; LOK, S. M.; YU, I. M.; ZHANG, Y.; KUHN, R. J.; CHEN, J.; ROSSMANN, M. G. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. **Science**, New York, v. 319, n. 5871, p. 1830-1834, 2008.

LIN, R. J.; CHANG, B. L.; YU, H. P.; LIAO, C. L.; LIN, Y. L. Blocking of interferon-induced Jak-Stat signaling by Japanese encephalitis virus NS5 through a protein tyrosine phosphatase-mediated mechanism. **Journal of Virology**, Washington, v. 80, n. 12, p. 5908-5918, 2006.

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

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H.-J.; RICE, C. M. Flaviviruses: the virus and their replication. In: KNIPE, D. M. HPWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. v. 1, p. 1102-1152.

LIU, R.; YUE, L.; LI, X.; YU, X.; ZHAO, H.; JIANG, Z.; QIN, E.; QIN, C. Identification and characterization of small sub-genomic RNAs in dengue 1-4 virus-infected cell cultures and tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 391, n. 1, p. 1099-1103, 2010.

LIU, W. J.; WANG, X. J.; CLARK, D. C.; LOBIGS, M.; HALL, R. A.; KHRAMYKH, A. A. A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice. **Journal of Virology**, Washington, v. 80, n. 5, p. 2396-2404, 2006.

LU, Y.; RAVIPRAKASH, K.; LEAO, I. C.; CHIKHLIKAR, P. R.; EWING, D.; ANWAR, A.; CHOUGNET, C.; MURPHY, G.; HAYES, C. G.; AUGUST, T. J.; MARQUES, E. T., JR. Dengue 2 PreM-E/LAMP chimera targeted to the MHC class II compartment elicits long-lasting neutralizing antibodies. **Vaccine**, Amsterdam, v. 21, n. 17-18, p. 2178-2189, 2003.

MACKENZIE, J. M.; KHRAMYKH, A. A.; JONES, M. K.; WESTAWAY, E. G. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. **Virology**, New York, v. 245, n. 2, p. 203-215, 1998.

MAIRUHU, A. T.; WAGENAAR, J.; BRANDJES, D. P.; VAN GORP, E. C. Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, v. 23, n. 6, p. 425-433, 2004.

MALAVIGE, G. N.; FERNANDO, S.; FERNANDO, D. J.; SENEVIRATNE, S. L. Dengue viral infections. **Postgraduate Medical Journal**, London, v. 80, n. 948, p. 588-601, 2004.

MASON, P. W.; SHUSTOV, A. V.; FROLOV, I. Production and characterization of vaccines based on flaviviruses defective in replication. **Virology**, New York, v. 351, n. 2, p. 432-443, 2006.

MATSUDA, T.; ALMASAN, A.; TOMITA, M.; TAMAKI, K.; SAITO, M.; TADANO, M.; YAGITA, H.; OHTA, T.; MORI, N. Dengue virus-induced apoptosis in hepatic cells is partly mediated by Apo2 ligand/tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. **The Journal of General Virology**, London, v. 86, n. Pt 4, p. 1055-1065, 2005.

MATUSAN, A. E.; PRYOR, M. J.; DAVIDSON, A. D.; WRIGHT, P. J. Mutagenesis of the Dengue virus type 2 NS3 protein within and outside helicase motifs: effects on enzyme

activity and virus replication. **Journal of Virology**, Washington, v. 75, n. 20, p. 9633-9643, 2001.

MCELROY, K. L.; TSETSKARKIN, K. A.; VANLANDINGHAM, D. L.; HIGGS, S. Manipulation of the yellow fever virus non-structural genes 2A and 4B and the 3'non-coding region to evaluate genetic determinants of viral dissemination from the *Aedes aegypti* midgut. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 75, n. 6, p. 1158-1164, 2006a.

MCELROY, K. L.; TSETSKARKIN, K. A.; VANLANDINGHAM, D. L.; HIGGS, S. Role of the yellow fever virus structural protein genes in viral dissemination from the *Aedes aegypti* mosquito midgut. **The Journal of General Virology**, London, v. 87, n. Pt 10, p. 2993-3001, 2006b.

MEDIN, C. L.; FITZGERALD, K. A.; ROTHMAN, A. L. Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 17, p. 11053-11061, 2005.

MESSER, W. B.; GUBLER, D. J.; HARRIS, E.; SIVANANTHAN, K.; DE SILVA, A. M. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, n. 7, p. 800-809, 2003.

MILLER, S.; KASTNER, S.; KRIJNSE-LOCKER, J.; BUHLER, S.; BARTENSCHLAGER, R. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, n. 12, p. 8873-8882, 2007.

MILLER, S.; SPARACIO, S.; BARTENSCHLAGER, R. Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 281, n. 13, p. 8854-8863, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico - adulto e criança**. 3 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Informe epidemiológico da dengue**. Brasília, 2009. Disponível em <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/default.cfm>>. Acesso em: 03/01/2010.

MISCHKALE, K.; REIMANN, I.; ZEMKE, J.; KONIG, P.; BEER, M. Characterisation of a new infectious full-length cDNA clone of BVDV genotype 2 and generation of virus mutants. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 142, n. 1-2, p. 3-12, 2010.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S. C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, London, v. 427, n. 6972, p. 313-319, 2004.

MONATH, T. P.; GUIRAKHOO, F.; NICHOLS, R.; YOKSAN, S.; SCHRADER, R.; MURPHY, C.; BLUM, P.; WOODWARD, S.; MCCARTHY, K.; MATHIS, D.; JOHNSON, C.; BEDFORD, P. Chimeric live, attenuated vaccine against Japanese encephalitis (ChimeriVax-JE): phase 2 clinical trials for safety and immunogenicity, effect of vaccine dose and schedule, and memory response to challenge with inactivated Japanese encephalitis antigen. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 188, n. 8, p. 1213-1230, 2003.

MOSIMANN, A. L.; DE BORBA, L.; BORDIGNON, J.; MASON, P. W.; DOS SANTOS, C. N. Construction and characterization of a stable subgenomic replicon system of a Brazilian dengue virus type 3 strain (BR DEN3 290-02). **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 163, n. 1, p. 147-152, 2010.

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

MUNOZ-JORDAN, J. L.; LAURENT-ROLLE, M.; ASHOUR, J.; MARTINEZ-SOBRIDO, L.; ASHOK, M.; LIPKIN, W. I.; GARCIA-SASTRE, A. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 13, p. 8004-8013, 2005.

MUNOZ-JORDAN, J. L.; SANCHEZ-BURGOS, G. G.; LAURENT-ROLLE, M.; GARCIA-SASTRE, A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, Washington, v. 100, n. 24, p. 14333-14338, 2003.

NEUMANN, G.; FUJII, K.; KINO, Y.; KAWAOKA, Y. An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, Washington, v. 102, n. 46, p. 16825-16829, 2005.

NG, C. Y.; GU, F.; PHONG, W. Y.; CHEN, Y. L.; LIM, S. P.; DAVIDSON, A.; VASUDEVAN, S. G. Construction and characterization of a stable subgenomic dengue virus type 2 replicon system for antiviral compound and siRNA testing. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 76, n. 3, p. 222-231, 2007.

NOBLE, C. G.; CHEN, Y. L.; DONG, H.; GU, F.; LIM, S. P.; SCHUL, W.; WANG, Q. Y.; SHI, P. Y. Strategies for development of dengue virus inhibitors. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 450-462, 2010.

OLDENBURG, K. R.; VO, K. T.; MICHAELIS, S.; PADDON, C. Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 451-452, 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and controled**. Geneva: WHO Press, 2009.

OSANAI, C. H.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P.; TANG, A. T.; DO AMARAL, R. S.; PASSOS, A. D.; TAUIL, P. L. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 53-54, 1983.

PANG, T.; CARDOSA, M. J.; GUZMAN, M. G. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). **Immunology and Cell Biology**, London, v. 85, n. 1, p. 43-45, 2007.

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

PEKOSZ, A.; HE, B.; LAMB, R. A. Reverse genetics of negative-strand RNA viruses: closing the circle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, Washington, v. 96, n. 16, p. 8804-8806, 1999.

PIJLMAN, G. P.; FUNK, A.; KONDRATIEVA, N.; LEUNG, J.; TORRES, S.; VAN DER AA, L.; LIU, W. J.; PALMENBERG, A. C.; SHI, P. Y.; HALL, R. A.; KHROMYKH, A. A. A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 4, n. 6, p. 579-591, 2008.

POKIDYSHEVA, E.; ZHANG, Y.; BATTISTI, A. J.; BATOR-KELLY, C. M.; CHIPMAN, P. R.; XIAO, C.; GREGORIO, G. G.; HENDRICKSON, W. A.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. **Cell**, Cambridge, v. 124, n. 3, p. 485-493, 2006.

POLO, S.; KETNER, G.; LEVIS, R.; FALGOUT, B. Infectious RNA transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast. **Journal of Virology**, Washington, v. 71, n. 7, p. 5366-5374, 1997.

PUIG-BASAGOITI, F.; DEAS, T. S.; REN, P.; TILGNER, M.; FERGUSON, D. M.; SHI, P. Y. High-throughput assays using a luciferase-expressing replicon, virus-like particles, and full-length virus for West Nile virus drug discovery. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 12, p. 4980-4988, 2005.

PURI, B.; POLO, S.; HAYES, C. G.; FALGOUT, B. 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.

RAY, D.; SHAH, A.; TILGNER, M.; GUO, Y.; ZHAO, Y.; DONG, H.; DEAS, T. S.; ZHOU, Y.; LI, H.; SHI, P. Y. West Nile virus 5'-cap structure is formed by sequential guanine N-7 and ribose 2'-O methylations by nonstructural protein 5. **Journal of Virology**, Washington, v. 80, n. 17, p. 8362-8370, 2006.

RAYMOND, C. K.; SIMS, E. H.; OLSON, M. V. Linker-mediated recombinational subcloning of large DNA fragments using yeast. **Genome Research**, New York, v. 12, n. 1, p. 190-197, 2002.

RICE, C. M.; GRAKOU, A.; GALLER, R.; CHAMBERS, T. J. 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.

ROBERT PUTNAK, J.; COLLIER, B. A.; VOSS, G.; VAUGHN, D. W.; CLEMENTS, D.; PETERS, I.; BIGNAMI, G.; HOUNG, H. S.; CHEN, R. C.; BARVIR, D. A.; SERIWATANA, J.; CAYPHAS, S.; GARCON, N.; GHEYSEN, D.; KANESA-THASAN, N.; MCDONELL, M.; HUMPHREYS, T.; ECKELS, K. H.; PRIEELS, J. P.; INNIS, B. L. An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. **Vaccine**, Amsterdam, v. 23, n. 35, p. 4442-4452, 2005.

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**, Northbrook, v. 26, n. 3, p. 337-343, 1977.

ROSSI, S. L.; ZHAO, Q.; O'DONNELL, V. K.; MASON, P. W. Adaptation of West Nile virus replicons to cells in culture and use of replicon-bearing cells to probe antiviral action. **Virology**, New York, v. 331, n. 2, p. 457-470, 2005.

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

SAKUNTABHAI, A.; TURBPAIBOON, C.; CASADEMONT, I.; CHUANSUMRIT, A.; LOWHNOO, T.; KAJASTE-RUDNITSKI, A.; KALAYANAROOJ, S. M.; TANGNARARATCHAKIT, K.; TANGTHAWORNCHAIKUL, N.; VASANAWATHANA, S.; CHAIYARATANA, W.; YENCHITSOMANUS, P. T.; SURIYAPHOL, P.; AVIRUTNAN, P.; CHOKEPHAIBULKIT, K.; MATSUDA, F.; YOKSAN, S.; JACOB, Y.; LATHROP, G. M.; MALASIT, P.; DESPRES, P.; JULIER, C. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. **Nature Genetics**, New York, v. 37, n. 5, p. 507-513, 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAN MARTIN, J. L.; BRATHWAITE, O.; ZAMBRANO, B.; SOLORZANO, J. O.; BOUCKENOOGHE, A.; DAYAN, G. H.; GUZMAN, M. G. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 82, n. 1, p. 128-135, 2010.

SHAFEE, N.; ABUBAKAR, S. Dengue virus type 2 NS3 protease and NS2B-NS3 protease precursor induce apoptosis. **The Journal of General Virology**, London, v. 84, n. Pt 8, p. 2191-2195, 2003.

SHANKS, R. M.; KADOURI, D. E.; MACEACHRAN, D. P.; O'TOOLE, G. A. New yeast recombineering tools for bacteria. **Plasmid**, New York, v. 62, n. 2, p. 88-97, 2009.

SIQUEIRA, J. B., JR.; MARTELLI, C. M.; COELHO, G. E.; SIMPLICIO, A. C.; HATCH, D. L. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 11, n. 1, p. 48-53, 2005.

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**, Washington, v. 66, n. 9, p. 5425-5431, 1992.

SUN, W.; EDELMAN, R.; KANESA-THASAN, N.; ECKELS, K. H.; PUTNAK, J. R.; KING, A. D.; HOUNG, H. S.; TANG, D.; SCHERER, J. M.; HOKE, C. H., JR.; INNIS, B. L. Vaccination of human volunteers with monovalent and tetravalent live-attenuated dengue vaccine candidates. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 69, n. 6 Suppl, p. 24-31, 2003.

SUTHERST, R. W. Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, n. 1, p. 136-173, 2004.

SUZUKI, R.; DE BORBA, L.; DUARTE DOS SANTOS, C. N.; MASON, P. W. Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1: characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1. **Virology**, New York, v. 362, n. 2, p. 374-383, 2007.

SUZUKI, R.; WINKELMANN, E. R.; MASON, P. W. Construction and characterization of a single-cycle chimeric flavivirus vaccine candidate that protects mice against lethal challenge with dengue virus type 2. **Journal of Virology**, Washington, v. 83, n. 4, p. 1870-1880, 2009.

TABACHNICK, W. J. Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne disease epistystems in a changing world. **The Journal of Experimental Biology**, London, v. 213, n. Pt 6, p. 946-954, 2010.

TASSANEETRITHEP, B.; BURGESS, T. H.; GRANELLI-PIPERNO, A.; TRUMPFHELLER, C.; FINKE, J.; SUN, W.; ELLER, M. A.; PATTANAPANYASAT, K.; SARASOMBATH, S.; BIRX, D. L.; STEINMAN, R. M.; SCHLESINGER, S.; MAROVICH, M. A. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 197, n. 7, p. 823-829, 2003.

UMAREDDY, I.; CHAO, A.; SAMPATH, A.; GU, F.; VASUDEVAN, S. G. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. **The Journal of General Virology**, London, v. 87, n. Pt 9, p. 2605-2614, 2006.

UMAREDDY, I.; PLUQUET, O.; WANG, Q. Y.; VASUDEVAN, S. G.; CHEVET, E.; GU, F. Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. **Virology Journal**, London, v. 4, n., p. 91, 2007.

VARNAVSKI, A. N.; YOUNG, P. R.; KHROMYKH, A. A. Stable high-level expression of heterologous genes in vitro and in vivo by noncytopathic DNA-based Kunjin virus replicon vectors. **Journal of Virology**, Washington, v. 74, n. 9, p. 4394-4403, 2000.

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.

WANG, P. G.; KUDELKO, M.; LO, J.; SIU, L. Y.; KWOK, K. T.; SACHSE, M.; NICHOLLS, J. M.; BRUZZONE, R.; ALTMAYER, R. M.; NAL, B. Efficient assembly and secretion of recombinant subviral particles of the four dengue serotypes using native prM and E proteins. **PLoS One**, San Francisco, v. 4, n. 12, p. e8325, 2009.

WELSCH, S.; MILLER, S.; ROMERO-BREY, I.; MERZ, A.; BLECK, C. K.; WALTHER, P.; FULLER, S. D.; ANTONY, C.; KRIJNSE-LOCKER, J.; BARTENSCHLAGER, R. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 5, n. 4, p. 365-375, 2009.

WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P.; MURPHY, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, n. 7, p. 518-528, 2007.

WIDMAN, D. G.; ISHIKAWA, T.; FAYZULIN, R.; BOURNE, N.; MASON, P. W. Construction and characterization of a second-generation pseudoinfectious West Nile virus vaccine propagated using a new cultivation system. **Vaccine**, Amsterdam, v. 26, n. 22, p. 2762-2771, 2008.

YAMSHCHIKOV, V. F.; WENGLER, G.; PERELYGIN, A. A.; BRINTON, M. A.; COMPANS, R. W. An infectious clone of the West Nile flavivirus. **Virology**, New York, v. 281, n. 2, p. 294-304, 2001.

YON, C.; TERAMOTO, T.; MUELLER, N.; PHELAN, J.; GANESH, V. K.; MURTHY, K. H.; PADMANABHAN, R. Modulation of the nucleoside triphosphatase/RNA helicase and 5'-RNA triphosphatase activities of Dengue virus type 2 nonstructural protein 3 (NS3) by interaction with NS5, the RNA-dependent RNA polymerase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280, n. 29, p. 27412-27419, 2005.

YU, I. M.; ZHANG, W.; HOLDAWAY, H. A.; LI, L.; KOSTYUCHENKO, V. A.; CHIPMAN, P. R.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G.; CHEN, J. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. **Science**, New York, v. 319, n. 5871, p. 1834-1837, 2008.

YUN, S. I.; KIM, S. Y.; RICE, C. M.; LEE, Y. M. Development and application of a reverse genetics system for Japanese encephalitis virus. **Journal of Virology**, Washington, v. 77, n. 11, p. 6450-6465, 2003.

ZELLWEGER, R. M.; PRESTWOOD, T. R.; SHRESTA, S. Enhanced infection of liver sinusoidal endothelial cells in a mouse model of antibody-induced severe dengue disease. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 7, n. 2, p. 128-139, 2010.

9. Anexos

Anexo A – Lista de resumos publicados em anais de congressos

DA SILVA, A. N. M. R.; **SANTOS, J. J. S.**; ALMEIDA, S. R.; GALLER, R.; MARQUES, E. T. A.; Gil, L. H. V. G.. Construction and characterization of subgenomics Yellow Fever replicons. In: 1st Pan-American Dengue Meeting Network, 2008, Recife. Virus Reviews and Research. Rio de Janeiro : Brazilian Society for Virology, 2008. v. 13. p. 76-77.

SANTOS, J. J. S.; MARQUES, E. T. A.; BERTANI, G. R.; Gil, L. H. V. G.. Construção de replicon do vírus da dengue tipo 3. In: 12ª Jornada de Iniciação Científica do CPqAM/FIOCRUZ, 2008, Recife. 12ª Jornada de Iniciação Científica do CPqAM/FIOCRUZ, 2008.

SANTOS, J. J. S.; MARQUES, E. T. A.; BERTANI, G. R.; Gil, L. H. V. G.. Desenvolvimento de um replicon subgenômico para o vírus da dengue tipo 3. In: XVI Reunião Anual de Iniciação Científica da FIOCRUZ, 2008, Rio de Janeiro. XVI Reunião Anual de Iniciação Científica da FIOCRUZ, 2008.

OLIVEIRA, A. G.; ALMEIDA, S. R.; DA SILVA, A. N. M. R.; **SANTOS, J. J. S.**; BERTANI, G. R.; MARQUES, E. T. A.; Gil, L. H. V. G.. Development of a cell line based on yellow fever virus bicistronic replicon: advanced technology for antiviral screening against flavivirus. In: XX Encontro Nacional de Virologia, 2009, Brasília. Virus Review & Research. Rio de Janeiro : Sociedade Brasileira de Virologia, 2009. v. 14. p. 255-256.

SANTOS, J. J. S.; CORDEIRO, M. T.; BERTANI, G. R.; MARQUES, E. T. A.; Gil, L. H. V. G.. A reverse genetic system for the rescue of dengue virus 3. In: XX Encontro Nacional de Virologia, 2009, Brasília. Virus Review & Research. Rio de Janeiro : Sociedade Brasileira de Virologia, 2009. v. 14. p. 165-166.

OLIVEIRA, A. G.; DA SILVA, A. N. M. R.; ALMEIDA, S. R.; **SANTOS, J. J. S.**; MARQUES, E. T. A.; Gil, L. H. V. G.. Construção de replicon bicistrônico do vírus da febre amarela para o uso em triagem de drogas antivirais. In: XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2009, Recife/Olinda. 45o Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Brasília : Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2009. v. 42.

10. Memorial do aluno

Jefferson José da Silva Santos,
nascido em 12 de março de 1985.
Licenciado em Ciências Biológicas pela
Universidade Federal de Pernambuco em 28 de abril de 2008.
e-mail: jefferson.jss@gmail.com

Desde criança, a ciência sempre despertou o meu interesse. Contudo, foi apenas durante o ensino médio, em 2002, que eu decidi seguir uma carreira científica. Num primeiro momento, a minha afinidade com as diferentes ciências exatas e naturais tornou a escolha de uma área a seguir um trabalho árduo. Todavia, ao longo de 2003, a biologia mostrou-se ser a escolha mais apropriada, na qual eu poderia agregar os conhecimentos de áreas distintas, como química e física, no estudo de fenômenos biológicos. E desde esta época, eu já cultivava um grande interesse pela biologia molecular. Por uma série de razões, que não cabem aqui apresentar, eu optei pelo curso de Licenciatura em Ciências Biológica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), ingressando em 2004.

Como calouro, tudo era novo para mim. Então, durante o primeiro ano, eu preferi me concentrar apenas nas disciplinas e num projeto de extensão. Em 2005, por indicação do então mestrando Rafael Queiroz, vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Genética (PPGG)/UFPE, eu consegui o meu primeiro estágio. Nele, sob a orientação do Prof. Dr. Ederson Kido do Departamento de Genética/UFPE, eu trabalhei na mineração e anotação de dados do transcriptoma da *Leishmania chagasi*, usando ferramentas de bioinformática. Os dados produzidos durante este período foram apresentados durante o XVII Encontro de Genética do Nordeste (ENGINE) em 2006.

Neste mesmo ano, eu fui selecionado para um estágio no Departamento de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE)/Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ), sob a supervisão da Dra. Laura Gil. Eu fiquei impressionado com a idéia de trabalhar com um vírus, mais ainda, pela possibilidade de desenvolver projetos na área de virologia durante a graduação. Como bolsista de iniciação científica, eu trabalhei na clonagem de genes e na construção de replicons para o vírus dengue e outros flavivírus. Os resultados gerados foram apresentados no congresso da Sociedade Brasileira de Virologia (SBV) e nas Jornadas de Iniciação Científica do CPqAM, nas quais os resultados foram premiados em duas oportunidades. Em 2006, eu também cursei uma das disciplinas mais importantes na minha graduação, a disciplina Genética Molecular, a qual considero um divisor de águas na minha vida acadêmica. Fui monitor em disciplinas oferecidas pelo Departamento de Genética/UFPE.

Em 2007, eu tive a oportunidade de participar do programa de Bolsas de Verão do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), onde eu desenvolvi um projeto na área de cristalografia de proteínas sob a orientação da Dra. Beatriz Guimarães. Foi uma experiência incrível conhecer pessoas de outros estados e países, além de trabalhar numa área totalmente diferente da qual você está familiarizado. Já próximo da conclusão do curso, era hora de pensar na próxima etapa, a pós-graduação. Fazendo parte de uma equipe excelente e dispondo de uma infra-estrutura de primeira linha no LaViTE, eu optei por fazer o mestrado em Pernambuco, mesmo com a possibilidade de fazê-lo em outros estados. A PPGG foi a escolha óbvia, no qual estou vinculado desde 2008. O ano de 2008 foi bastante intenso: disciplinas, colação de grau, na qual fui laureado, além da participação no Entomol 3 e no *1st Pan-American Dengue Meeting Network*. Durante o mestrado, eu desenvolvi um sistema de genética reversa para o vírus dengue tipo 3, sob a orientação da Dra. Laura Gil. Parte dos resultados já foram apresentados no congresso da SBV em 2009. Eu também venho colaborando com diversos projetos em andamento no LaViTE. Em 2010, no momento em que concluo a minha dissertação, começo a dar os primeiros passos em direção a próxima etapa, o doutorado.