

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia

ANÁLISE DA COINFECÇÃO DE *DENGUE VIRUS* E *ZIKA VIRUS* E DO EFEITO DOS
INIBIDORES FARMACOLÓGICOS DE MEK/ERK DURANTE A COINFECÇÃO

Diogo Corrêa Mendonça

Belo Horizonte

2018

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia

ANÁLISE DA COINFECÇÃO DE *DENGUE VIRUS* E *ZIKA VIRUS* E DO EFEITO DOS
INIBIDORES FARMACOLÓGICOS DE MEK/ERK DURANTE A COINFECÇÃO

Dissertação apresentada
ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia da
Universidade Federal de Minas
Gerais como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Microbiologia

Aluno: Diogo Corrêa Mendonça

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Antônio Bonjardim

Co-orientador: Dr Leonardo Camilo de Oliveira

Belo Horizonte

2018

- 043 Mendonça, Diogo Corrêa.
Análise de coinfeção de Dengue virus e Zika virus e do efeito dos inibidores farmacológicos de MEK/ERK durante a coinfeção [manuscrito] / Diogo Corrêa Mendonça. – 2018.
75 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Cláudio Antônio Bonjardim. Co-orientador: Dr Leonardo Camilo de Oliveira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.
1. Microbiologia. 2. Vírus da Dengue. 3. Zika virus. 4. Coinfeção. 5. Antivirais. 6. Interações Hospedeiro-Patógeno. 7. MAP Quinase Quinase. I. Bonjardim, Cláudio Antônio. II. Oliveira, Leonardo Camilo de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE DIOGO CORREA MENDONÇA

Nº REGISTRO: 2016656179

Relator e Suplente: Prof. Dr. Jonatas Santos Abrahão

Às 09:00 horas do dia 09 de fevereiro de 2018, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Betânia de Paiva Drumond (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Pedro Augusto Alves (CPqPR - Fiocruz - MG) e o Prof. Cláudio Antônio Bonjardim - Orientador, para julgar o trabalho final "Análise de coinfeção de Dengue Virus e Zika Virus e do efeito dos inibidores farmacológicos de MEK/ERK durante a coinfeção", do aluno **Diogo Correa Mendonça**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 09 de fevereiro de 2018.

Profa. Dra. Betânia de Paiva Drumond

Prof. Dr. Pedro Augusto Alves

Prof. Cláudio Antônio Bonjardim (Orientador)

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

RESUMO

Dengue é a mais importante infecção viral transmitida por artrópodes, e estima-se que aproximadamente 100 milhões de pessoas sejam infectadas por ano, com taxas de mortalidade chegando a 5% quando não há tratamento, e 26% no caso da forma mais grave da doença. A Dengue pode ser causada por um dos quatro sorotipos distintos (DENV1-4). O Zika vírus causou, entre 2015-16, epidemias nas Américas, Pacífico, África e sudeste asiático e foi declarado problema de saúde pública global pela OMS diante da associação da doença com casos de má formação congênita, reportados no Brasil. A cocirculação de Dengue, e outros arbovírus como: Zika virus, Febre Amarela e Chikungunya, têm ocorrido com frequência em várias regiões endêmicas no Brasil. Neste contexto, a prospecção de antivirais deve ser avaliada em modelos que possibilitem a análise da atividade antiviral durante infecções que ocorram simultaneamente.

Análises de coinfeção iniciais em células VERO de DENV mostraram que apenas DENV-1 sofreu interferência viral quando coinfectado com DENV-3 e DENV-4, tendo seu número de cópias genômicas reduzidos em até 2 log₁₀. Coinfeção entre DENV-3 e DENV-4, não apresentou interferência viral e foram escolhidos para dar continuidade aos experimentos. Diferentes MOIs não alteraram os resultados, assim como a superinfecção em um intervalo de 6 horas, sugerindo que um vírus é capaz de infectar uma célula previamente infectada por outro vírus de sorotipo diferente. Foi feita a comparação entre o número de cópias genômicas e de partículas viáveis (UFP/mL) sendo encontrada uma proporção de 1:10000. Foi feita a curva de multiplicação de DENV-3 e DENV-4 em coinfeção a MOI de 1, e em nenhum dos intervalos de tempo analisados foi observado diferença significativa entre amostras individualmente infectadas e coinfectadas. Coinfeção entre ZIKV e DENV-4, mostrou que DENV-4 tem seu número de cópias genômicas reduzidos em até 1 log₁₀ nos intervalos de tempo de 24, 48 e 72 horas. Foi analisado o efeito dos inibidores MEKi-A e MEKi-B, na replicação de DENV-3 e DENV-4 individualmente ou coinfectados, em diferentes intervalos de tempo, não sendo observada diferença significativa entre amostras tratadas e não tratadas.

Palavras-chave: *Dengue virus*; *Zika virus*; coinfeção; MEK/ERK; interação vírus-hospedeiro; antivirais.

ABSTRACT

Dengue is the most important arthropod-borne viral infection, and it is estimated that that 100 million are infected every year, with mortality rate close to 5% in the absence of treatment, and 26% to severe dengue. Dengue can be caused by any of the four distinct serotypes (DENV1-4). Zika virus caused, between 2015 and 2016, epidemics in America, Africa, Pacific and southeast of Asia, and has been declared a world public health concern by WHO due the disease association with neurological problems and severe new born sequelae as microcephaly, reported in Brazil. Cocirculation of Dengue and other arboviruses such as Zika virus, yellow fever virus and Chikungunya virus have been frequently occurring on many endemic regions in Brazil. In this context, antivirals prospection must be evaluated on models that allow us to understand how the antiviral activity works during simultaneous infections.

Initial coinfection analysis of DENV in VERO cell line showed that only DENV-1 was affected when coinfecting with DENV-3 and DENV-4, with its genomic copy numbers reduced around 2 log₁₀. No viral interference was observed between DENV-3 and DENV-4, and they were chosen to proceed with the coinfection experiments. Different MOIs did not change the results, as the superinfection with time lapse of 6 hours, suggesting that the virus is capable of infect a previous infected cell by another different virus. We compared the number of genomic copies with the number of viable particles (PFU/mL) and found a rate of 1:10000. We also did the multiplication curve of DENV-3 and DENV-4 at MOI 1, and no significative difference was observed between the samples. Coinfection between ZIKV and DENV-4 showed that DENV-4 had its genomic copies reduced around 1 log₁₀ in 24, 48 and 72 h.p.i. The use of the inhibitors MEKi-A and MEKi-B, had no effect in replication of DENV-3 and DENV-4, regardless of coinfection.

Keywords: *Dengue virus*; *Zika virus*; coinfection; MEK/ERK; virus-host interaction; antivirals

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1: O Genoma de Flavivírus	17
Figura 1.2: Estrutura geral da partícula dos Flavivírus -	18
Figura 2: Árvore filogenética do Gênero Flavivírus	20
Figura 3: Ciclo de multiplicação dos Flavivírus.....	21
Figura 4: A distribuição mundial da Dengue.....	22
Figura 5: Filogenia de DENV-1	25
Figura 6: Filogenia de DENV-2	26
Figura 7: Filogenia de DENV-3	27
Figura 8: Filogenia de DENV-4	28
Figura 9: Critérios de classificação de Dengue	29
Figura 10: Fases clínicas de Dengue	31
Figura 11: Ciclos de transmissão do vírus da Dengue.....	32
Figura 13: Difusão espacial do ZIKV de 2014-2016	34
Figura 14: Árvore filogenética do ZIKV	35
Figura 12: Cascatas de sinalização envolvendo MAPK.....	40
Figura 16: Coinfecção DENV-1	56
Figura 17: Coinfecção DENV-2	57
Figura 18: Coinfecção DENV-3	58
Figura 19: Coinfecção DENV-4	59
Figura 20: Seleção dos plasmídeos por qPCR.....	60
Figura 21: Curva padrão com diluições seriadas na base de 10 do plasmídeo.....	61
Figura 22: Coinfecção DENV-3 e DENV-4.....	63
Figura 23: Comparação entre titulação e qPCR	64
Figura 24: Amostras normalizadas com HPRT	65
Figura 25: Curva de multiplicação viral em infecção individual e coinfecção	67
Figura 26: Superinfecção DENV3/4 6 horas	68
Figura 27: Citotoxicidade do inibidor MEKi-B-por MTT e cristal violeta.....	70
Figura 28: Tratamento das amostras coinfectadas com inibidor MEKi-A.....	72
Figura 29: Tratamento das amostras coinfectadas com inibidor MEKi-B	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipos de Interferência Viral.....	39
Tabela 2: Condições para os ciclos de amplificação por RT-qPCR.....	50
Tabela 3: Iniciadores Utilizados nos ciclos de amplificação por qPCR.....	50
Tabela 3 - Percentual de células infectadas	62

LISTA DE ABREVIATURAS

Arg = aminoácido Arginina

cDNA = DNA complementar

Ct = Ponto na curva da reação de qPCR onde a curva se encontra com a linha de *threshold - cyclethreshold*

CMC = carboximetilcelulose

DENV = Dengue vírus

DMSO = Dimetilsulfóxido

EG = Equivalentes genômicos

ERK = Proteína cinase regulada por sinais extracelulares, do inglês *extracellularsignal-regulatedkinaseprotein*

GTS = Grupo de Transdução de Sinal

H.P.I. = Horas pós infecção

IgG = Imunoglobulina G

IgM = Imunoglobulina M

IF = Inibidor farmacológico

ISFV = Flavivírus específicos de insetos, do inglês *insect-specificflaviviruses*

JEV = *Japanese Encephalitis virus*

JNK = Proteína cinase c-Jun N-terminal, do inglês *c-Jun N-terminal kinase*

kDa = kilodaltons

LB = Luria-Bertani

Lys = aminoácido lisina

MAPK = Proteínas cinases ativadas por mitógenos, do inglês *mitogen activated protein kinase*

MBFV = Flavivírus cujos vetores são mosquitos, do inglês *mosquito-borne flavivirus*

MEK = *mitogen-activated protein kinase*

MEKi-A – inibidor de MEK/ERK A

MEKi-B – inibidor de MEK/ERK B

MEM = Meio mínimo essencial

MOI = Multiplicidade de infecção, do inglês *multiplicity of infection*

NTPase = Enzima envolvida na replicação e transcrição de RNA viral de fita simples, do inglês *RNA nucleoside triphosphatases*

ORF = Sequência codificadora, do inglês *open Reading frame*

PBS = Salina tamponada por fosfato, do inglês *phosphate-buffered saline*

PCR = reação em cadeia da polimerase

qPCR = reação em cadeia da polimerase quantitativa

RdRP = RNA polimerase dependente de RNA, do inglês *RNA-dependent RNA polymerase*

RTPase = Enzimas que clivam a porção 5' do mRNA para a adição do CAP, do inglês *RNA 5'-triphosphatase*

Src = Forma abreviada de sarcoma

SDS = Dodecil sulfato de sódio

SFB = Soro fetal bovino

SNC = Sistema Nervoso Central

TAE = Tampão Tris-Acetato-EDTA

TBFV = Flavivírus cujos vetores são carrapatos, do inglês *tick-borne flavivirus*

TOT = Transmissões trans-ovarianas, do inglês *transovarial transmission*

UFP = unidade formadora de placa

UTR = Região não traduzida do inglês *untranslated region*

WHO = Organização Mundial de Saúde, do inglês *World Health Organization*

WNV = West Nile virus

YFV = Yellow Fever virus

ZIKV = Zika vírus

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	14
1.1 Flavivírus.....	14
1.1.1 Estrutura dos Flavivírus.....	14
1.1.2 Filogenia e Classificação.....	18
1.1.3 Ciclo de Multiplicação	19
1.2 Dengue.....	21
1.2.1 Filogenia	23
1.2.2 Aspectos Clínicos	29
1.2.3 Ciclo de infecção	31
1.3 Zika.....	33
1.3.1 Filogenia	34
1.3.2 Aspectos Clínicos	35
1.3.3 Ciclo de infecção	36
1.4 Coinfecção e Interferência Viral.....	37
1.5 Proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e respectivas vias de sinalização	39
1.5.1 Cascata de sinalização MEK/ERK	40
1.5.2 MAPKs e infecção viral	41
2 –JUSTIFICATIVA	43
3 – OBJETIVOS.....	44
3.1 Objetivo Geral	44
3.2 Objetivos Específicos	44
4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 Células	45
4.1.1 Células VERO	45
4.1.2 Células BHK.....	45
4.2 Inibidores Farmacológicos	45

4.3 Teste de viabilidade celular –MTT.....	46
4.4 Teste de viabilidade celular -Cristal Violeta	47
4.5 Vírus	47
4.6 Curva de Multiplicação Viral por titulação e qPCR.....	47
4.7 Titulação	48
4.8 Coinfecção de linhagens celulares.....	48
4.9 Extração de RNA e Transcrição Reversa	49
4.10 Quantificação de RNA utilizando qPCR.....	50
4.11 Clonagem do fragmento amplificado no plasmídeo vetor PGEM® -T Easy.....	51
4.12 Transformação bacteriana.....	51
4.13 Confirmação da presença do plasmídeo controle de DENV-4 e DENV-3 nas bactérias transformadas, por PCR quantitativa em tempo real.....	52
4.14 Isolamento do DNA plasmidial e quantificação em Nanodrop.....	52
4.15 Amplificação por RT-qPCR e eletroforese em gel de Agarose para confirmação do tamanho do inserto.	53
4.16 Linearização dos plasmídeos controles por digestão com Enzimas de Restrição	53
4.17 Purificação do fragmento digerido do gel de Agarose	53
4.18 Diluição seriada e curva de quantificação absoluta por RT-qPCR	54
4.19 Teste de eficiência dos inibidores.....	54
4.20 Análise estatística	55
5 – RESULTADOS	55
5.1. Coinfecção VERO – comparação entre os 4 sorotipos.	55
5.2. Obtenção de plasmídeos controles	59
5.3 Quantificação absoluta de DENV-3 e DENV-4.....	61
5.4 Curva de Multiplicação DENV-3 e DENV-4 – Comparação PCR (EG) x ensaio de placa (UFP)	63
5.5 Padronização do iniciador de HPRT	64
5.6 Curvas de multiplicação em coinfecção – DENV-3/4.....	66

5.7 Superinfecção DENV3/DENV4	68
5.8 Teste de citotoxicidade MEKi-B	69
5.9 Tratamento das amostras coinfetadas com MEKi-A	71
5.10 Tratamento das amostras coinfetadas com MEKi-B	72
5.11 Coinfecção DENV-4 e ZIKV	74
6 – DISCUSSÃO	76
7–CONCLUSÕES	80
8 – REFERÊNCIAS	81

1 - INTRODUÇÃO

1.1 Flavivírus

O nome *Flavivirus* é derivado do Latim *Flavus* cujo significado é amarelo, referindo-se a icterícia causada pela Febre Amarela. O gênero é composto por mais de 70 espécies, incluindo o *Dengue vírus* (DENV), *Zika vírus* (ZIKV), *West Nile vírus* (WNV), vírus da Encefalite Japonesa (JEV) e o vírus da Febre Amarela (YFV). O gênero pertence à família *Flaviviridae*, que também inclui os gêneros *Hepacivirus* e *Pestivirus* (KUNO et al., 1998; MUKHOPADHYAY et al., 2005). Os flavivírus estão presentes em todos os seis continentes, e são responsáveis por causar doenças epidêmicas e endêmicas, em particular em países em desenvolvimento. Muitas espécies do gênero são arbovírus (carreados por artrópodes). Flavivírus causam zoonoses e são dependentes de animais para sua continuidade na natureza, com humanos sendo hospedeiros acidentais e não contribuindo para o ciclo de vida natural do vírus. O *Dengue vírus*, no entanto, é uma exceção, visto que se adaptaram completamente a áreas urbanas, e são capazes de manter-se em ciclos humano-mosquito-humano sendo independente de reservatórios animais. (MACKENZIE et al., 2004). Muitos dos flavivírus são associados com doenças, em humanos e animais, que causam grande impacto na saúde pública e na economia global. Não existe tratamento específico para essas doenças (ZHANG et al., 2017, incluindo antivirais, e o combate é feito de maneira preventiva, principalmente no combate ao vetor. A vacina da febre amarela é obrigatória em áreas endêmicas e administrada durante surtos da doença. Uma vacina para Dengue foi recentemente aprovada em diversos países, a CYD-TDV, ou *Dengvaxia*, é uma vacina do vírus atenuado recombinante, tetravalente para os quatro sorotipos, com aproximadamente 60% de eficácia nos testes clínicos efetuados e entre 30 e 70% nos países onde foi testada (WHO, 2016)

1.1.1 Estrutura dos Flavivírus

O gênero apresenta vírus pequenos, envelopados com morfologia icosaédrica com diâmetro em torno de 50 nm, com RNA fita simples, senso positivo, com tamanho aproximado de 11kb. O genoma geralmente é composto uma única *ORF*, flanqueada nas extremidades por duas regiões não traduzidas (UTRs), e codifica uma poliproteína, que ao ser clivada gera três proteínas estruturais: Proteína do Capsídeo (C), Proteína de Pré-

membrana/Membrana (prM/M), Proteína do Envelope (E) e 7 proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. (Figura 1.1).

A proteína do capsídeo é pequena (12-14kDa), carregada positivamente (25% Lys+Arg), e é componente estrutural do nucleocapsídeo (CHAMBERS et al., 1990) Sua carga positiva está, provavelmente, relacionada a formação do complexo capsídeo RNA, neutralizando parte da carga negativa do RNA mantendo o complexo compacto (RICE et al., 1985). As extremidades N e C terminal, positivamente carregadas, são separadas por uma região hidrofóbica envolvida na associação com a membrana (LINDENBACH; RICE, 2007).

A proteína prM é a glicoproteína precursora da proteína estrutural M. Tem tamanho aproximado de 26 kDa e sua principal função é impedir que a proteína E sofra um rearranjo para sua forma fusogênica, devido ao pH ácido durante o transporte da mesma pelas vias secretórias. Além disso, a clivagem de prM nos fragmentos pr e M pela furina coincide com a maturação de vírions na via secretória, e o bloqueio na clivagem de prM causa a liberação de partículas virais imaturas (LINDENBACH; RICE, 2007).

A glicoproteína E tem tamanho aproximado de 53 kDa e é a principal proteína de superfície dos flavivírus, tendo um papel essencial durante a interação e ligação com receptores celulares e durante a fusão com a membrana celular. A proteína E é composta de três domínios: I que forma uma estrutura de barril- β , II que contém um peptídeo responsável pela inserção na membrana celular e III associada à ligação com receptores celulares, e um dos principais alvos de anticorpos neutralizantes (CHAMBERS et al., 1990; LINDENBACH; RICE, 2007).

A proteína NS1 tem tamanho que varia entre 46 e 55 kDa, dependendo de seu estado de glicosilação, a proteína possui múltiplas formas oligoméricas e pode ser encontrada em localizações celulares diversas, seja associada a membrana celular (mNS1), em compartimentos vesiculares no interior ou na superfície da célula, e em uma forma secretada extracelular rica em lipídios (sNS1) (GUTSCHE et al., 2011; MULLER e YOUNG, 2013). NS1 intracelular tem papel na replicação viral, sendo encontrada próxima a dsRNA e outros complexos de replicação, mas sua função exata ainda não é completamente entendida (MACKENZIE et al., 1996; MULLER e YOUNG, 2013). NS1 secretada e associada à superfície tem funções ainda não completamente elucidadas, mas sabe-se que são altamente imunogênicas e associadas à patogenicidade da doença (ADIKARI et al., 2016; MULLER e YOUNG, 2013; SUN et al., 2007).

NS2A tem tamanho aproximado de 22kDa, hidrofóbica, envolvida na montagem e liberação de vírions, síntese de RNA viral, regulação da expressão de NS1 e inibição de resposta a interferon tipo I (CHAMBERS et al., 1990; FIRTH e ATKINS, 2009). NS2B forma um complexo com NS3 e age como cofator da serina-protease NS2B-NS3 (LINDENBACH e RICE, 2007).

NS3 é uma grande proteína multifuncional de tamanho aproximado de 70 kDa necessária para o processamento da poliproteína e replicação do RNA viral (LINDENBACH; RICE, 2007). A porção N terminal da proteína (um terço), contém a protease NS3pro que associada com a porção NS2B forma a serina-protease NS2B-NS3. A outra parte, NS3hel, apresenta função de RNA helicase, NTPase e RTPase (ASSENBERG et al., 2009; MARUYAMA et al., 2014).

NS4A e NS4B são pequenas proteínas hidrofóbicas de tamanho aproximado de 16 e 27 kDa, respectivamente. NS4A localiza-se próxima aos complexos de replicação tendo, possivelmente, papel na replicação de RNA (LINDENBACH e RICE, 2007; MACKENZIE et al., 1998). NS4B localiza-se próximo a NS3 e a dsRNA, e se liga a porção C-terminal de NS3 dissociando-o do ssRNA permitindo sua ligação a outro duplex facilitando a atividade de helicase de NS3 (GREEN et al., 2014; UMAREDDY et al., 2006).

NS5 é uma grande proteína de tamanho aproximado de 103 kDa, altamente conservada entre flavivírus. É multifuncional com atividade de metiltransferase e de RNA polimerase-dependente de RNA (RdRP), além de estar envolvida na formação do cap 5' do RNA viral (LINDENBACH; RICE, 2007; MARUYAMA et al., 2014).

O nucleocapsídeo é envolto por uma membrana lipídica obtida do hospedeiro com as duas proteínas transmembrana inseridas, a glicoproteína E, e a proteína de membrana M (SMIT et al., 2011). (Figura 1.2).

Existem exceções para uma única ORF codificando todas as proteínas virais, como é o caso de alguns flavivírus cujos vetores são mosquito (MBFV, do inglês *mosquito borne flavivirus*) do grupo da encefalite japonesa, que produzem a NS1', uma NS1 alternativa através de um mecanismo de alteração de fase de leitura no ribossomo (*ribosomal frameshifting*) (FIRTH; ATKINS, 2009; HUHTAMO et al., 2014). Outra exceção é a proteína "fifó", codificada pela sobreposição dos genes NS2A e NS2B, encontrada em alguns

flavivírus específicos de insetos (ISFV, do inglês *insect-specific flaviviruses* (FIRTH et al., 2010; HUHTAMO et al., 2014).

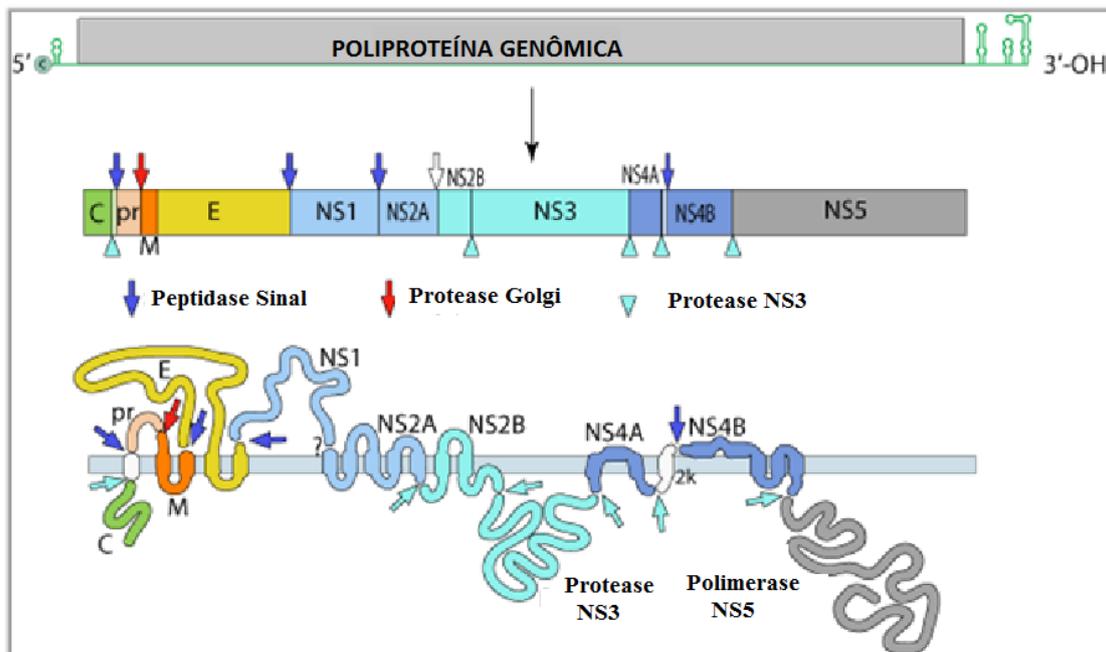


Figura 1.1: O Genoma de Flavivírus. As proteínas estruturais estão localizadas na extremidade 5' seguida das proteínas não estruturais. A extremidade 5' possui Cap, enquanto que a extremidade 3' não possui cauda poli-A, mas forma alças através de pareamentos intramoleculares. (Modificado de http://viralzone.expasy.org/all_by_species/24.html Acesso em 18/07/2016)

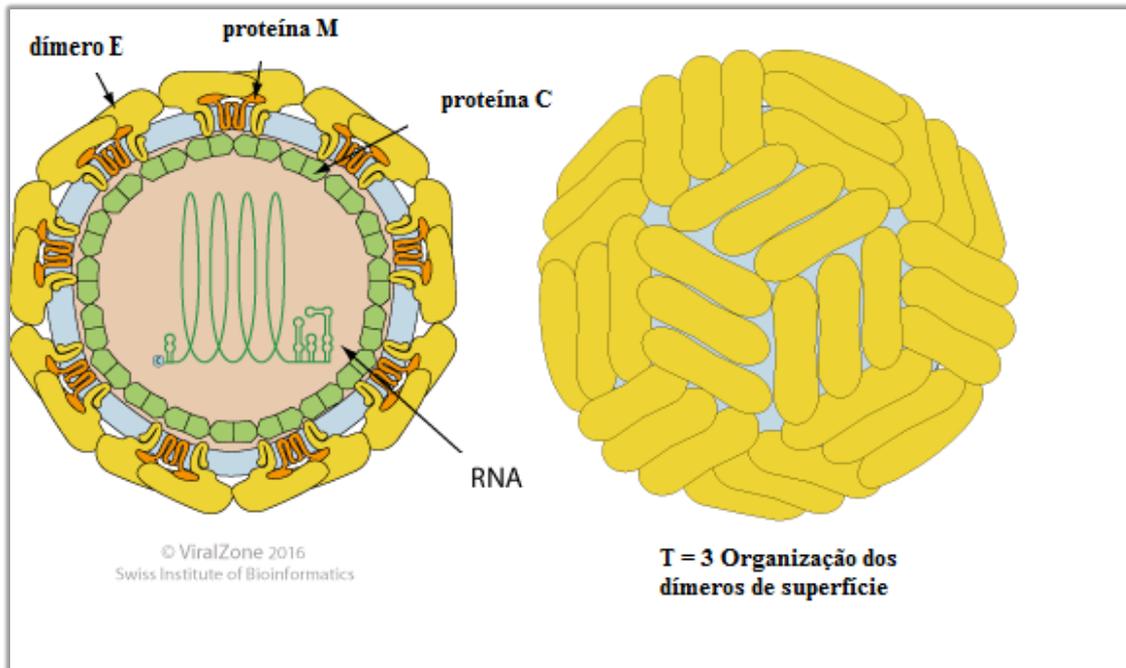


Figura 1.2: Estrutura geral da partícula dos Flavivírus - Figura à esquerda. Estão assinaladas as proteínas do: Envelope E; Membrana M; Capsídeo C e genoma viral composto de fita RNA simples sentido positivo. Figura à direita. Está mostrada a organização espacial contendo os dímeros de superfície. Modificado de (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/24.html Acesso em 19/07/2016).

1.1.2 Filogenia e Classificação

Flavivírus são normalmente classificados em complexos ou subcomplexos antigênicos de acordo com critérios sorológicos, e também classificados em clusters, clados e espécies, de acordo com dados moleculares. Estudos taxonômicos de flavivírus sempre estão sendo modificados e atualizados, com base em novas informações como descobrimento de novas espécies ou novas análises moleculares (BLITVICH e FIRTH, 2015; CHAMBERS et al., 1990; KUNO et al., 1998; MUKHOPADHYAY et al., 2005).

Filogenias recentes, com base nos hospedeiros, tanto artrópodes, quanto vertebrados, classificam os flavivírus em quatro grandes grupos: ISFV, flavivírus cujos vetores são carrapatos (*tick-borne* - TBFV), MBFV, e sem vetor conhecido (*no known-vector flaviviruses* - NKV) (MOUREAU et al., 2015) (Figura 3). ISFs também podem ser subdivididos em dois grupos: flavivírus filogeneticamente distintos de outros flavivírus ou ISFs clássicos (cISFs) e os afiliados filogeneticamente com MBFV referidos como ISFs com dois hospedeiros (dISFs). O gênero também inclui linhagens extremamente divergentes dos grupos anteriores

como o *Tamatabat virus*(TABV), *Ngoye virus*(NGOV) e o *Mogiana Tickvirus*(MOTV) (BLITVICH e FIRTH, 2015; DE LAMBALLERIE et al., 2002; GRARD et al., 2006; MARUYAMA et al., 2014).

1.1.3 Ciclo de Multiplicação

Os vírions aderem-se a superfície da célula hospedeira e penetram na mesma através de endocitose mediada pela proteína Clatrina (SMIT et al., 2011). No interior da vesícula endossomal, o pH ácido causa modificações conformacionais irreversíveis na proteína E (trimerização), levando a fusão da membrana da célula e o envelope viral e a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. O capsídeo e o RNA separam-se, o RNA é traduzido em uma poliproteína que eventualmente é processada co- e pós-traducionalmente. A montagem do vírus ocorre no retículo endoplasmático aonde as proteínas estruturais e o recém-sintetizado RNA formam partículas imaturas não infecciosas contendo a proteína estrutural prM. Essas partículas são transportadas através da rede Trans-Golgi (do inglês *Trans-Golgi Network*), onde também ocorre a clivagem da proteína prM levando a criação de partículas maduras e infecciosas (Figura 4) (MUKHOPADHYAY et. al., 2005; SMIT et al., 2011).

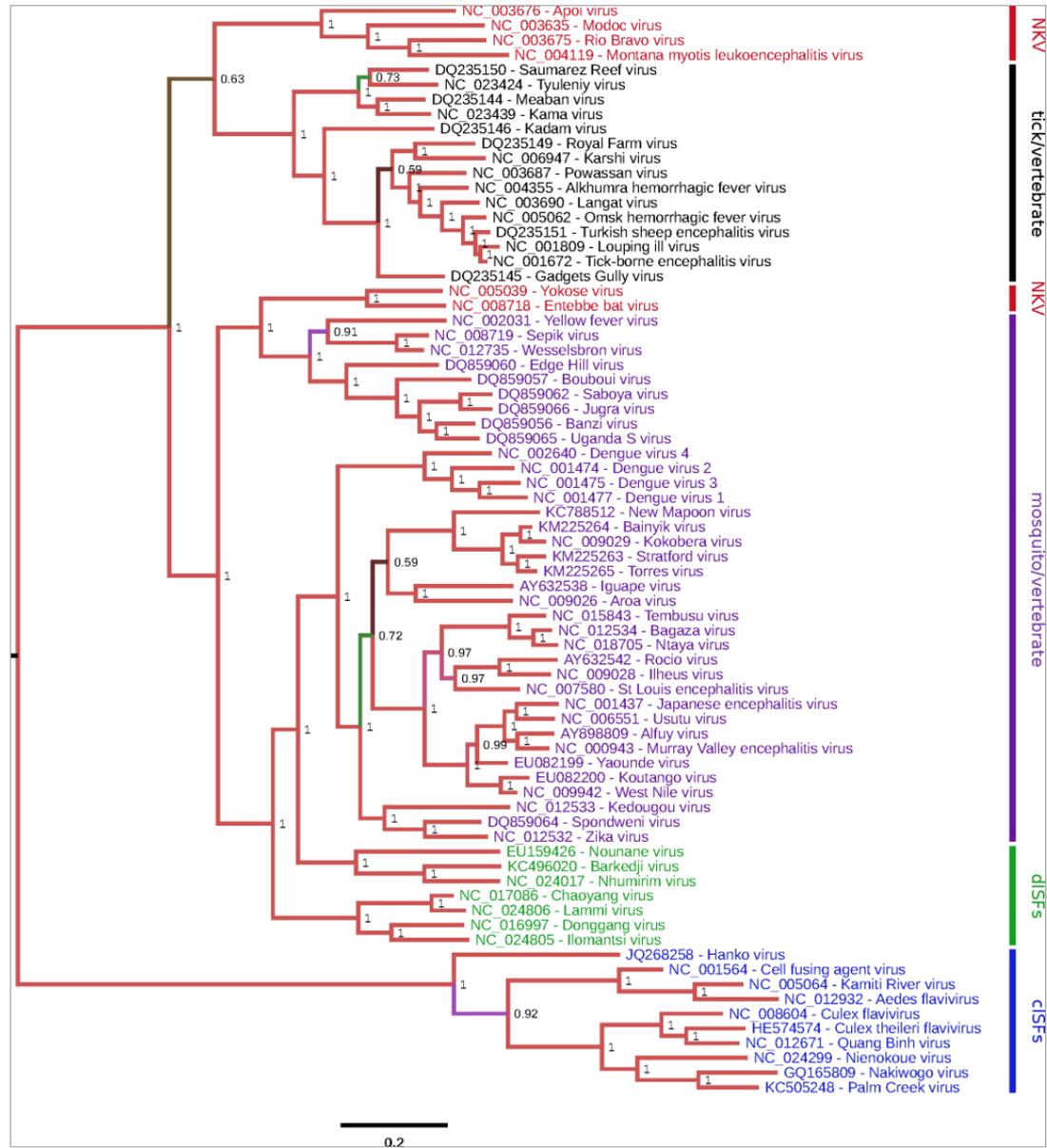


Figura 2: Árvore filogenética do Gênero Flavivirus—A árvore foi construída baseada nas sequências de aminoácidos da poliproteína. Nomes de espécies coloridos da seguinte forma: cISFs = azul, dISFs = verde, NKV = vermelho, MBFVs = roxo e TBFV = preto (fonte: BLITVICH e FIRTH, 2015).

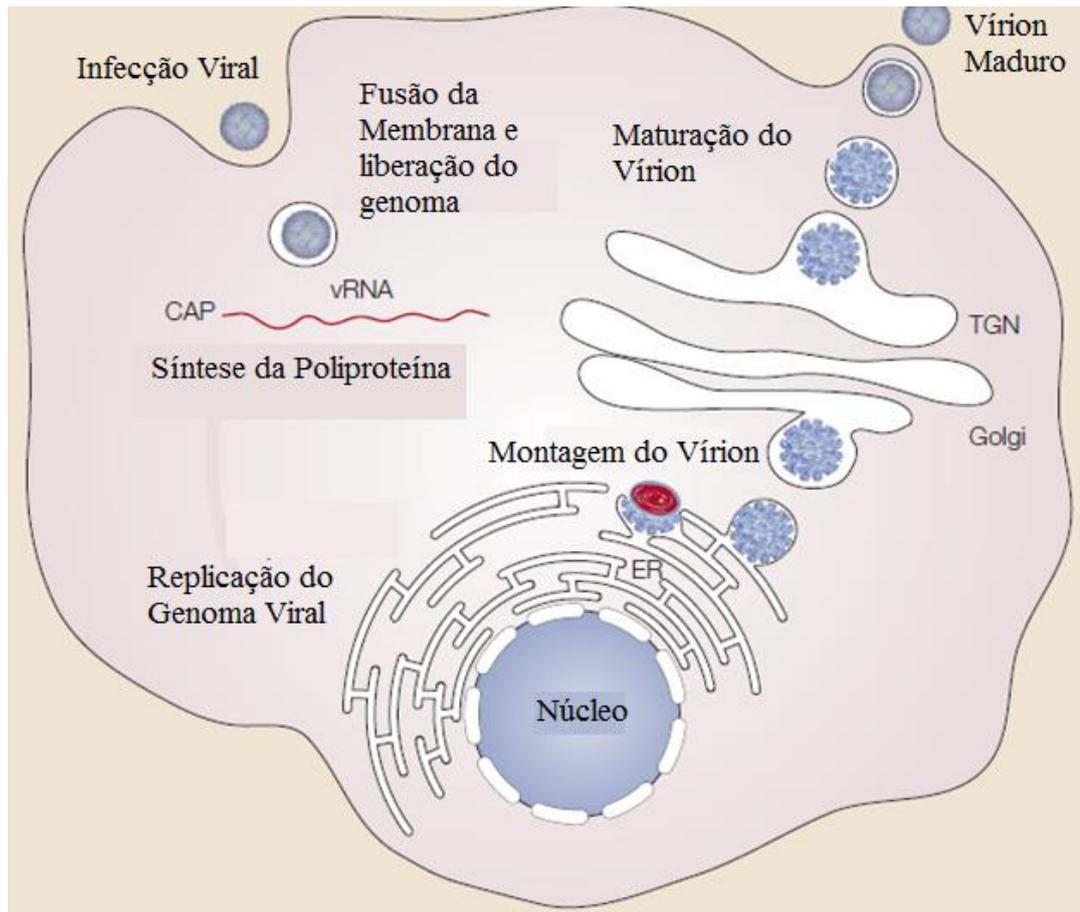


Figura 3: Ciclo de multiplicação dos Flavivírus. Vírions se ligam a superfície da célula e penetram a célula por endocitose mediada por receptores específicos. O genoma viral (vRNA) é liberado no citoplasma, sendo traduzido em uma poliproteína, seguida da replicação do RNA viral. A montagem da partícula viral ocorre no retículo endoplasmático e a maturação da partícula viral se dá através da passagem pelo Golgi e trans-Golgi (TGN). O vírus é liberado por exocitose. (Modificado de MUKHOPADHYAY et. al., 2005).

1.2 Dengue

Dengue é considerada uma das mais importantes infecções virais transmitidas por artrópodes. A palavra dengue é um homônimo espanhol da frase *Ka-Dingapepo* do idioma africano suaíli, que se refere a uma doença causada por maus espíritos. Seu primeiro registro conhecido, provavelmente, encontra-se em uma enciclopédia médica chinesa da dinastia Jin (265-420 DC), com o nome de veneno de água, associado com insetos voadores (SINIVAS e SRINIVAS, 2015). Estima-se que mais de 2.5 bilhões de pessoas estejam em áreas de risco de infecção, em particular em áreas urbanas de países tropicais no sudeste da Ásia, no Pacífico e

nas Américas (Figura 5). Estima-se que mais de 100 milhões de pessoas sejam infectadas por ano. Taxas de mortalidade podem chegar a até 5% sem tratamento, e 26% no caso da forma mais grave da doença. A incidência da doença teve um aumento de mais de 30 vezes nos últimos 50 anos, e tem um alto impacto social e econômico em mais de 100 países. Nas Américas, a doença causa prejuízos entre 1 e 2 bilhões de dólares, excluindo-se gastos com o controle do mosquito, e excedendo custos de outras doenças virais (SHEPARD et al., 2011). No sudeste asiático, o custo pode chegar a 1 bilhão de dólares por ano (SHEPARD e UNDURRAGA; HALASA, 2013). A crescente imersão da dengue é associada às mudanças demográficas e sociais nos últimos 50 anos, em particular o crescimento populacional descontrolado, frequente trânsito de pessoas (e naturalmente vírus), aumento na urbanização e subsequente redução de áreas naturais, mudanças climáticas e problemas nos sistemas de saúde, tornando a doença uma preocupação grave da comunidade internacional sendo uma das mais importantes doenças emergentes do mundo (GUZMAN e HARRIS, 2015; GUZMAN et al., 2010; SREATON et al., 2015; SRINIVAS e SRINIVAS, 2015).

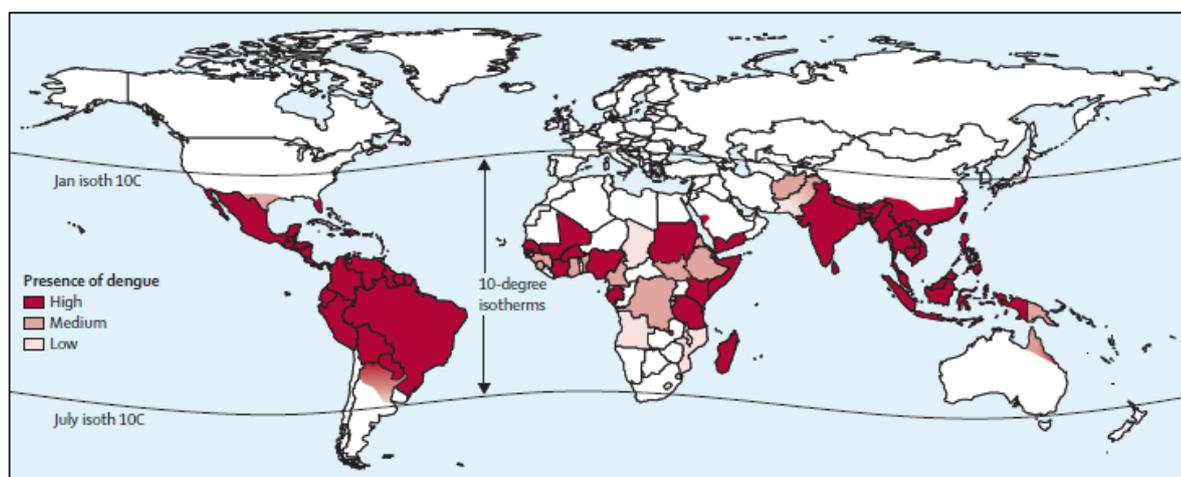


Figura 4: A distribuição mundial da Dengue - Mapa mostrando a frequência de dengue em diversos países. Em vermelho países onde há alta frequência de dengue, em rosa há média e em rosa claro baixa frequência. O mapa também mostra as linhas isotérmicas de 10° C em janeiro e julho para os hemisférios norte e sul respectivamente. As linhas indicam possíveis limites geográficos para a sobrevivência do *Aedes aegypti* (Fonte: GUZMAN e HARRIS, 2015).

1.2.1 Filogenia

Os quatro sorotipos de dengue (DENV 1-4) são geneticamente diversos, com semelhança entre eles de 65-70% do nível de aminoácidos. Dentro do mesmo sorotipo os vírus apresentam em torno de 3% de diferença de aminoácidos e 6% de nucleotídeos, e podem ser divididos em genótipos e clados. Essas variações determinam a aptidão, virulência e potencial epidemiológico do vírus, por exemplo, linhagens com alto poder replicativo tanto em seres humanos, quanto em mosquitos, podem propagar-se rapidamente, e quando introduzidas em um novo local podem acabar suprimindo linhagens menos adaptadas. A resposta do hospedeiro a infecção naturalmente também depende das características genéticas do vírus. Dessa forma, sorotipos e genótipos específicos podem ser associados a manifestações clínicas diferentes e graus de severidade distintos (GUZMAN; HARRIS, 2015).

DENV-1 é composto por cinco genótipos: I com linhagens do Sudeste asiático, China e Arábia Saudita; genótipo II com linhagens da Tailândia; III incluindo linhagens silvestres coletadas na Malásia; genótipo IV com linhagens do Pacífico e Austrália e o genótipo V com linhagens das Américas, Oeste Africano e Ásia (Figura 6). Análises do gene E feita por Chen e Vasilakis em 2011 e análises de genoma completo, questionam a posição do genótipo III dentro do sorotipo, abrindo a possibilidade deste genótipo originar-se de seres humanos e ter sido transmitida para macacos, ao invés de ser um genótipo silvestre verdadeiro (CHEN e VASILAKIS, 2011). Há poucos estudos conclusivos relacionando genótipos de DENV-1 e virulência (R. RICO-HESSE., 2003).

DENV-2 é o sorotipo mais estudado tradicionalmente por causar epidemias mais graves e frequentes, Nas Américas, o sorotipo foi o primeiro a ser associado a Dengue Grave (antiga Dengue Hemorrágica) (KOURI et al., 1983), e no sudeste asiático foi o primeiro dengue vírus detectado (SANGKAWIBHA et al., 1984). DENV-2 é classificado em seis genótipos: Asiático I, com linhagens da Tailândia, Malásia, Vietnam, Myanmar, Camboja e Austrália; genótipo Asiático II, representando linhagens da China, Indonésia, Filipinas, Índia, Honduras, Sri Lanka e México; genótipo III, Sudeste Asiático/Americano; genótipo IV, Cosmopolita com da África, ilhas do Pacífico, Índia e Austrália; genótipo V, Americano com linhagens da América Central, América do Sul e Caribe, além de amostras as antigas da Índia e ilhas do Pacífico; e o genótipo VI, silvestre com linhagens coletadas no oeste africano e sudeste asiático (Figura 7) (CHEN e VASILAKIS, 2011).

O genótipo III é separado em 2 diferentes clados, i) com linhagens da Ásia e ii) com linhagens da América Central, América do Sul e Caribe. A introdução desse genótipo em Cuba e sua subsequente propagação pela região caribenha está diretamente associada ao aumento nos casos de Dengue Grave nas Américas, principalmente pela obtenção de vírus de pacientes com sintomas característicos de Dengue Grave os quais todos pertenciam ao sorotipo 2 até 1998 (R., Rico-Hesse, 2003; Chen e Vasilakis, 2011).

DENV-3 é classificado em cinco genótipos: I com linhagens da parte marítima do sudeste asiático, incluindo Indonésia, Cingapura, Malásia, Filipinas e Taiwan; genótipo II proveniente principalmente da Tailândia; genótipo III com linhagens do Sri Lanka, Índia, Japão, Taiwan, Cingapura, Samoa, leste da África, Américas Central e do Sul, Caribe e algumas da Europa; genótipo IV proveniente de Porto Rico e Taiti; e o genótipo V com linhagens das Filipinas, China, Japão e Brasil (Figura8)(ARAÚJO et al., 2012; CHEN e VASILAKIS, 2011).

DENV-4 é composto por quatro genótipos: I com linhagens da Malásia, Filipinas, Tailândia, Myanmar, Sri Lanka e Índia principalmente; genótipo II proveniente do Sudeste Asiático, China, Pacífico, Américas e Caribe; genótipo III com cinco linhagens tailandesas distintas e o genótipo IV com três linhagens silvestres isoladas de macacos na Malásia (Figura 9)(CHEN e VASILAKIS, 2011; LANCIOTTI et. al., 1997; WANG et al., 2000). É extremamente difícil confirmar a circulação do genótipo silvestre malaio devido à invasão do vírus de ciclo urbano. Esse sorotipo apresenta pouca transmissibilidade com poucos casos sendo reportados em comparação com outros sorotipos(R., Rico-Hesse 2003).

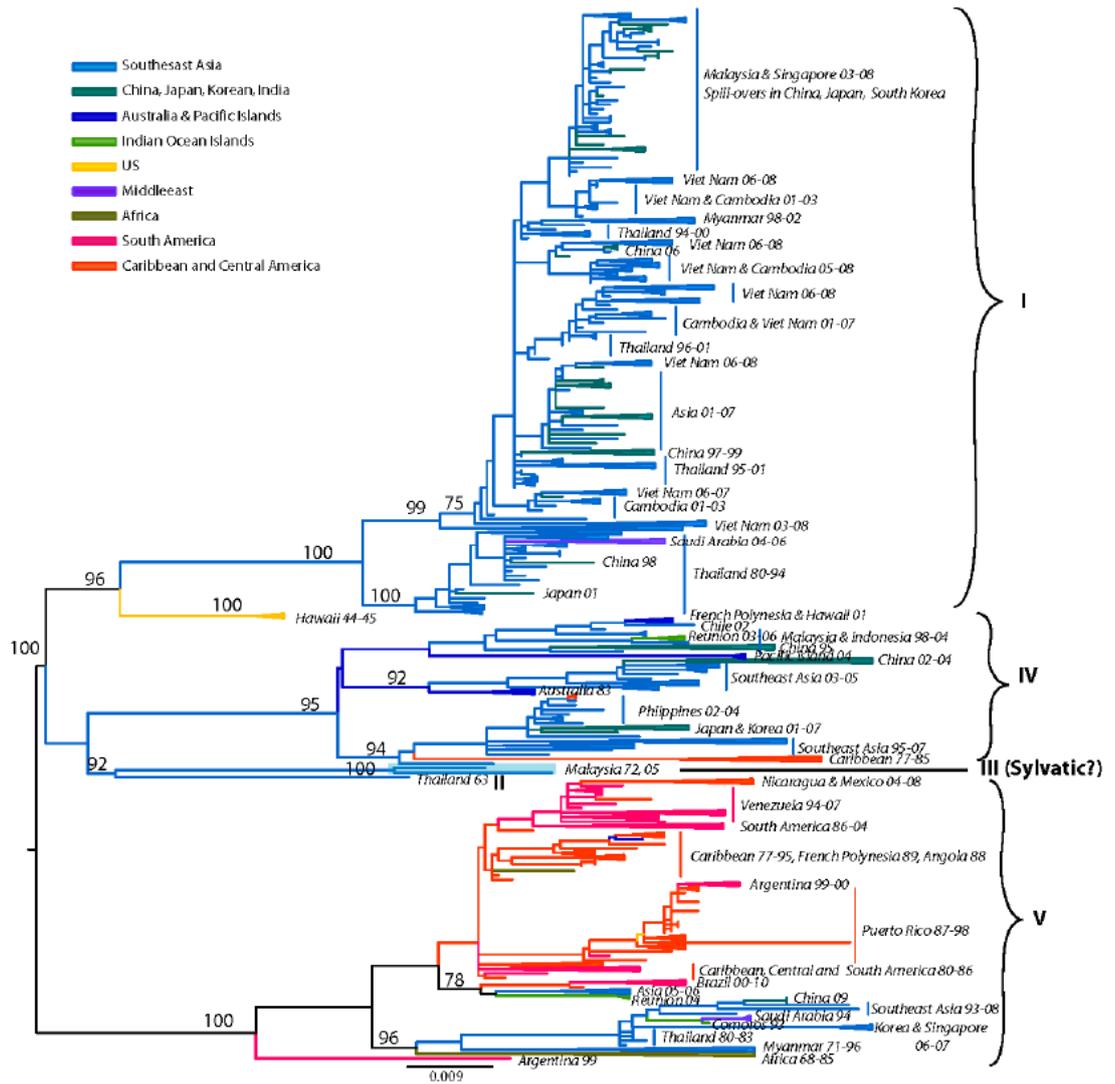


Figura 5: Filogenia de DENV-1 –Construída baseando-se nas sequências de nucleotídeos completas do gene E de 1812 linhagens disponíveis no GenBank. DENV-1 é composto por cinco genótipos, sendo que as linhas coloridas representam as regiões geográficas como especificado na figura. Fonte: CHEN e VASILAKIS, 2011.

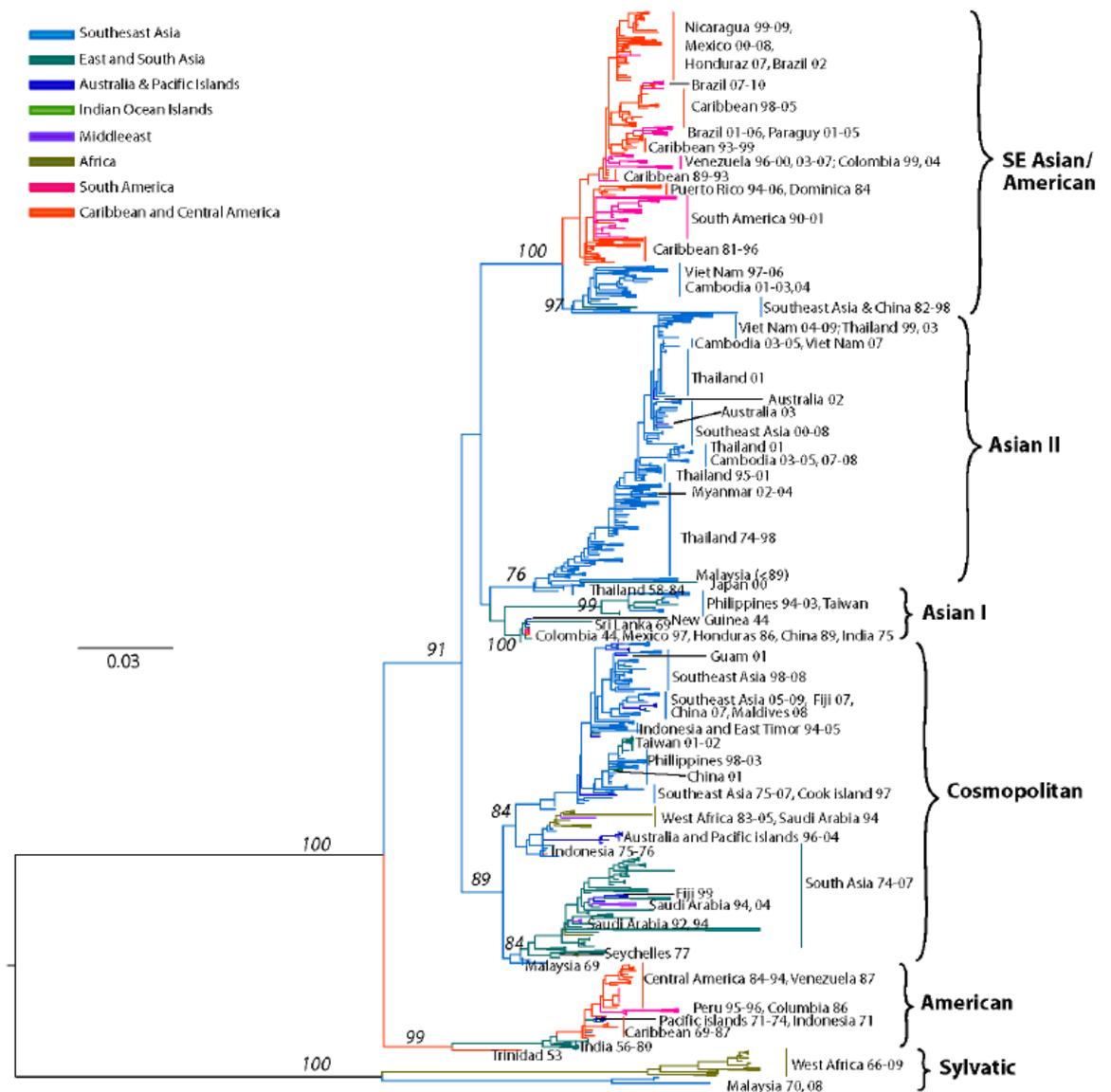


Figura 6: Filogenia de DENV-2 – Construída baseando-se nas seqüências de nucleotídeos completas do gene E de 1827 linhagens disponíveis no GenBank. DENV-2 é composto por seis genótipos, sendo que as linhas coloridas representam as regiões geográficas como especificado na figura. Fonte: CHEN e VASILAKIS, 2011.

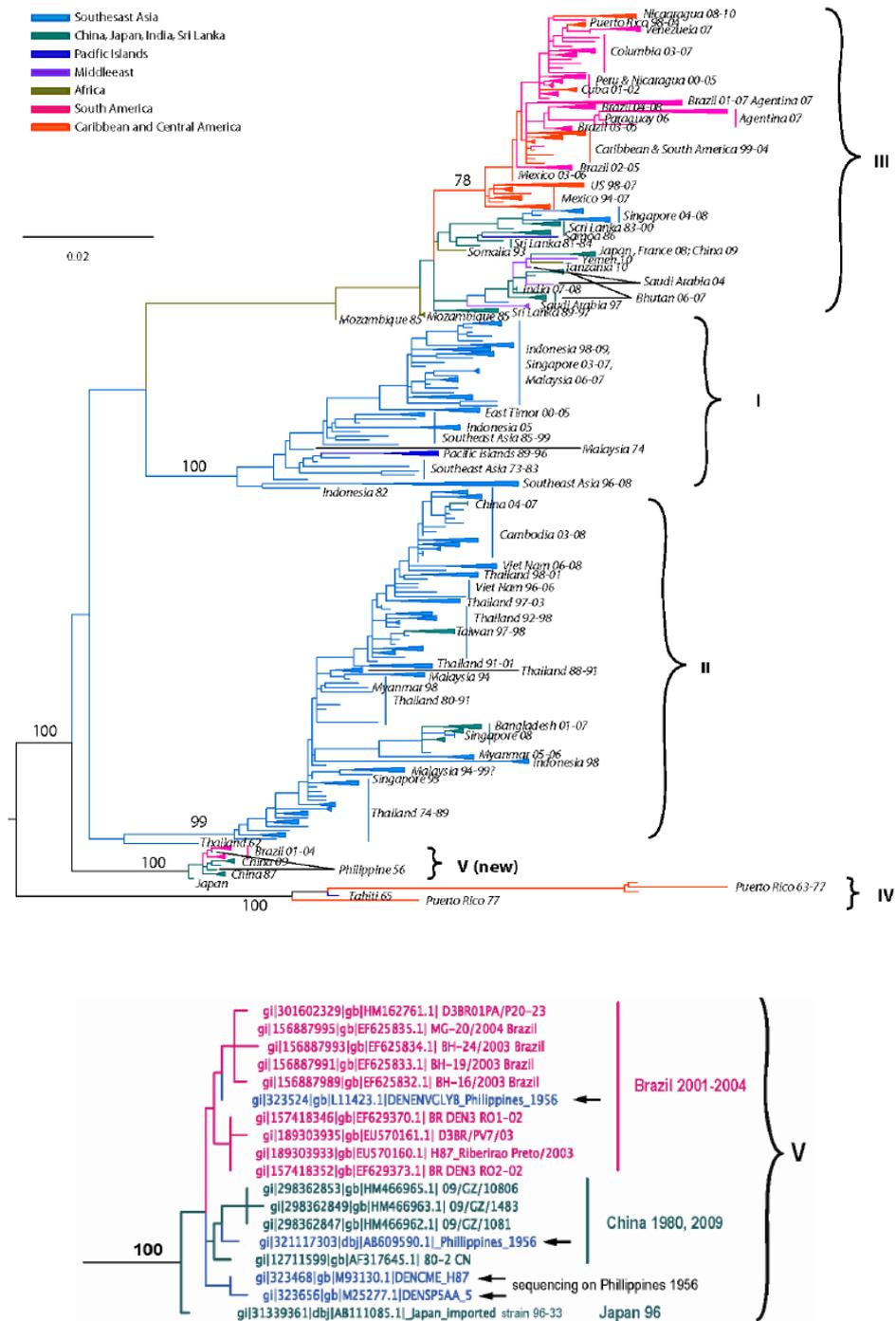


Figura 7: Filogenia de DENV-3 – Construída baseando-se nas sequências de nucleotídeos completas do gene E de 1208 linhagens disponíveis no GenBank. DENV-3 é composto por cinco genótipos, sendo que as linhas coloridas representam a região geográfica como especificado na figura. Fonte: CHEN e VASILAKIS, 2011.

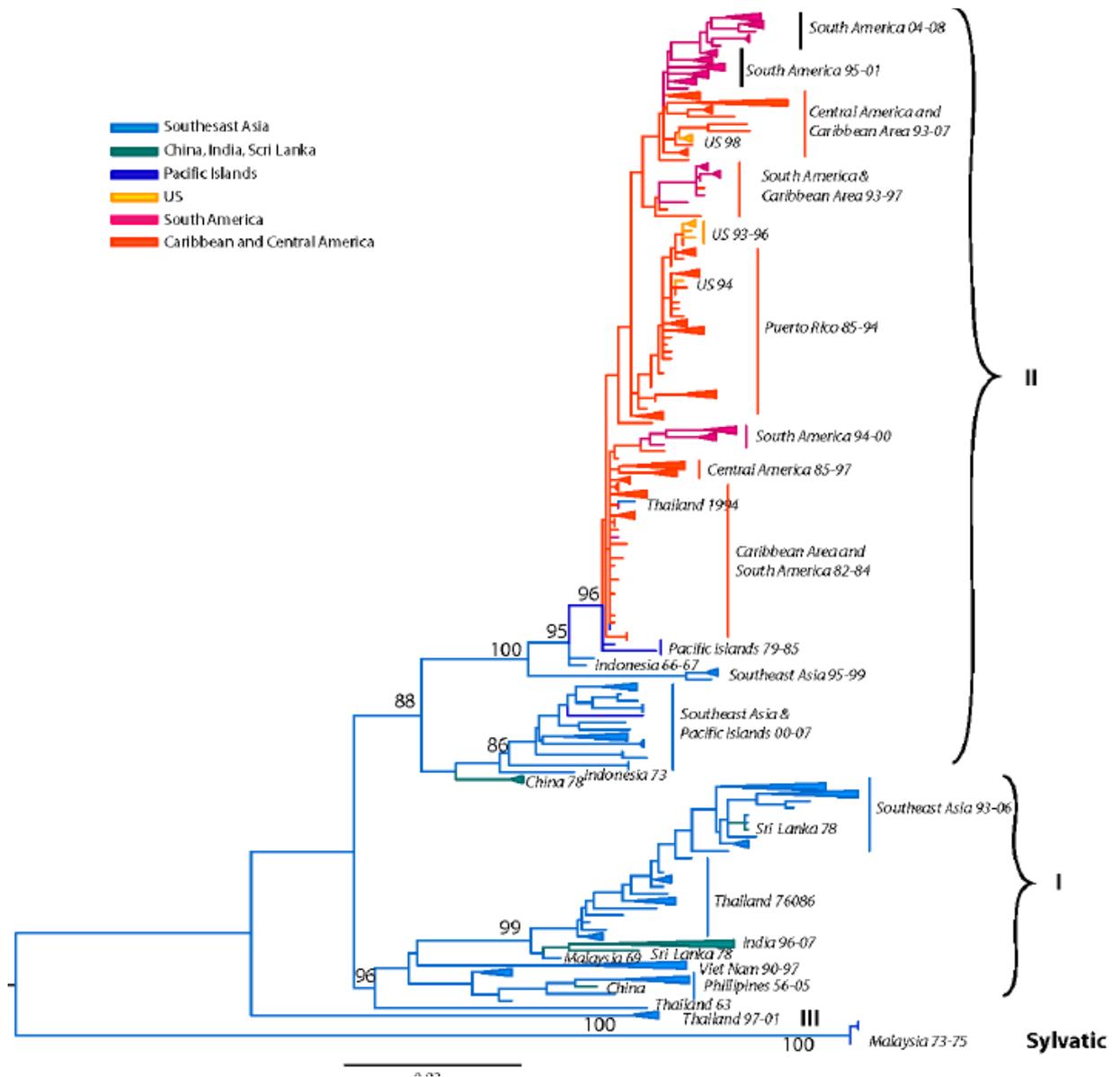


Figura 8: Filogenia de DENV-4 – Construída baseando-se nas sequências de nucleotídeos completas do gene E de 418 linhagens disponíveis no GenBank. DENV-4 é composto por quatro genótipos, sendo que as linhas coloridas representam a região geográfica como especificado na figura. Fonte: CHEN e VASILAKIS, 2011.

1.2.2 Aspectos Clínicos

A dengue é uma doença com grande variedade de manifestações clínicas, incluindo dor de cabeça, febre, vômito, hemorragias e comprometimento de órgãos, em particular o fígado e os rins e pode levar a morte mesmo quando em tratamento. O vírus é transmitido pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*, e uma vez na corrente sanguínea o vírus infecta uma variedade de células incluindo macrófagos, células dendríticas, células epiteliais e outras. A doença é classificada de acordo com a gravidade dos sintomas em dengue com ou sem sinais de alerta e dengue grave (Figura 9) (WHO, 2009).

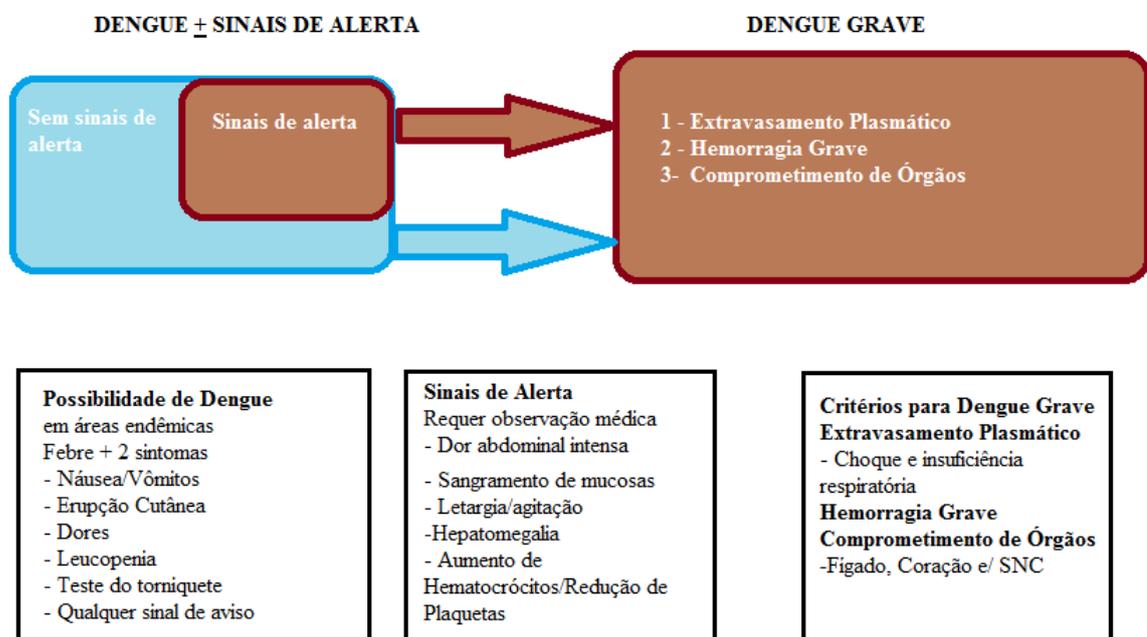


Figura 9: Critérios de classificação de Dengue – com base nos sintomas a dengue pode ser classificada em Dengue com ou sem sinais de alerta e Dengue Grave. A presença de sinais de alerta ou sintomas de Dengue Grave, requerem hospitalização devido ao risco de vida (Adaptado de WHO, 2009).

Como mostrado na figura 9, diagnosticar dengue com sintomas clínicos básicos é difícil devido aos sintomas não específicos; a presença de sinais de alerta, ou a localização em áreas endêmicas podem facilitar o diagnóstico. A dengue grave pode manifestar-se com ou sem sinais de alerta e a hospitalização é essencial devido à gravidade dos sintomas e o alto risco de morte (WHO, 2009).

Apesar da extensa variedade de manifestações clínicas, três fases podem ser normalmente observadas após o período de incubação: fase febril, crítica e de recuperação (Figura 10).

A fase febril inicia-se de forma repentina, é caracterizada por febre alta que dura de dois a sete dias. Além da febre, podem surgir outros sintomas como eritema da pele, dores no corpo, mialgia, artralgia e dor de cabeça. Além desses, outros sintomas podem surgir como náuseas, vômitos, anorexia e dor de garganta. Nessa fase é difícil distinguir dengue de outras doenças febris, também não é possível saber se a dengue é grave ou não. Nessa fase há o pico da viremia, redução da quantidade de glóbulos brancos e aumento na produção de IgG e IgM (WHO, 2009; YACOUB et al., 2014).

No fim da fase febril, a febre começa a reduzir, e a temperatura cai para 38° C ou menos. Pode ocorrer um aumento na permeabilidade capilar seguido de leucopenia e redução no número de plaquetas iniciando-se a fase crítica. Caso o aumento da permeabilidade capilar tenha ocorrido, há risco de extravasamento do plasma, levando a piora do quadro clínico do paciente. O extravasamento de plasma pode durar de 24 à 48h e pode levar ao derrame pleural, ascite ou outros sintomas mais graves, em particular se não houver reidratação intravenosa. Dependendo da quantidade de plasma perdido o choque pode ocorrer levando a redução de temperatura e o comprometimento de órgãos, em particular o fígado, SNC e coração. Nessa fase a quantidade de glóbulos brancos aumenta e a viremia começa a reduzir. Pacientes que não apresentam melhora após a redução da febre são considerados ter dengue grave começando a apresentar sinais de alerta e quanto mais cedo forem tratados, em particular com reidratação intravenosa, menor risco sofrerão (WHO, 2009; YACOUB et al., 2014).

A Dengue é considerada grave quando um ou mais dos seguintes sintomas ocorrem durante a fase crítica: a) extravasamento de plasma com risco de choque e/ou acumulação de fluidos com ou sem complicações respiratórias ou b) hemorragia grave e/ou comprometimento de órgãos (WHO, 2009).

Após a fase crítica, começa a fase de recuperação, os fluidos no compartimento extravascular são reabsorvidos, o apetite retorna, os sintomas gastrointestinais reduzem e leucócitos e plaquetas voltam aos níveis normais, e após um período 48 a 72 h a saúde do paciente volta ao normal (WHO, 2009).

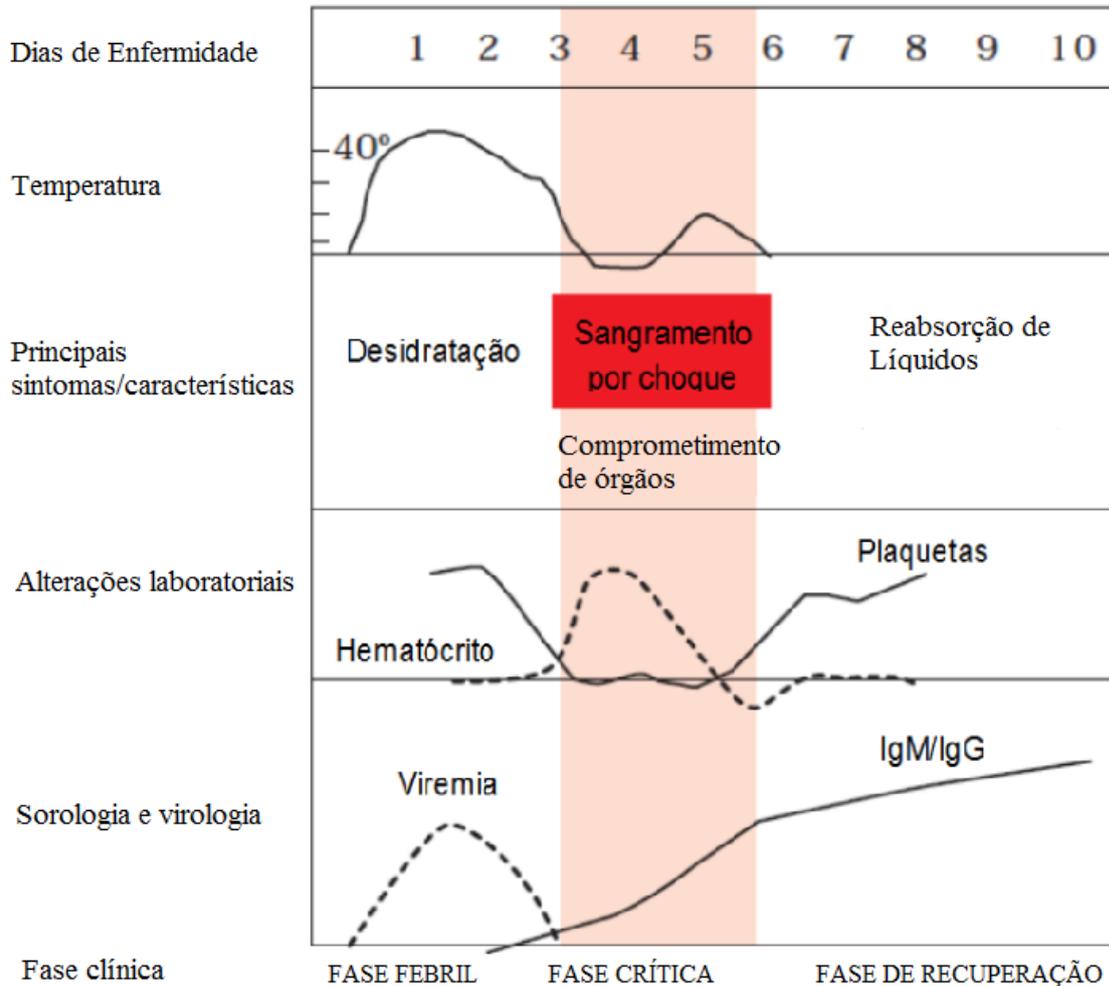


Figura 10: Fases clínicas de Dengue- Principais características das fases: febril, crítica e recuperação separadas por categorias durante os dez dias de doença. Adaptado de WHO, (2009).

1.2.3 Ciclo de infecção

O DENV é transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*, em particular as espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Os mosquitos são infectados pelo vírus quando se alimentam do sangue de seres humanos infectados durante o período de alta viremia. O vírus passa então do trato digestório para as glândulas salivares após um período de incubação de aproximadamente dez dias, após este período, a picada do mosquito transmitirá o vírus e consequentemente a doença (GUZMAN et al., 2010). Os mosquitos do gênero *Aedes* habitam regiões tropicais e subtropicais e se reproduzem em locais com água, onde os ovos são

depositados e as larvas e crescem. Redução de locais onde a água possa acumular-se é uma medida essencial para a diminuição das populações de mosquitos e subsequentemente da doença. O vírus da Dengue pode ser mantido em 2 ciclos distintos, em animais silvestre e em seres humanos. O ciclo silvestre ocorre em primatas não humanos e mosquitos *Aedes*, o ciclo já foi observado no oeste africano e Malásia (CHEN e VASILAKIS, 2011; VASILAKIS et al., 2011). O ciclo humano ocorre em ambientes tropicais e subtropicais, e os seres humanos são o único hospedeiro reservatório. Vírus do ciclo silvestre podem entrar no ciclo humano passando por zonas de emergência, em geral em áreas rurais próximas a florestas e chegando em cidades, tendo como carreador um humano contaminado. O vírus também pode persistir em mosquitos apenas através de transmissões trans-ovarianas (TOT – *Transovarial Transmission*) (Figura 11).

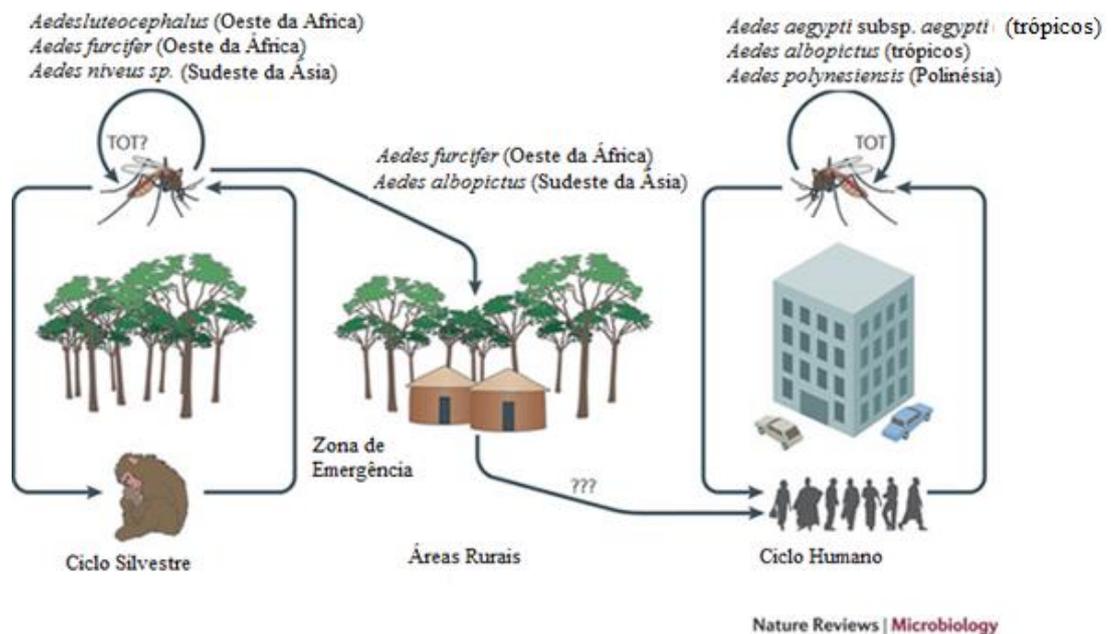


Figura 11: Ciclos de transmissão do vírus da Dengue – A origem do ciclo silvestre nas áreas do oeste africano e no sudeste asiático. A transmissão do vírus do ciclo silvestre para o ser humano ocorre nas zonas de emergência de onde para transmitido para a zona urbana. O vírus também é capaz de persistir em populações de mosquito através de transmissão trans-ovariana (TOT) em algumas espécies de mosquitos. Adaptado de VASILAKIS et al., (2011).

1.3 Zika

O Zika vírus foi observado pela primeira vez na Uganda, em uma floresta que deu o nome ao vírus, em 1947 durante uma pesquisa financiada pela fundação Rockefeller com o objetivo de se melhor entender o ciclo silvático do vírus da febre amarela e de se identificar novos arbovírus. O vírus foi isolado em camundongos, após a inoculação, via intracraniana, de sangue de um dos macacos *Rhesus* sentinelas, que apresentou febre e viremia. O vírus também foi isolado do mosquito local *Aedes africanus*, em janeiro de 1948 (DICK et. al, 1952). Nos anos seguintes, pouca atenção foi dada à doença, com esparsos trabalhos experimentais sendo relatados, e alguns poucos casos de pacientes infectados (MARCHETTE; GARCIA; RUDNICK, 1969; OLSON et al., 1981; WEAVER et al., 2016). EM 2007, a doença voltou a ganhar atenção quando um surto nas ilhas Yap, Micronésia afetou mais de 75% da população (DUFFY et al., 2009). Em outubro de 2013, um novo surto afetou a Polinésia francesa, com taxas de infecção chegando a 11% da população (MALLET; VIAL; MUSSO, 2016). Finalmente, no final de 2014, no Brasil foi reportado um surto de uma doença misteriosa, posteriormente, identificada como ZIKA. Em 2015 o Brasil reportou oficialmente os primeiros casos de Zika no país, no estado do Rio Grande do Norte e Bahia (CAMPOS et al., 2015; ZANLUCA et al., 2015). Em 2016, o ZIKV havia se dispersado por quase todo o território brasileiro, com exceção de parte do Amazonas, além dos estados no Sul do país onde o clima não é favorável para o vetor (Figura 13). Em 2017 o número de casos de Zika no país reduziu-se consideravelmente de 205578 casos em 2016, para 13353 em 2017 (Secretaria de Vigilância em Saúde, MS, Semana Epidemiológica 25). Com o exemplo da circulação dos sorotipos de DENV, no entanto, é possível prever que novos casos continuaram ocorrendo, e o vírus continuará no ciclo de transmissão humano por um futuro próximo (LOWE et al., 2018).

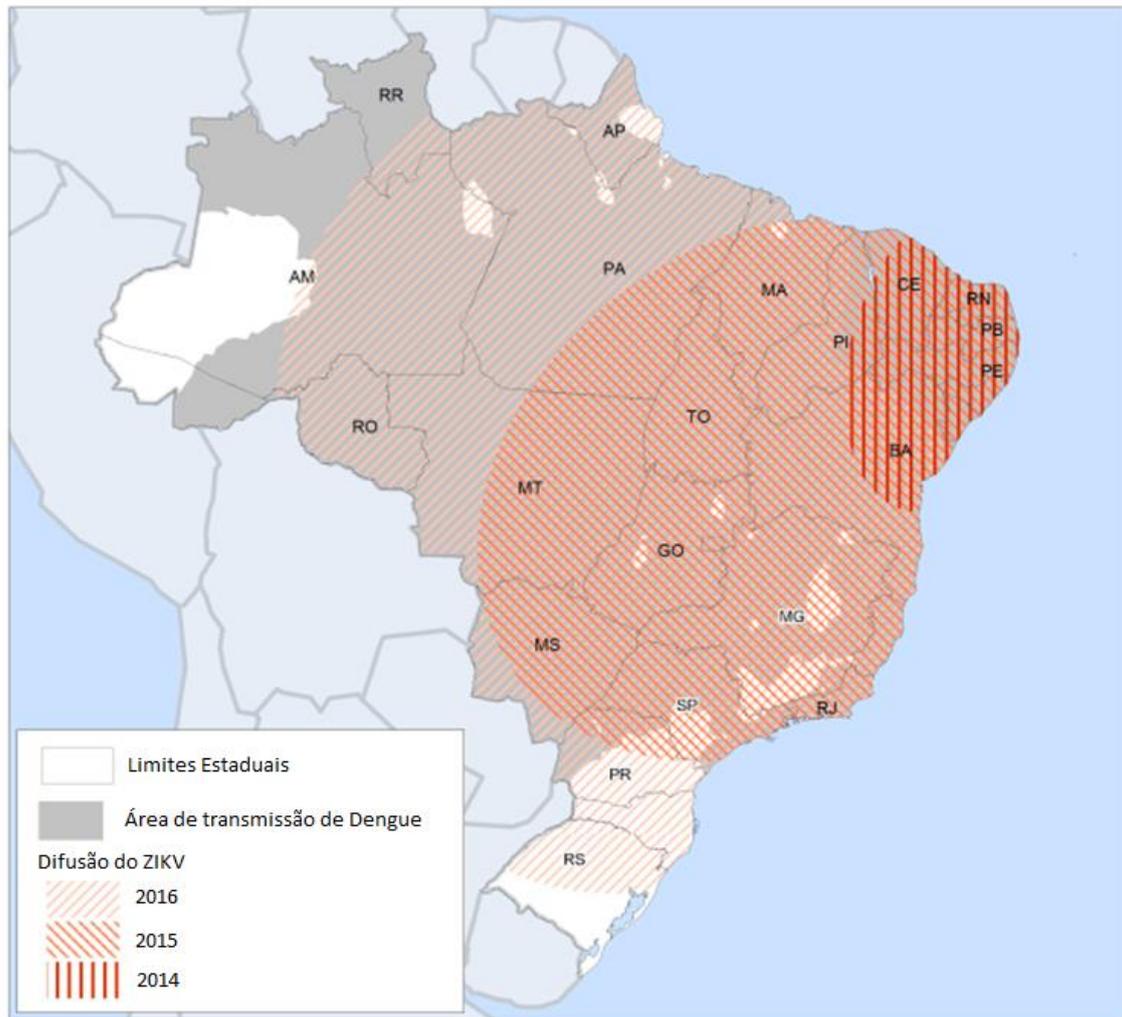


Figura13: Difusão espacial do ZIKV de 2014-2016 – dados de acordo com o Ministério da Saúde e secretarias estaduais de saúde. Adaptado de (LOWE et al., 2018).

1.3.1 Filogenia

ZIKV pode ser dividido em duas linhagens filogenéticas distintas, a linhagem africana e a linhagem asiática, responsável pelas epidemias recentes. A linhagem africana pode ser subdividida em dois grupos distintos: o grupo Uganda, incluindo o protótipo MR766 com isolados do Senegal e da República Centro-Africana de 1947 até 2001, e o grupo Nigéria, com amostras isoladas na Nigéria e Senegal de 1968 a 1997. O grupo asiático, por sua vez, é ancorado pelo protótipo P6-740 isolado na Malásia em 1966 e inclui amostra do Camboja, Micronésia e Polinésia Francesa, mostrando a dispersão do vírus pelo sudeste asiático. Ainda dentro do grupo, uma nova linhagem, a Americana, foi incluída com amostras do Brasil, Porto Rico, Haiti, Guatemala e Suriname (Figura 14) (FAYE et al., 2014; WEAVER et al., 2016).

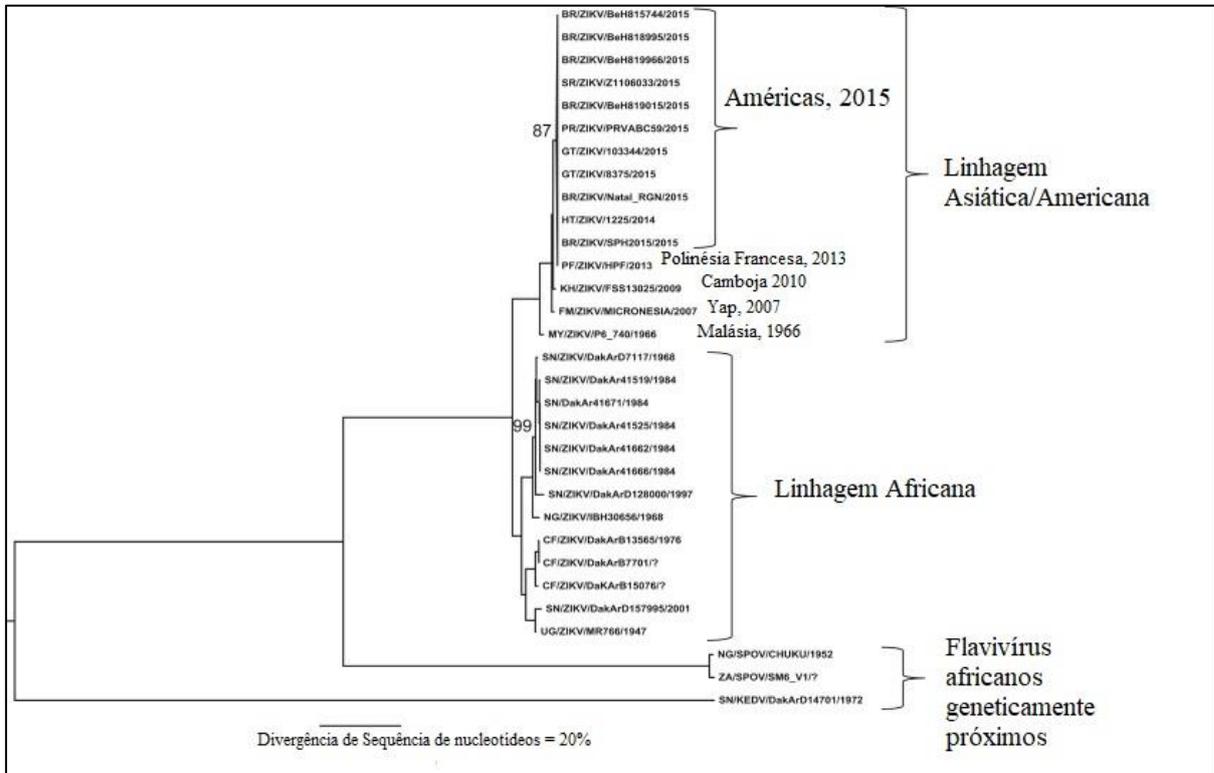


Figura 14: Árvore filogenética do ZIKV – construída a partir de seqüências de janelas de leitura abertas inferidas usando o método de máxima verossimilhança no MEGA 6.0. Nome das linhagens abreviadas de acordo com o país/vírus/linhagem/ano de coleta. Os números indicam valores de bootstrap < 100%. A escala mostra divergência de sequências de nucleotídeos de 20%. Adaptado de WEAVER et al., 2016.

1.3.2 Aspectos Clínicos

A febre do Zika vírus é na maior parte dos casos, assintomática. Quando sintomas estão presentes eles assemelham-se aos de outras viroses febris, em particular a Dengue, causando febre, erupções cutâneas, dor nas articulações e dores musculares, mal-estar, dor de cabeça, dor retro orbital e conjuntivite não purulenta. Estes sintomas normalmente são leves e duram de 2 a 7 dias. (WHO, 2017; MUSSO; LANTERI, 2017; PETERSEN et al., 2016).

Após a re-emergência do vírus, em particular a Polinésia Francesa e no Brasil, uma série de complicações começaram a ser reportadas, e a doença associada com graves

complicações neurológicas e malformações no sistema nervoso central de recém-nascidos associada à transmissão vertical durante a gravidez pela placenta no período pré-natal. Complicações em recém-nascidos abrangem uma variedade de sintomas, em particular a microcefalia, no entanto outras anomalias e complicações foram observadas incluindo: calcificações difusas, atrofia cerebral, sinais de formação anormal dos giros cerebrais, anomalias no desenvolvimento cortical e anomalias oculares; cegueira, perda de audição, paresia, epilepsia e atraso no desenvolvimento do sistema nervoso (BAUD et al., 2017; MITTAL et al., 2017; RASMUSSEN et al., 2016; WHO, 2017).

Em adultos, a complicação severa da infecção pelo ZIKV está associada com casos de Síndrome de Guillain-Barré (WHO, 2017), uma associação que se tornou evidente no surto na Polinésia Francesa, no qual a incidência da síndrome foi 20 vezes maior no período da epidemia comparada com a incidência normal (MUSSO e GUBLER, 2016). Porém, não se sabe o modo como o ZIKV leva à síndrome (BAUD et al, 2017).

1.3.3 Ciclo de infecção

Na África, o ZIKV é mantido em ciclo silvestre envolvendo primatas não humanos e espécies de mosquito *Aedes*; na Ásia, no entanto, há evidências indiretas e não confirmadas de que o ZIKV circula em florestas no sudeste asiático, sendo mantido em um ciclo de transmissão silvestre (VASILAKIS e WEAVER, 2017). Nestes continentes, diversas espécies de mosquito do gênero *Aedes* estão ligadas à transmissão do ZIKV no ciclo silvestre, como *A. africanus*, *A. luteocephalus*, *A. furcifer* e *A. taylori* (PETERSEN et al, 2016).

No ciclo urbano e periurbano, assim como o DENV, o vírus é mantido em um ciclo humano - mosquito vetor - humano. Há grande consenso que o *A. aegypti* é o principal mosquito vetor do ZIKV neste contexto, juntamente com *A. albopictus* em menor grau, estando ambos ligados com quase todos os surtos por ZIKV registrados (PETERSEN et al, 2016; WHO, 2017; GUEDES et al, 2017). Além destes, recentemente, um estudo demonstrou a capacidade do mosquito *Culexquinque fasciatus*, que possui distribuição tropical e subtropical e coexiste com *A. aegypti* em áreas urbanas, também é capaz de transmitir o ZIKV. O vírus foi isolado desses mosquitos, tendo sido detectado na glândula salivar e saliva de espécimes infectados artificialmente ou coletados em áreas urbanas com alta incidência de microcefalia em Recife, no Brasil, indicando a capacidade deste mosquito ser também um dos vetores do ZIKV no país (GUEDES et al, 2017).

O ZIKV também pode ser transmitido de modo não vetorial, possibilidade que surgiu no segundo surto de infecções pelo ZIKV. A transmissão sexual foi suspeitada neste contexto e tem sido documentada desde então, quando pessoas residentes de áreas não endêmicas são infectadas após relação sexual com parceiros retornando de áreas de circulação endêmica do ZIKV, sintomáticos ou não (BAUD et al, 2017). No contexto do segundo surto, na Polinésia francesa também suspeitou-se da capacidade de transmissão por transfusão sanguíneas, após RNA do ZIKV ter sido detectado no sangue de 2,8% dos 1.505 doadores testados nesta região, entre novembro de 2013 e fevereiro de 2014 (MUSSO e GUBLER, 2016). Posteriormente, este modo de transmissão foi confirmado no Brasil, em 2016 (BAUD et al, 2017). Transmissão materno fetal também pode ocorrer em infecções pelo ZIKV. O RNA viral foi detectado no líquido amniótico de mulheres grávidas com sintomas compatíveis com infecção pelo vírus, bem como no cérebro de fetos após aborto espontâneo, ou em recém-nascidos com microcefalia (BAUD et al, 2017; MUSSO e GUBLER, 2016).

1.4 Coinfecção e Interferência Viral

A infecção de um hospedeiro por múltiplas linhagens de um mesmo vírus faz com que ocorra uma competição por recursos metabólicos do hospedeiro e essa competição acaba por moldar várias características de um patógeno como, por exemplo, virulência, transmissibilidade e epidemiologia. Quando duas linhagens infectam simultaneamente um hospedeiro denomina-se uma coinfecção. Quando existe um intervalo de tempo entre as infecções das linhagens denomina-se uma superinfecção. Com relação aos vírus, a ordem e o intervalo das infecções determinam de que forma essa competição ocorrerá. Por exemplo, quando duas linhagens de *Cydia pomonella granuloma virus* infectam uma mariposa ao mesmo tempo (coinfecção) ocorre uma redução na taxa de replicação das duas linhagens. Com vaccínia vírus, no entanto, a coinfecção de células de macaco por diferentes linhagens não afeta as taxas de replicação dos vírus. Ainda considerando vaccínia, quando uma linhagem infecta uma célula quatro horas após a infecção de uma primeira linhagem (superinfecção) a replicação da segunda linhagem é reduzida, e se esse intervalo de tempo aumenta para dez horas ou mais, a segunda linhagem é incapaz de se multiplicar (CHRISTEN et al., 1990; PEPIN et al., 2008). O vírus da doença de Borna em ratos, e o vírus da febre catarral em bovinos, também apresentam padrões semelhantes de superinfecção (EL HUSSEIN et al., 1989; GEIB et al., 2003).

Coinfecções de sorotipos distintos de DENV vem sendo comumente reportados, em particular em áreas endêmicas e vem sendo consideradas como uma das possíveis explicações para o surgimento de sintomas mais graves. O primeiro caso reportado de coinfecção foi em Porto Rico em 1982 com os sorotipos DENV-1 e DENV-4 (WATERMAN et al., 1985) e, desde então, diversos outros casos foram descritos, em particular na China, Índia, Indonésia, México e Brasil (ANDRADE et al., 2016; LORONO-PINO et al., 1999).

O impacto da coinfecção de DENV em casos clínicos ainda é desconhecido, e a taxa de pacientes infectados com mais de um sorotipo pode variar entre 5-50% dependendo da região (ANDRADE et al., 2016; BHATT et al., 2013; DHANOA et al., 2016; LORONO-PINO et al., 1999). Além disso, é comum nessas áreas a circulação de outros arbovírus, em particular ZIKV, CHIKV e YFV, tendo já sido reportados casos de coinfecção com até três vírus distintos (PABBARAJU et al., 2016; VILLAMIL-GÓMEZ et al., 2015; WAGGONER et al., 2016). Diversos estudos, vem reportando casos de coinfecção e cocirculação em território brasileiro. Por exemplo, em 2015, em uma pequena cidade no interior de Pernambuco, um surto de uma doença com sintomas semelhantes à dengue foi reportado, e por meio de RT-PCR e ELISA foram confirmados casos de DENV, ZIKV e CHIKV na região, confirmando a cocirculação desses vírus (PESSOA et al., 2016). No mesmo ano, em Salvador na Bahia, casos de DENV, ZIKV e CHIKV, foram confirmados durante um surto que atingiu mais de 2500 pessoas (CARDOSO et al., 2015). Com a dispersão do vírus da ZIKV e do CHIKV pelo território brasileiro, os casos de sobreposição desses vírus aumentaram rapidamente, deixando boa parte do território brasileiro, vulnerável devido à cocirculação e conseqüentemente a coinfecção desses vírus. Além disso, a cocirculação entre os quatro sorotipos de DENV, ZIKV e CHIKV, dificulta o diagnóstico preciso do paciente, e pouco sabe-se sobre o impacto da reinfecção, e coinfecção devido a esses vírus (DONALISIO et al., 2017; LOWE et al., 2018)

Embora a cocirculação, e conseqüentemente, a coinfecção, sejam um fenômeno comum, em especial em países tropicais, há pouquíssimos estudos relacionados à coinfecção, sendo a maioria deles estudos verificando o impacto da coinfecção em mosquitos *Aedes*, com as análises focando principalmente nas vantagens competitivas e estudos populacionais (GÖERTZ et al., 2017; PEPIN et al., 2008; QUINTERO-GIL et al., 2014; VAZEILLE et al., 2016). Estudos com células de mamíferos são ainda mais escassos, sendo o único encontrado na literatura até o momento, analisa a coinfecção de ZIKV e CHIKV (GÖERTZ et al., 2017).

O processo no qual infecção de um vírus inibe a infecção/multiplicação de outro vírus é denominado interferência viral. Existem diversos tipos de interferência viral como mostrado na Tabela 1, divididos em duas categorias: se ambos os vírus são inibidos ou se o vírus primário inibe o secundário, sendo que caso esses os vírus pertencem a diferentes famílias e/ou sorotipos(SALAS-BENITO e DE NOVA-OCAMPO, 2015).

Tabela 1: Tipos de Interferência Viral

Tipo de Interferência	Definição
Exclusão por Superinfecção	Infecção de um vírus primário inibe a infecção/multiplicação de um vírus secundário
Interferência Intrínseca	Infecção com dois vírus na qual ambos são inibidos
Interferência Homóloga	Vírus pertencem à mesma família
Interferência Heterotípica	Vírus pertencem à mesma família, mas de sorotipos distintos
Interferência Heteróloga	Vírus pertencem a famílias distintas
Acomodação Viral	Vírus distintos capazes de coexistir na mesma célula

Fonte: (SALAS-BENITO e DE NOVA-OCAMPO, 2015)

1.5 Proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e respectivas vias de sinalização

As MAPK são um grupo de proteínas sinalizadoras evolutivamente conservadas em eucariotos, envolvidas na resposta a uma grande diversidade de estímulos tais como fatores de crescimento [p.ex. fator de crescimento de epiderme (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)], citocinas, hormônios (p.ex. insulina), estresse e infecções microbianas. As MAPKs regulam uma grande variedade de eventos celulares, incluindo: Proliferação celular, Apoptose, Transcrição de genes, Diferenciação celular e Plasticidade neuronal (BONJARDIM, 2017; KRISHNA e NARANG, 2008; YANG et al., 2013)

Existem quatro grandes grupos de MAPKs em mamíferos: ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), ERK 5 ou BMK1 (*Big MAP kinase-1*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) e

p38. As cascatas ERK em geral respondem a fatores de crescimento, e JNK e p38 a estresse (KRISHNA e NARANG, 2008; YANG et al., 2013).

Apesar das diferenças existentes entre MAPKs, o mecanismo de sinalização é semelhante, organizado em três níveis que atuam em sequência formando uma cascata sinalizadora. O primeiro nível é composto de uma MAP3K, uma serina-treonina cinase que é ativada pela fosforilação e interação com GTPases. As MAP3K por sua vez fosforilam uma MAP2K, ativando-a. A MAP2K então fosforila e ativa uma MAPK que fosforila substratos alvo tais como fatores de transcrição (fos, jun, egr, etc.) outras cinases (MNK, RSK, FAK, AMPK, etc.) proteínas semelhantes a componentes do citoesqueleto (proteína associada a microtúbulos - MAP1/2, etc.) (Figura 12)(KRISHNA e NARANG, 2008; YANG et al., 2013, Bonjardim, 2017).

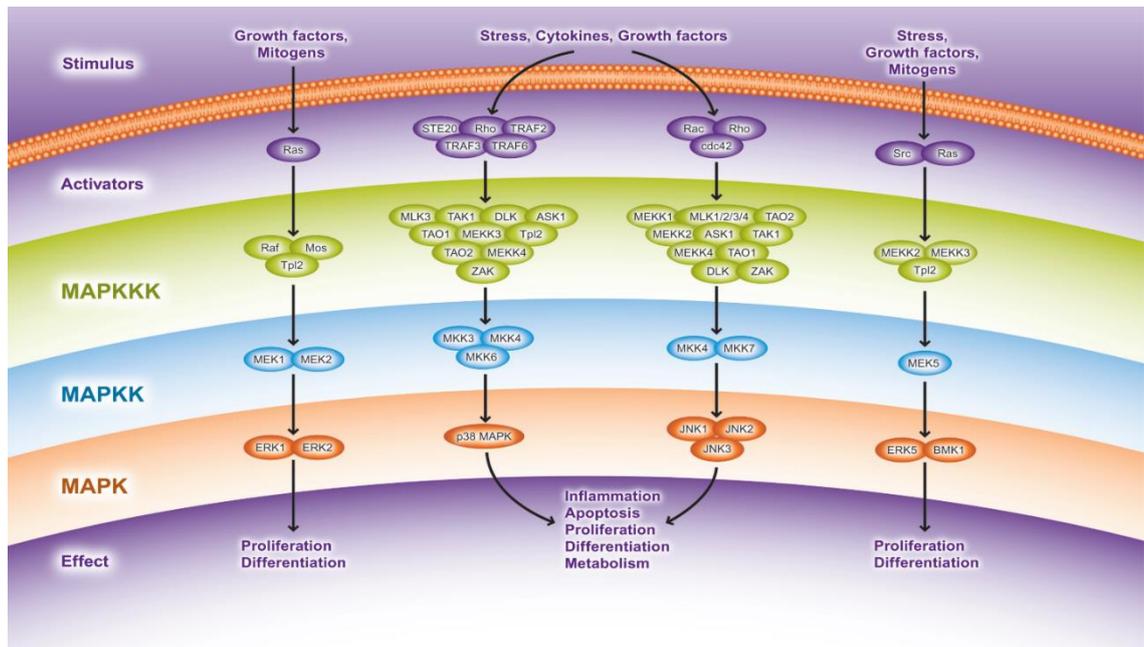


Figura 12: Cascatas de sinalização envolvendo MAPK – As MAPKs são organizadas em três diferentes níveis que formam uma cascata de sinalização. MAP3K fosforila e ativa MAP2K, que por sua vez fosforila e ativa MAPK, resultando em uma resposta biológica distinta. **Fonte:** (<http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=15121>)

1.5.1 Cascata de sinalização MEK/ERK

ERK foi a primeira MAPK descoberta, suas vias de sinalização são as mais bem estudadas. A ativação da cascata ERK é dependente de uma grande quantidade de sinais, em

particular fatores de crescimento. As duas MAPKs ERK1 e sua isoforma ERK2 possuem, respectivamente, massa molecular de 43 e 41 kDa com 83% de similaridade. ERK1 e ERK2 regulam uma variedade de substratos envolvidos em processos celulares como crescimento, sobrevivência, motilidade e diferenciação celular (CARGNELLO e ROUX, 2011). Também já foi mostrado que ERK1/2 promove a ativação de IKK- α (*Inhibitor of Kappa B Kinase-alpha*) controlando a translocação de NF-kB para o núcleo onde promove a transcrição de genes relacionados a resposta imune e inflamatória e apoptose.

Na cascata de fosforilação, acima de ERK1/2 encontram-se as MAP2Ks MEK1 e MEK2 e acima delas as MAP3K. As isoforma Raf (A-Raf, B-Raf e C-Raf) são as mais bem estudadas MAP3K, e são as mais frequentemente ativadas para regulação da via ERK. Além delas, Mos, Tpl2 e outras MAP2K também podem ativar a cascata, mas são dependentes de estímulos mais específicos (ALBARNAZ et al., 2014; CARGNELLO e ROUX, 2011; KOLCH, 2000; KRISHNA e NARANG, 2008).

1.5.2 MAPKs e infecção viral

ERK, JNK e p38 são ativadas durante várias doenças, inclusive infecções virais, tendo importante papel em todo o ciclo de replicação viral e no processo inflamatório (CARGNELLO; ROUX, 2011). Diversos trabalhos com vírus da família *Poxviridae*, em especial VACV, associaram a importância das MAPKs para o ciclo de multiplicação viral. Já durante a adsorção/penetração do VACV na célula, o vírus estimula MEK/ERK através da expressão do gene c-Fos (de Magalhães et al., 2001), na penetração, o vírus leva a expressão de EGR-1 pela manipulação da via de sinalização MEK/ERK/RSK2/Elk-1/EGR-1 dependente de VGF, e a alteração do mesmo, por meios farmacológicos ou genéticos causa redução significativa na produção viral (ANDRADE et al., 2004). A manipulação de MEK/ERK pelo vírus nos estágios iniciais da infecção também é essencial para a expressão dos genes virais O1L, F1L e C11R necessários para a atividade constante da via, manutenção sobrevivência celular e resposta contra o sistema imune (BONJARDIM, 2017).

Com relação às famílias dos vírus de RNA, diversas MAPKs estão associadas a biologia desses vírus. Na família *Orthomyxoviridae*, os Influenza virus são capazes de ativar quatro diferentes vias de MAPKs (ERK, JNK, p38 e ERK5) com destaque para via de Raf/MEK/ERK essencial para a replicação eficiente do mesmo. Na família *Filoviridae*, o vírus do Ebola tem sua citotoxicidade mediada pela glicoproteína de envelope decorrente da fosforilação de ERK-1 e ERK-2. Outras famílias com trabalhos as associando MAPKs

incluem *Coronaviridae*, *Picornaviridae* e *Retroviridae* (BONJARDIM, 2017; PLESCHKA, 2008; WONG et al., 2016; ZAMPIERI et al., 2007).

Dentro da família *Flaviviridae*, vários estudos associam a importância do papel das MAPKs no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular, além da participação das mesmas no ciclo de multiplicação do vírus (PLESCHKA, 2008; SATO et al., 2006). Trabalhos feitos pelo GTS (Grupo de Transdução de Sinal) também mostram a importância da via de MEK/ERK para o vírus da febre amarela e a inibição farmacológica da via reduz a replicação do mesmo em até ~99%, além disso, tratamento de camundongos BALB/C infectados reduziu o título viral no cérebro (ALBARNAZ et al., 2014).

Com relação ao Dengue vírus, durante a infecção receptores tipo 1 receptores de fatores de tecido (*Tissue fator receptors*) são estimulados via fosforilação de ERK1/2 e p38 nas células endoteliais vasculares. A inibição dessas vias faz com que haja uma redução na síntese de proteínas virais e no título viral (CEBALLOS-OLVERA et al., 2010; SREEKANTH et al., 2016). Estudos recentes, associam as MAPK com infecções por Dengue, e inibidores dessas vias vem sido testados como ferramentas para combater a doença. Em 2010, mostrou-se que o uso de inibidores MEK/ERK afetava a expressão de PAI-1 (Inibidor do ativador de plasminogênio) encontrado em altas concentrações em pacientes infectados (SHYU et al., 2010). Também mostrou-se que o uso de inibidores de p38 reduzem os danos causados ao fígado pela infecção de Dengue (SREEKANTH et al., 2016). Outros trabalhos têm demonstrado os efeitos de inibidores sobre a infecção de Dengue, mas ainda não existem trabalhos envolvendo células infectadas com mais de um sorotipo, e considerando que cada vez mais surgem casos com esse perfil, existe a necessidade de verificar se um caso de coinfeção afetaria o desempenho de inibidores, em particulares aqueles sendo testados como possíveis ferramentas de tratamento.

2 –JUSTIFICATIVA

Cocirculação de arbovírus, tais como: Dengue vírus, Zika vírus, vírus da Febre Amarela e “Chikungunya”, têm ocorrido com frequência em várias regiões endêmicas no Brasil. Neste contexto, a prospecção de antivirais deve ser avaliada em modelos que possibilitem a análise da atividade antiviral durante infecções múltiplas. Dengue é a mais importante arbovirose do mundo, sendo endêmica em mais de 100 países, e infectando 50 a 100 milhões por ano. A forma mais grave da doença pode causar mais de 500000 hospitalizações com uma taxa de mortalidade de até 5% (CHEN e VASILAKIS, 2011). Dengue pode ser causada por quatro diferentes sorotipos (DENV1-4) com coinfeções cada vez mais sendo reportadas, especialmente em áreas endêmicas onde há altas taxas de circulação de todos os sorotipos.

Sintomas da doença podem ser tratados, em particular utilizando analgésicos, antipiréticos e soros capazes de reidratar o paciente. Até o momento, não existem tratamentos antivirais para a doença, e a vacina, só recentemente, começou a ser testada em seres humanos. No entanto, vários estudos vêm sendo realizados visando descobrir e testar substâncias capazes de combater a doença, e inibidores de MEK/ERK têm um grande potencial para serem utilizados como antivirais.

Zika vírus por outro lado, foi responsável por epidemias nas Américas, Pacífico, África e Ásia nos últimos anos, que ganharam relevância pela relação da infecção por este vírus com o desenvolvimento de complicações neurológicas em adultos e associação com ocorrência de casos de microcefalia em fetos e recém-nascidos, tendo sido declarado pela OMS como Emergência Internacional de Saúde Pública.

A infecção de um hospedeiro por mais de um vírus ou linhagem de um mesmo vírus faz com que ocorra mudanças em características do patógeno, e essas mudanças poderiam afetar a eficiência de fármacos que visam o tratamento de uma doença. Além disso, coinfeções por diferentes sorotipos vem sendo consideradas como uma das possíveis explicações para o surgimento de sintomas mais graves. Estudos de coinfeção de flavivírus são escassos, e limitados ao diagnóstico de pacientes, ou estudos *in vitro* com células de mosquito, em particular C6/36. Visto o crescente número de casos de coinfeção sendo reportados, e a preocupação de sua importância nos aspectos clínicos e tratamento da doença, existe a necessidade de se estabelecer um método de estudo *in vitro* com células de

mamíferos, ou mesmo *in vivo*, principalmente para verificar se, de fato, potenciais antivirais atuam com a mesma eficácia no tratamento de coinfeções causadas por flavivírus.

3 – OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estabelecer um protocolo de estudo de coinfeção de sorotipos de *Dengue vírus* e *Zika vírus in vitro*, visando testar a eficiência antiviral de inibidores farmacológicos (IFs) da via sinalizadora de MEK/ERK.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar se a coinfeção celular por sorotipos distintos de *Dengue vírus* utilizando-se diferentes MOIs e diferentes tempos de infecção, interfere ou não com a multiplicação dos vírus.
- Verificar se a coinfeção de DENV e ZIKV interfere com a multiplicação dos mesmos
- Realizar curvas de multiplicação de DENV coinfectando as células, tanto na presença, como na ausência, de IFs de MEK/ERK, verificando-se a eficiência dos IFs em inibir a multiplicação viral.
- Determinar se é possível estabelecer uma correlação direta entre a multiplicação viral (DENV) expressa em UFP/ml, com aquela expressa em equivalentes genômicos.
- Avaliar se um vírus infectante primário (DENV) interfere com a multiplicação do sorotipo infectante secundário.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Células

4.1.1 Células VERO

As células VERO são uma linhagem de fibroblastos derivada de células de rim de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*). As células foram cultivadas em meio mínimo essencial (MEM) suplementado com 5% de SFB, antibióticos (penicilina 100U/mL e estreptomicina 0.1/ µg/mL) e antifúngico (fungizona 2 µg/mL). As células foram mantidas em uma estufa a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. As células foram utilizadas como modelo de coinfeção e para a curva de multiplicação.

4.1.2 Células BHK

As células BHK são uma linhagem de fibroblastos derivada de células de rim de hamster neonato (*Mesocricetus auratus*). As células foram cultivadas em meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 5% de SFB, antibióticos (penicilina 100U/mL e estreptomicina 0.1/ µg/mL) e antifúngico (fungizona 2 µg/ml). As células foram mantidas em uma estufa a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. As células foram utilizadas para a titulação viral.

4.2 Inibidores Farmacológicos

OBS: os IFs não serão aqui nominados, devido ao interesse em se depositar o pedido de patente, considerando-se o potencial antiviral de alguns destes inibidores.

Foram testados inibidores de última geração de MEK/ERK que vêm sendo utilizados em fase clínica I – III contra tumores humanos, todos adquiridos da Selleckchem/USA. Foram inicialmente diluídos em DMSO na concentração de 1000X e posteriormente, diluídos para se obter as concentrações de uso, concentrações estas que tiveram um efeito na redução dos títulos virais em pelo menos uma unidade logarítmica e não afetaram mais que 10-20% da viabilidade celular. Experiências prévias do Grupo de Transdução de Sinal do Laboratório de Vírus (GTS) na utilização destes IFs contra Flavivírus, têm testado as concentrações que obedecem aos critérios acima, sendo as mesmas utilizadas para a realização deste projeto. Devido a questões de patente pendente, os inibidores foram denominados MEKi-A e MEKi-B.

4.3 Teste de viabilidade celular –MTT

O ensaio colorimétrico com MTT, posposto por Mosmann (1983), foi utilizado para testar a citotoxicidade do inibidor de cPLA2, o RSC-3388, em células HeLa. Resumidamente, o teste consiste na adição de uma solução de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl] -2, 5-difeniltetrazolbrometo) sobre uma monocamada celular com o objetivo de se avaliar a proliferação e a viabilidade destas células. O MTT é reduzido em células metabolicamente ativas a cristais violetas de formazano, que são insolúveis. Após a adição de uma solução detergente ou DMSO, os cristais são dissolvidos, e tornam púrpura o meio em que as células foram cultivadas. A densidade óptica deste meio é, então, avaliada por um espectrofotômetro no comprimento de onda de 570nm, e permite correlacionar os valores obtidos com a quantidade de células viáveis. Para a execução do teste, placas de 96 poços foram preparadas com 10^4 células VERO, em meio MEM contendo 1% de SFB. Aproximadamente 24/48 horas após a semeadura das células, trocou-se o meio de cultura das mesmas, adicionando-se 100 μ L de meio MEM 1% SFB fresco em cada poço. Diluições seriadas do inibidor foram preparadas também em meio MEM contendo 1% de SFB em uma placa espelho. O DMSO (diluente das amostras) foi utilizado como controle. Após o preparo da placa espelho, 100 μ L de cada diluição a ser testada foram adicionados aos 100 μ L do meio fresco. As placas foram incubadas por 24/48 horas em estufa com atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37°C. O meio foi, então, removido e foram adicionados 50 μ L da solução de MTT em PBS (2mg/mL) aos poços. As placas foram incubadas por 90 minutos na estufa a 37°C. Passado este período de tempo, foram adicionados aos poços 150 μ L de DMSO, e as placas foram mantidas em um agitador de placas por 15 min. Posteriormente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro no

comprimento de onda de 570nm. Os valores obtidos da absorbância das amostras foram comparados com os valores obtidos para o controle celular.

4.4 Teste de viabilidade celular -Cristal Violeta

Para averiguar a viabilidade celular frente ao uso dos inibidores farmacológicos testados, as células VERO, foram semeadas em placas de 96 poços nas condições de crescimento descritas para cada célula. Após a confluência celular atingir aproximadamente 80 a 90%, as células foram carenciadas com 0.5% de SFB por 12 horas e, então, foram adicionados os inibidores testados, alguns poços foram utilizados como controle, e nesses não adicionamos inibidores. Depois de um período de 24-48h horas foram adicionados 25µL da solução de Cristal Violeta 1% durante 15 min a temperatura ambiente. Após lavagem e subsequente secagem, foram adicionados 160µL de SDS 1%. A leitura do experimento foi feita em leitor de ELISA (570 nm).

4.5 Vírus

Nesse trabalho foram utilizadas inicialmente uma linhagem para cada sorotipo. DENV-1 genótipo V, isolado 109. DENV-2 genótipo Asiático/Americano linhagem Pi59, DENV-3 genótipo III, linhagem Pi76. Os três foram gentilmente cedidos pela Dra. Leandra Barcelos Figueiredo e a Profa. Erna G. Kroon, do Laboratório de Vírus da UFMG. DENV-4 genótipo I isolado em Boa Vista cedido pelo Doutor Maurício L. Nogueira da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. O ZIKV utilizado foi o PE243 genótipo asiático, cedido pela Dra. Marli Tenório do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz em Pernambuco.

4.6 Curva de Multiplicação Viral por titulação e qPCR

As curvas de multiplicação foram realizadas em células VERO. As células foram semeadas em placas com 24 poços, cada poço contendo $1,5 \times 10^5$ células. Após 24 horas, as células foram coinfectadas com os dois sorotipos distintos de DENV, utilizando-se a MOI previamente testada, isto é, aquela em que não se observava o fenômeno da interferência viral durante a coinfeção. A adsorção foi feita por 1 hora no gelo, após isso foi realizada a lavagem com PBS, sendo então adicionado meio MEM com 1% de SFB. As placas foram, então, incubadas a temperatura de 37°C e 5% de CO₂ durante 4 dias.

Todos os dias o sobrenadante foi coletado e guardado a -70°C . Após isso, foi realizada a titulação das amostras para quantificar os vírus.

Para a qPCR o sobrenadante e a monocamada foram coletados, sendo coletados 200uL do sobrenadante e na monocamada celular foram adicionados 600uL de TRIZOL, e após a homogeneização as amostras foram armazenadas a -70°C .

4.7 Titulação

Todas as titulações foram realizadas em células BHK, cultivadas em placa de vinte e quatro poços com confluência aproximada de 60-70%, sendo um poço reservado para controle celular. Foram feitas uma série de diluições da suspensão viral (10^{-3} a 10^{-7}) que foram, posteriormente, inoculadas às células. A adsorção viral foi feita por 2 horas e após isso foi adicionado meio 199 suplementado com 2% de SFB e contendo 1-1,2% de carboximetilcelulose (CMC). Após a adsorção as placas foram colocadas na estufa a 37°C em atmosfera de 5%CO₂ durante 5-7 dias, fazendo-se a observação do efeito citopático na monocamada todos os dias, utilizando-se o microscópio invertido. Após esse período, foi adicionado formaldeído a 3,7% por 12-18 horas a temperatura ambiente para fixação. Em seguida, o formaldeído foi descartado, corado com cristal violeta a 1% (p/v) em etanol 20% (v/v) por 30 minutos e efetuando-se a contagem das placas de lise viral. O poço contendo de 30 a 300 placas foi usado para determinar o título viral, expresso em UFP/mL (unidades formadoras de placa por mL).

4.8 Coinfecção de linhagens celulares

As coinfeções foram realizadas, em células VERO cultivadas em placas de vinte e quatro poços contendo inicialmente $1,5 \times 10^5$ células. Após 24 horas as monocamadas celulares foram infectadas com uma combinação de duas linhagens de vírus com MOIs distintas. A adsorção foi feita por 1 hora em gelo, buscando sincronizar a penetração dos vírus, após isso foi feita a lavagem com PBS e então foi adicionado meio MEM com 1% de SFB. As placas então foram colocadas na estufa a temperatura de 37°C e 5% de CO₂. O sobrenadante e a monocamada celular de cada poço foram coletados no respectivo tempo de cada experimento. Foram feitas coinfeções com diferentes combinações de sorotipos, e infecções com apenas um sorotipo que serviu como controle positivo. Um dos poços permaneceu sem ser infectado e serviu como controle negativo. Os RNAs das amostras foram extraídos e os cDNAs gerados foram amplificados por qPCR.

4.9 Extração de RNA e Transcrição Reversa

O RNA viral total foi extraído da seguinte maneira: sobrenadante – utilizando-se o “Kit QIAamp” (Qiagen) de acordo com instruções do fabricante; sobrenadante + monocamada celular – utilizando-se o reagente TRIZOL (LIFE), sendo utilizados 600uL do mesmo para 200uL do sobrenadante junto com a monocamada celular, o restante do protocolo foi realizado de acordo com as especificações do fabricante com pequenas alterações: foram adicionados 600uL de Trizol aos poços com monocamadas infectadas, de modo que somente 200 µL de sobrenadante foi deixado nos poços. À solução com Trizol foi adicionado clorofórmio na proporção de 1:5 de volume de Trizol usado, para promover a separação de fases e concentração do RNA na fase aquosa; esta solução foi então centrifugada a 12000 G (EPPENDORF 5417R) durante 15 minutos a 4°C. Após isso a fase aquosa foi transferida a outro tubo, ao qual foi adicionado volume de isopropanol na proporção de 1:2 de volume de Trizol usado inicialmente, de modo a promover a precipitação do RNA. A solução foi centrifugada a 12000 G (EPPENDORF 5417R) durante 10 minutos a 4°C e o RNA foi ressuspenso em etanol 75% na proporção 1:1 de volume de Trizol inicialmente usado. Após centrifugação a 12000 G (EPPENDORF 5417R) durante 5 minutos a 4°C, o RNA foi ressuspenso em 30uL água ultrapura. Após extração, as concentrações do RNA foram determinadas por espectrofotometria (NanoDrop) e os valores obtidos foram usados para se calcular o volume necessário para transcrição reversa, utilizando-se 500ng de RNA para síntese de cDNA.

O RNA foi quantificado usando um espectrômetro “NanoDrop” (ND-1000) e então utilizado em uma reação de transcrição reversa para gerar o cDNA correspondente. A quantidade de RNA utilizada para cada amostra foi de 500 ng. A transcrição reversa foi feita utilizando a enzima M-MLV (Promega), de acordo com instruções do fabricante da seguinte maneira: a reação foi preparada com a adição de iniciadores randômicos em todas as amostras e incubação por 5 minutos a 70°C em termociclador para desnaturação dos iniciadores; após este período as amostras foram mantidas em gelo. Foram então adicionados a cada amostra 10 µL de mix contendo 10nM de dNTP (Desoxinucleosídeos trifosfato), enzima Transcriptase Reversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase; Promega), solução tampão de reação da enzima (5X Reaction Buffer; Promega) e água ultra pura q.s.p 10 µL, e as amostras foram incubadas por 60 minutos a 37°C em termociclador. Por fim, a

reação foi inativada por incubação a 72°C por 5 minutos e o cDNA sintetizado pôde ser usado para amplificação por PCR.

4.10 Quantificação de RNA utilizando qPCR

A reação de RT-qPCR foi utilizada para determinar a quantidade de genoma viral de cada sorotipo durante as coinfeções, e para estabelecer as eventuais diferenças de replicação entre os sorotipos. As coinfeções de células foram realizadas de acordo com o item 4.6. Após a extração de RNA das amostras e a transcrição reversa, o RNA viral foi quantificado por RT-qPCR (Tabela 2), utilizando-se o reagente SYBR Green (Sigma) nas reações de RT-qPCR. Os iniciadores usados encontram-se na Tabela 3.

Tabela 2: Condições para os ciclos de amplificação por RT-qPCR

Função	Temperatura	Tempo	Ciclos
Pré-Desnaturação	94°C	5 min	1
Desnaturação	94°C	55 s	30
Anelamento	*	50 s	
Extensão	72°C	60 s	
Extensão final	72°C	5 min	1

* Temperatura específica dos iniciadores

Tabela 3: Iniciadores Utilizados nos ciclos de amplificação por qPCR

Vírus	Forward 5'-3' Reverse 5'-3'	Amplicom (nt)	Ref
DENV-1	CAAAAGGAAGTCGYGCAATA CTGAGTGAATTCTCTCTGCTRAAC	112	SANTIAGO et al., 2013
DENV-2	GCAGAAACACAACATGGAACRATAGT TGATGTAGCTGTCTCCRAATGG	199	ALM et al., 2015

DENV-3	ATGGAATGTGTGGGAGGTGG GGCTTTCTATCCARTAGCCCATG	167	ALM et al., 2015
DENV-4	GCAGATCTCTGGAAAAATGAACCA GAGAATCTCTTCACCAACCCYTG	114	ALM et al., 2015
HPRT	AGCCCTGGCGTCGTGATTA TCTCGAGCAAGACGTTTCAGT	143	n/a

Além da análise comparativa entre os sorotipos, também foi feita a comparação quantitativa de genoma viral em diferentes tempos de infecção, buscando-se analisar as taxas de replicação sob as diferentes condições de coinfeção. Para isso, os sobrenadantes foram recolhidos em diferentes tempos, incluindo-se o período logo após a adsorção, e os demais tempos que foram observados, analisando-se a curva de multiplicação das coinfeções.

4.11 Clonagem do fragmento amplificado no plasmídeo vetor PGEM® -T Easy

Os fragmentos amplificados por RT-qPCR foram clonados no plasmídeo vetor linearizado PGEM® -T Easy (Promega) que possui Timidina nas extremidades 3' em ambas extremidades do sítio de inserção do fragmento, o que aumenta a eficiência da ligação por ser compatível com as extremidades do produto da PCR geradas pela polimerase. Neste trabalho, foi utilizado o pGEM®-T Easy Vector System I, tendo sido preparadas reações separadamente, para os produtos da qPCR de DENV-3 e DENV-4 e para o controle negativo, no qual foi adicionado somente água ultrapura ao invés dos produtos de PCR; o protocolo de ligação usado foi conforme fornecido pelo fabricante. Brevemente, em um tubo de microcentrífuga foram adicionados: 1µL Tampão (10X) da enzima T4; 1µL do PGEM-T; 2µL do produto amplificado de PCR; 1µL da enzima T4; 1µL de BSA e água ultrapura q.s.p. 10µL. Para o controle positivo foi utilizado o inserto controle do kit, e para o negativo água. As reações foram misturadas com a pipeta e incubadas overnight.

4.12 Transformação bacteriana

Bactérias *Escherichia coli* DH5 Alpha quimiocompetentes foram transformadas com todo o volume de reação (10µL) da clonagem dos fragmentos amplificados de DENV-3 e

DENV-4 no plasmídeo vetor, sendo amostras diferentes para cada reação. As bactérias então foram incubadas em gelo por 30 minutos, passaram por choque térmico por 90 segundos em banho-maria a 42°C seguido por 2 minutos em gelo. Foram adicionados às bactérias 900µL de meio LB líquido sem adição de antibióticos, a temperatura ambiente. As bactérias foram incubadas por 1 hora a 37°C sob agitação orbital. Após o tempo de incubação, centrifugamos em centrífuga Sorvall RT6000B, refrigerada a 4°C, a 2500 rpm, A384, por 5 min, após isso o sobrenadante foi descartado e as mesmas foram ressuspensas em 100µL de meio LB líquido com antibiótico (80µg/ml de Ampicilina). As bactérias foram então plaqueadas em placas de petri previamente preparadas com meio LB solidificado, com antibióticos (80µg/ml de Ampicilina e incubadas por ~18h a 37°C. Foi também incubada uma placa de controle negativo (vazia).

Após o tempo de incubação, foram selecionadas quatro colônias positivas de cada placa (transformantes com plasmídeo controle de DENV-3 e DENV-4) e as mesmas foram inoculadas em 7mL de meio LB líquido com antibiótico (Ampicilina) por~18h a 37°C.

4.13 Confirmação da presença do plasmídeo controle de DENV-4 e DENV-3 nas bactérias transformadas, por PCR quantitativa em tempo real

Foi realizada amplificação por RT-qPCR dos fragmentos de DENV-3 e DENV-4 nas amostras de *E.coli* transformadas, segundo as condições descritas no item 4.11, porém, ao invés de cDNA dos respectivos vírus, foram adicionados inóculos das bactérias em volume correspondente, ou água ultra pura, no caso de controles negativos. Estas amplificações foram realizadas com o intuito de confirmar que as colônias bacterianas positivas após transformação também eram portadoras dos plasmídeos controles para DENV-3 e DENV-4.

4.14 Isolamento do DNA plasmidial e quantificação em Nanodrop

Após o tempo de incubação, foi realizada a extração do DNA plasmidial das bactérias positivas transformadas com plasmídeo controle de DENV-3 e DENV-4. Foi realizada extração por “*Miniprep*” utilizando o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)* e o isolamento foi realizado segundo protocolo fornecido pelo fabricante. Brevemente, as bactérias transformadas foram cultivadas em 10mL de meio LB *overnight*. Após isso, as mesmas foram centrifugadas em centrífuga Sorvall RT6000B, refrigerada a 4°C, a 2500 rpm, A384, por 5 minutos. O sobrenadante então foi descartado e em seguida foram

adicionados 250 µL da solução de ressuspensão celular. E as amostras transferidas para um tubo de microcentrífuga. Em seguida, foram adicionados 250 µL de solução de lise, seguido de 10 µL da solução de protease alcalina. Foram adicionados então, 350 µL da solução neutralizante e as amostras foram novamente centrifugadas durante 10 minutos A 13000g (EPPENDORF, MINISPIN). O lisado (sobrenadante) foi, então, centrifugado novamente sob as mesmas condições em uma coluna fornecida pelo Kit, e após adição da solução de lavagem, centrifugado novamente por 1 minuto e a lavagem repetida. Após isso, a coluna foi transferida para um tubo de microcentrífuga padrão (1,5ml) e a eluição do DNA foi feita com 30 µL de água ultrapura. Seguida à extração dos plasmídeos, foi realizada a quantificação da concentração destes por espectrofotometria (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer).

4.15 Amplificação por RT-qPCR e eletroforese em gel de Agarose para confirmação do tamanho do inserto.

Foi realizada novamente reação de RT-qPCR, segundo condições descritas no item 4.9, para confirmação da presença do fragmento de DENV-3 e DENV-4 nas amostras obtidas após isolamento dos plasmídeos controles por “*Miniprep*”. Os produtos de amplificação foram submetidos a corrida de eletroforese em gel de Agarose, à concentração de 2%, em solução tampão TAE 1X, previamente diluído da solução TAE 50X por sua vez composto de base tris (40nM), ácido acético glacial (57mL) e EDTA (100 mL a 500nM). A corrida foi realizada a 100V durante 30 minutos. O gel foi corado com *SYBR Safe* (1µL/10mL, *Life technologies*), para visualização dos insertos e foi usado marcador de massa molecular (múltiplos de 100pb) (*Ludwig Biotec*).

4.16 Linearização dos plasmídeos controles por digestão com Enzimas de Restrição

Os plasmídeos controles para DENV-3 e DENV-4 extraídos foram digeridos com enzimas de restrição para linearizá-los, e serem então usados na padronização da curva. A enzima de restrição usada foi a Mlu-I (5'-A[^]CGCGT-3') (Promega). Para os controles negativos, não foi adicionada enzima de restrição à reação.

4.17 Purificação do fragmento digerido do gel de Agarose

Após o período de incubação da reação, as amostras dos plasmídeos digeridos e não digeridos foram submetidas à corrida de eletroforese em gel de Agarose, à concentração de 4%, segundo condições descritas no item 4.14. Foi usada marcador de massa molecular (múltiplos de 1000pb) (*Ludwig Biotec*) e o tamanho da banda de plasmídeo não digerido foi de 3.182bp para plasmídeo controle de DENV-3 e 3.129 bp para plasmídeo controle de DENV-4. Após a corrida de eletroforese, foi realizado o isolamento das bandas correspondente aos plasmídeos digeridos por meio do *kit QIA quick Gel Extraction Kit (Qiagen)*. Após a extração, a concentração dos plasmídeos controle de DENV-3 e DENV-4 foram quantificadas por espectrofotometria (NanoDrop).

4.18 Diluição seriada e curva de quantificação absoluta por RT-qPCR

A partir das concentrações dos plasmídeos controle linearizados obtidos após purificação, foram calculados a quantidade de cópias genômicas (Equivalentes Genômicos)/ μL , segundo o cálculo: {Número de cópias genômicas = [concentração DNA (g/ μL) x $6 \cdot 022 \cdot 1023$ (pb/mol)] / [tamanho vetor+inseto (pb) x 660 (g/mol)]}.

Após obtenção dos Equivalentes Genômicos (EG) de cada plasmídeo controle, foram realizadas diluições seriadas na proporção 1:10, a partir da quantidade conhecida de 1×10^9 EG, sendo então obtidas as diluições de E9 a E3 para padronização da curva padrão para quantificação absoluta por RT-qPCR. As diluições foram realizadas com água ultra pura (Invitrogen). Após isso foi realizada a padronização da curva de quantificação absoluta, por meio da amplificação por RT-qPCR nas condições descritas no item 4.9; a curva padrão foi construída através da obtenção do C_T (*cyclethreshold*) em que se iniciou a detecção de DNA das diluições conhecidas versus o logarítmico da quantidade de DNA das mesmas.

4.19 Teste de eficiência dos inibidores

Foram testadas diferentes concentrações dos IFs em células coinfetadas. Em placas de 24 poços foram semeadas $1,5 \cdot 10^5$ células por poço, as células foram infectadas com dois sorotipos. A MOI e tempo de infecção foram decididos de acordo com os resultados obtidos nos experimentos anteriores. Foram adicionadas às monocamadas celulares os inibidores em diferentes concentrações, visando redução no título viral/equivalentes genômicos (EG) de

pelo menos uma unidade logarítmica e na menor concentração em que não se observasse efeito citotóxico. Após o tempo de infecção ideal (determinado pela curva de multiplicação) as amostras foram coletadas e tituladas.

4.20 Análise estatística

Todos os dados serão expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). As diferenças entre as médias foram comparadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey. Na comparação entre apenas dois grupos, foi utilizado o teste t de Student não pareado. Os resultados foram considerados significativos quando valor de $p < 0.05$. Barras horizontais sobre os gráficos representam a média de erro padrão para a construção dos gráficos foi utilizado o software GraphPad PRISM 7.

5 – RESULTADOS

5.1. Coinfecção VERO – comparação entre os 4 sorotipos.

Para verificar a viabilidade da coinfecção em células VERO, e a presença ou ausência do fenômeno de interferência viral entre os quatro sorotipos, as células VERO foram infectadas com diferentes duplas de combinações dos 4 sorotipos de DENV, e após 96 horas, o sobrenadante foi coletado e foi feita extração de RNA com kit QIamp e transcrição reversa com a M-MLV (Promega) seguida da qPCR (SYBR Green) utilizando iniciadores para cada vírus. Os resultados foram comparados com a infecção individual e estão mostrados em unidades arbitrárias calculadas por meio do método de $\Delta\Delta Ct$, o normalizador utilizado foi o HPRT. Os gráficos de colunas mostram a quantidade de unidades arbitrárias para cada vírus.

Em todas as amostras coinfectadas, foi possível detectar o genoma viral indicando que a coinfecção em células VERO é viável e ambos os vírus são capazes de se replicar durante a coinfecção.

DENV-1 apresentou redução significativa quando coinfectado com os sorotipos 3 e 4, mas não com o sorotipo 2, indicando que a replicação dos sorotipos 3 e 4 podem interferir com a replicação do DENV-1 (Figura 16).

DENV-2, DENV-3 e DENV-4, não apresentaram diferença significativa entre as amostras coinfetadas e individualmente infectadas, sugerindo que há pouca ou nenhuma interferência entre as replicações desses vírus (Figuras 15;16;17.)

É interessante notar que quando coinfetados com o DENV-1, nem o DENV-3 nem o DENV-4 apresentaram redução significativa no número de cópias genômicas, indicando que a interferência observada com o DENV-1 é unilateral.

Para a continuação do trabalho decidimos continuar trabalhando com DENV-3 e DENV-4, pois não observamos interferência viral entre eles, para que seja possível a avaliação do possível efeito antiviral dos inibidores sem ela.

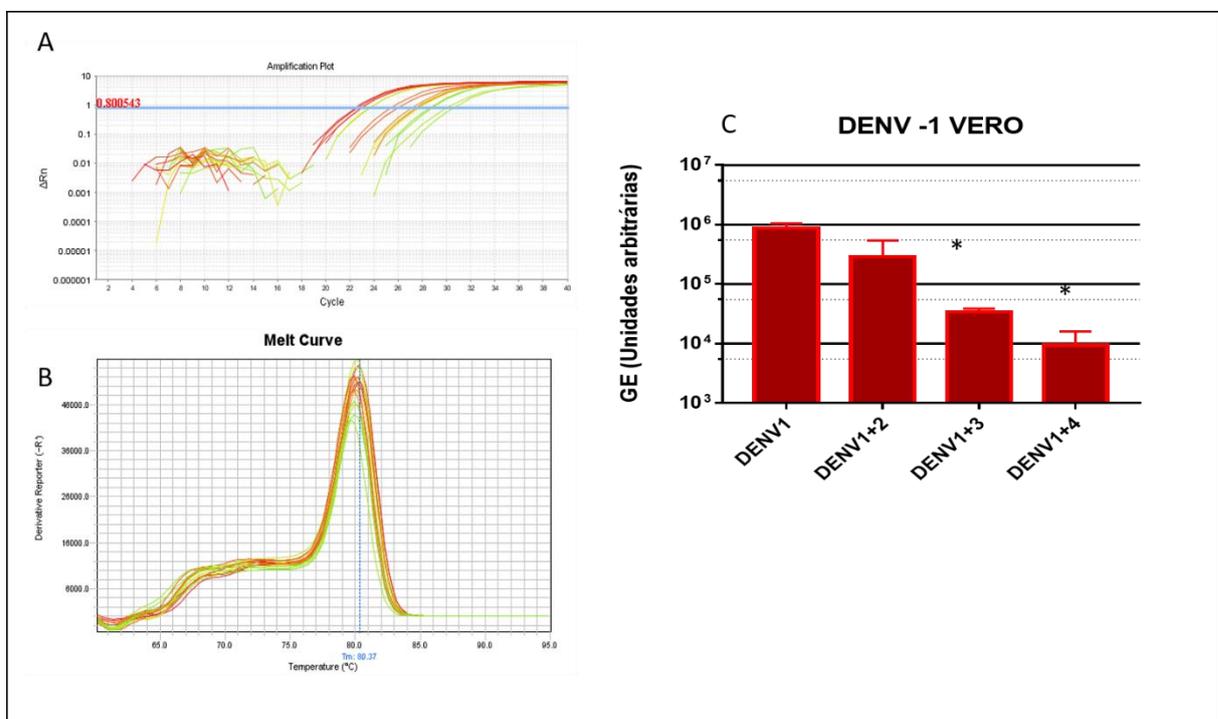


Figura 16: Coinfecção DENV-1 – Células Vero foram infectadas com DENV-1 a MOI=1 e coletadas após 96h. Após esse tempo as amostras foram submetidas a extração de RNA, transcrição reversa e qPCR. A) Curva de amplificação das amostras de DENV-1. B) Curva de Melt das amostras de DENV-1. C) Gráfico mostrando o número de unidades arbitrárias de cópias genômicas de DENV-1 e os resultados da coinfecção comparados com o da infecção individual. Os valores são dados unidades arbitrárias calculadas pelo método de $\Delta\Delta C_t$. O gráfico mostra que houve redução de aproximadamente 2 unidades logarítmicas do número de cópias genômicas de DENV-1 quando coinfetado com DENV-3 E DENV-4. A

barra sobre a coluna representa o erro padrão das duplicatas biológicas. O asterisco representa diferenças significativas ($p < 0,05$).

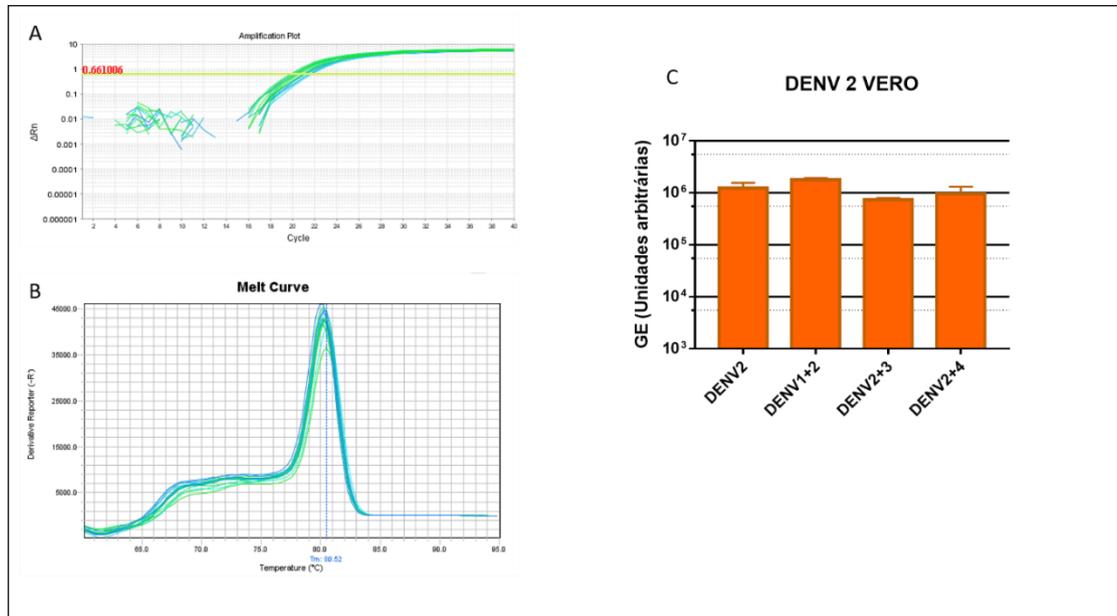


Figura 17: Coinfecção DENV-2– Células Vero foram infectadas com DENV-2 a MOI=1 e coletadas após 96h. Após esse tempo as amostras foram submetidas a extração de RNA, transcrição reversa e qPCR. A) Curva de amplificação das amostras de DENV-2. B) Curva de Melt das amostras de DENV-2. C) Gráfico mostrando o número de unidades arbitrárias de cópias genômicas de DENV-2 e os resultados da coinfecção comparados com o da infecção individual. Os valores são dados unidades arbitrárias calculadas pelo método de $\Delta\Delta Ct$. O gráfico mostra que houve pouca variação entre o número de cópias genômicas entre as amostras. A barra sobre a coluna representa o erro padrão das duplicatas biológicas.

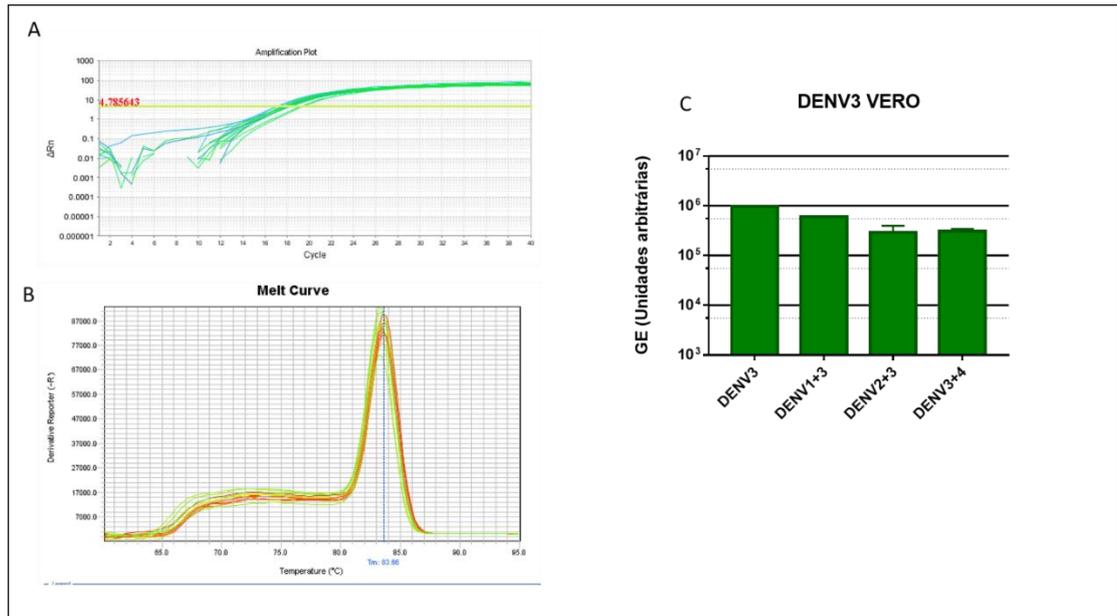


Figura 18: Coinfecção DENV-3 – Células Vero foram infectadas com DENV-3 a MOI=1 e coletadas após 96h. Após esse tempo as amostras foram submetidas a extração de RNA, transcrição reversa e qPCR. A) Curva de amplificação das amostras de DENV-3. B) Curva de Melt das amostras de DENV-3. C) Gráfico mostrando o número de unidades arbitrárias de cópias genômicas de DENV-3 os resultados da coinfecção comparados com o da infecção individual. Os valores são dados unidades arbitrárias calculadas pelo método de $\Delta\Delta Ct$. O gráfico mostra que houve pouca variação entre o número de cópias genômicas entre as amostras. A barra sobre a coluna representa o erro padrão das duplicatas biológicas. (Fig. 19).

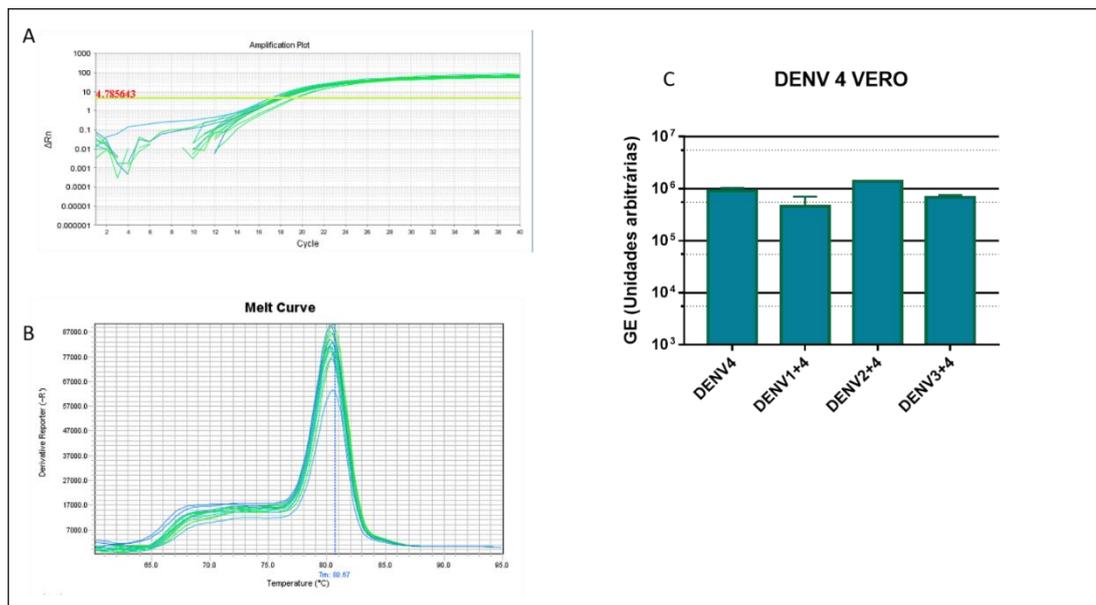


Figura 19: Coinfecção DENV-4– Células Vero foram infectadas com DENV-4 a MOI=1 e coletadas após 96h. Após esse tempo as amostras foram submetidas a extração de RNA, transcrição reversa e qPCR. A) Curva de amplificação das amostras de DENV-4. B) Curva de Melt das amostras de DENV-4. C) Gráfico mostrando o número de unidades arbitrárias de cópias genômicas de DENV-4 e os resultados da coinfecção comparados com o da infecção individual. Os valores são dados unidades arbitrárias calculadas pelo método de $\Delta\Delta Ct$. O gráfico mostra que houve pouca variação entre o número de cópias genômicas entre as amostras. A barra sobre a coluna representa o erro padrão das duplicatas biológicas.

5.2. Obtenção de plasmídeos controles

Para aprofundarmos os estudos de coinfecção selecionamos os sorotipos 3 e 4 e desenvolvemos um sistema de quantificação absoluta de cópias genômicas, buscando substituir o método padrão de titulação viral (UFP/ml).

Inicialmente foi feita uma qPCR com os iniciadores específicos para cada sorotipo, em seguida foi feita uma eletroforese para verificar se o tamanho das bandas apresentado era o esperado, os fragmentos foram submetidos a um fracionamento em gel de agarose 1%. Conforme mostrado na figura abaixo, todos os fragmentos apresentaram tamanho de banda esperado (Figura 20)

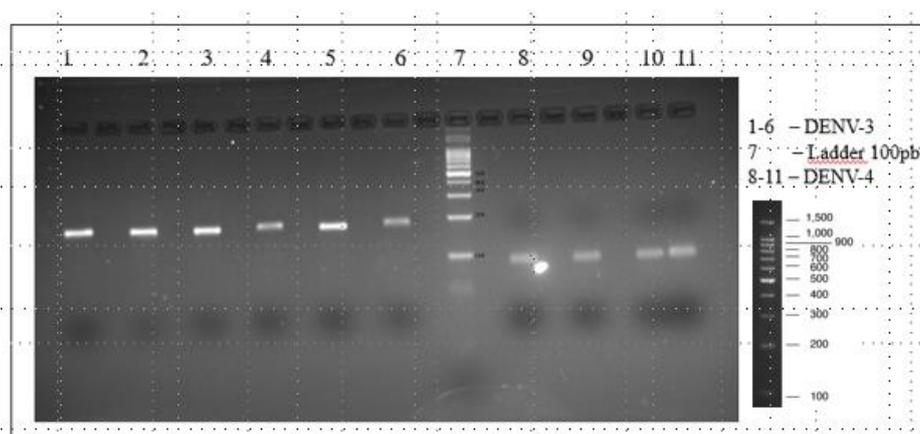


Figura 20: Seleção dos plasmídeos por qPCR. Após a qPCR com os iniciadores para DENV-3 (canaletas 1 a 6) e DENV-4 (canaletas 8 a 11), os DNAs amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%. Todos os fragmentos apresentaram tamanho esperado. Marcador: 100pb.

Após a eletroforese para a confirmação, o produto da PCR foi clonado no vetor pGEM-T e empregado no processo de transformação da *E.coli* para cada fragmento separadamente.

A triagem das colônias foi feita por qPCR com os iniciadores específicos e o DNA plasmidial foi extraído por Miniprep e em seguida digerido com a enzima Mlu I buscando linearizá-lo. Confirmamos a linearização por fracionamento em gel de agarose 1% sendo os DNAs extraídos do gel e purificados. Após purificação o DNA plasmidial apresentou concentrações de 37 ng/uL (DENV-3) e 60 ng/uL (DENV-4). Com esses valores, utilizamos a ferramenta encontrada na página: <http://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr>, para calcular o número de cópias genômicas, em seguida fazendo uma curva de diluição 1:10 (Figura 5.2.2 C). As curvas de diluição foram usadas como curvas padrão para calcular o número de cópias genômicas dos experimentos posteriores. As curvas tiveram, para DENV-3 uma eficiência de 93,63% e coeficiente de linearidade (R^2) de 0,979 (Figura 21A) e para DENV-4 uma eficiência de 89,4% e R^2 de 0,986 (Figura 21B).

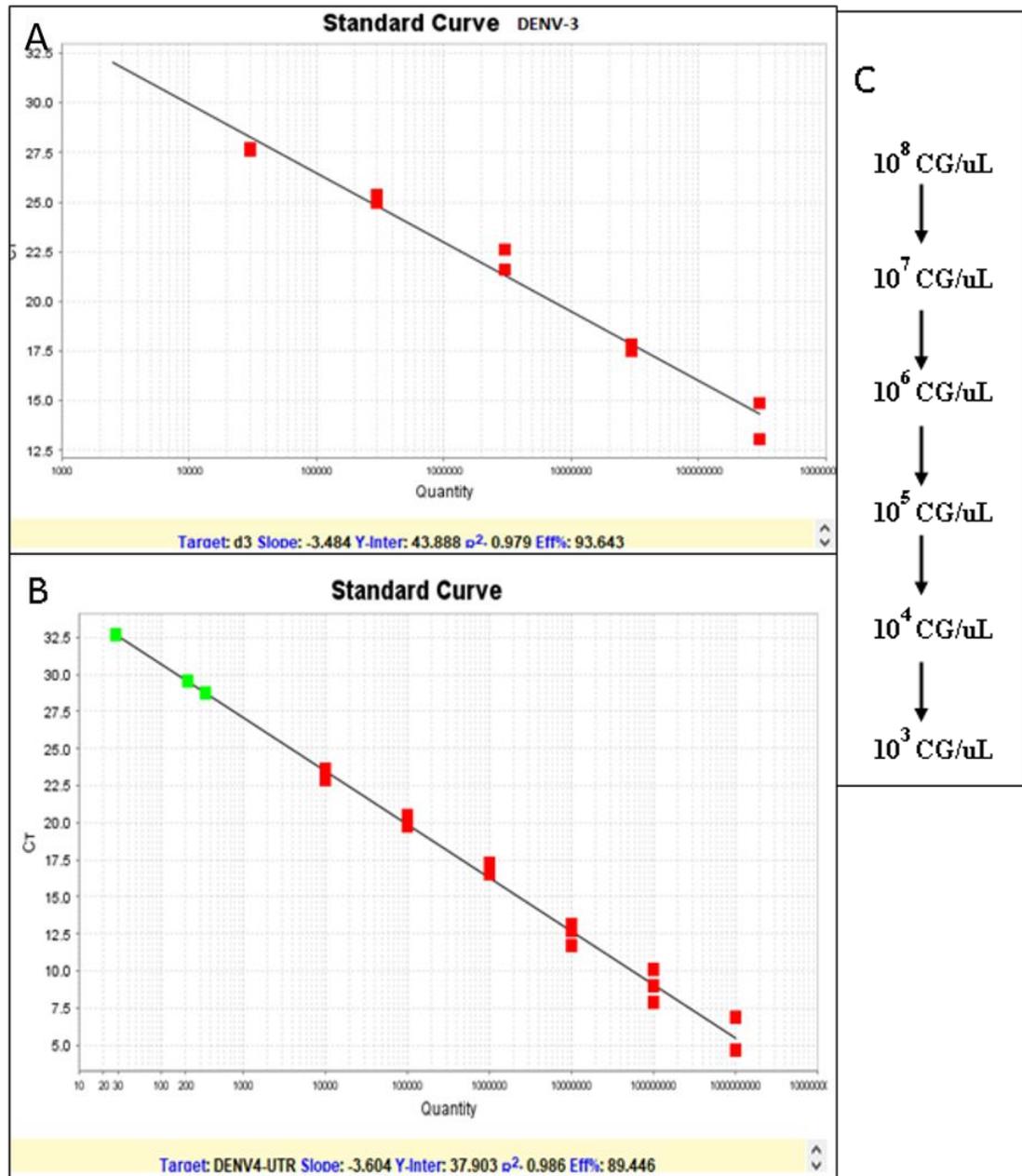


Figura 21: Curva padrão com diluições seriadas na base de 10 do plasmídeo. A) Curva padrão DENV-3 B) Curva padrão DENV-4 C) Diluições seriadas com base no número de cópias genômicas (GC)

5.3 Quantificação absoluta de DENV-3 e DENV-4

Para verificar se existia variação no número de cópias genômicas de DENV-3 e DENV-4 quando coinfectados, e como a MOI utilizada influenciava essa variação, infectamos células VERO com os vírus individualmente ou coinfectadas em três MOIs distintas: MOI =1

para garantir um percentual de células infectadas alto, $MOI = 10$ para garantir que todas as células estivessem infectadas (e, teoricamente coinfectadas) e por último, $MOI=0,1$ para um baixo número de células infectadas inicialmente (Tabela 4). O sobrenadante das amostras foi coletado 96 h.p.i para as MOIs de 1 e 10, e 120h.p.i. para MOI de 0,1. A extração de RNA foi feita com kit QIamp e transcrição reversa com a M-MLV (Promega) seguida da qPCR. Os resultados foram mostrados em gráficos de colunas (Figura 5.3)

Tabela 4 - Percentual de células infectadas

MOI Utilizada	%Células infectadas (Infecção individual)	%Células infectadas (Coinfecção)
1	63%	39,69%
10	99,9%	99,8%
0,1	9,5%	0,96%

A tabela mostra os percentuais de células infectadas nas diferentes MOIs quando infectadas com apenas um vírus e coinfectadas. As duas primeiras colunas mostram o percentual de células infectadas com uma ou mais partículas. A terceira coluna mostra, quando coinfectadas, o número de células infectadas com duas ou mais partículas.

Os resultados do experimento, apresentado em um gráfico de colunas (Figura 22), mostram que a alteração na MOI inicial utilizada não houve variação significativa ($p<0,05$) no número de equivalentes genômicos entre as amostras individualmente infectadas e coinfectadas. As três MOIs testadas refletem situações com parâmetros distintos, em particular o número de células infectadas e coinfectadas inicialmente, no entanto, nenhum desses parâmetros parece influenciar o perfil de coinfecção não sendo observada interferência viral em nenhuma das circunstâncias.

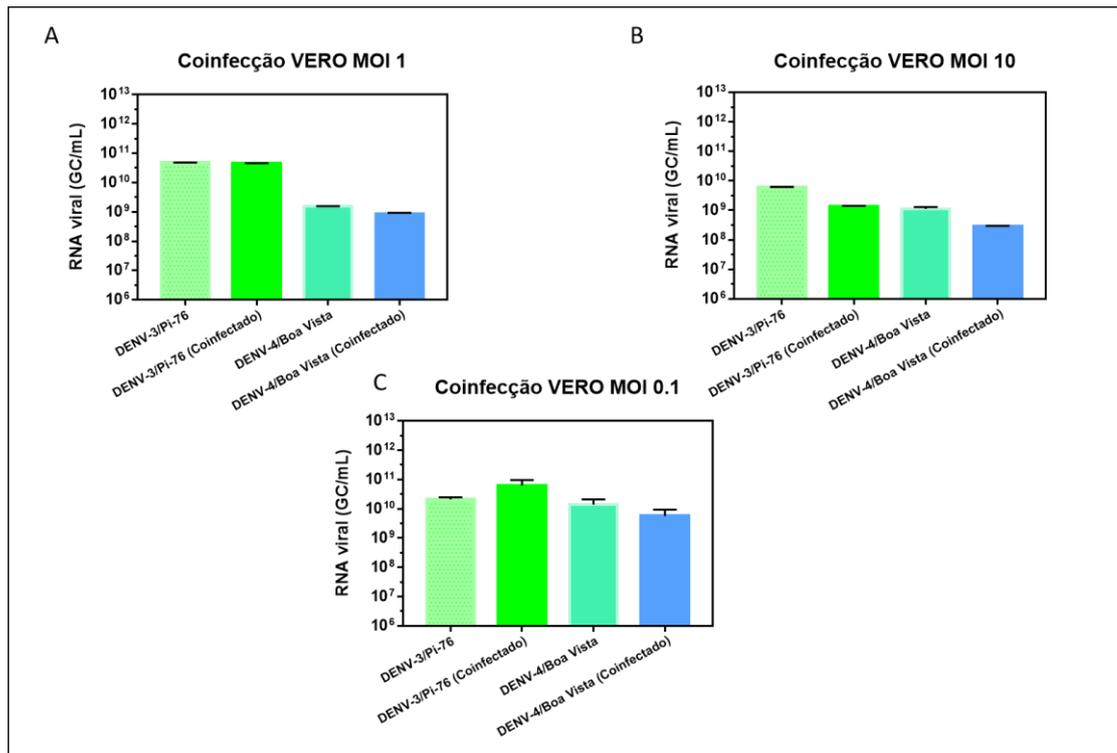


Figura 22: Coinfecção DENV-3 e DENV-4— Células VERO foram infectadas/coinfetadas com DENV-3 e DENV-4 e 96-120 h.p.i. o sobrenadante foi coletado e as amostras foram submetidas a extração de RNA, transcrição reversa e qPCR. A) Coinfecção a MOI de 1. B) Coinfecção a MOI de 10. C) Coinfecção a MOI de 10. Não foram observadas diferenças significantes entre as amostras individuais e coinfetadas para nenhuma das MOIs testadas. A barra sobre a coluna representa o erro padrão das triplicatas biológicas.

5.4 Curva de Multiplicação DENV-3 e DENV-4 – Comparação PCR (EG) x ensaio de placa (UFP)

Para verificar a correlação entre equivalentes genômicos (EG), quantificados pela qPCR e unidades formadores de placa (UFP), quantificados por ensaio de placa, para ambos DENV-3 e DENV-4, células VERO foram infectadas com cada vírus respectivamente, a MOI de 1. Os sobrenadantes das amostras foram coletados nos intervalos de: 4, 48, 72, 96 e 120 h.p.i. para DENV-3, e 18, 24, 48, 72 e 96 h.p.i. para DENV-4. Após os respectivos tempos, os sobrenadantes das amostras foram coletados, sendo que para uma alíquota foi feita extração de RNA com kit QIamp e transcrição reversa com a M-MLV (Promega) seguida da qPCR (Sybr Green), e para outra alíquota foi feito o ensaio de placa.

Observou-se que a curva de multiplicação de ambos os vírus teve o perfil similar tanto quando analisada por qPCR, quanto por ensaio de placa, com ambos os vírus apresentando uma taxa UFP/EG~ 1/10000, em todos os tempos analisados (Figura 23).

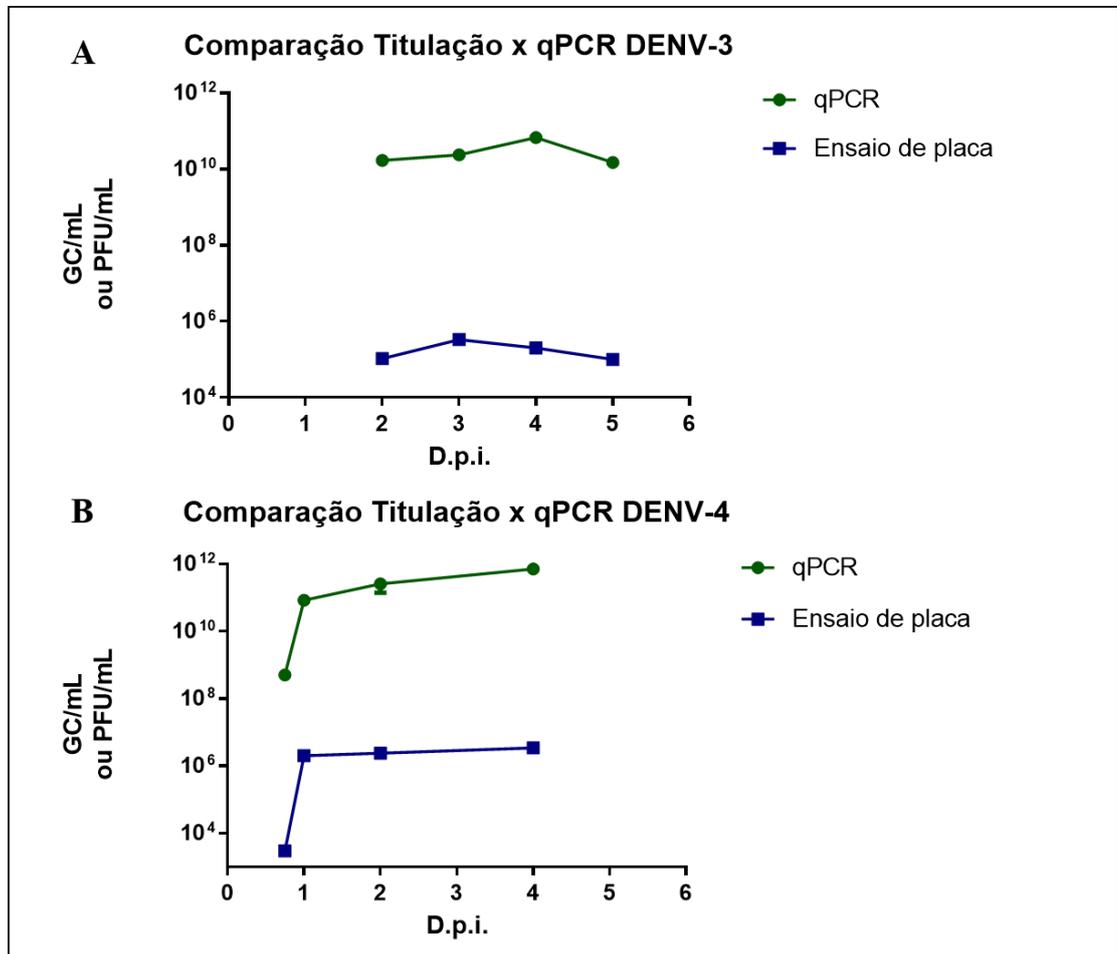


Figura 23: Comparação entre titulação e qPCR - Células Vero foram infectadas com DENV-3 ou DENV-4 a MOI de 1. Após os respectivos tempos, os sobrenadantes foram coletados e submetidos a: extração de RNA (Trizol), transcrição reversa (M-MLV) e qPCR(Sybr Green); ou ensaio de placa. A) Comparação entre resultados obtidos por titulação e por qPCR para DENV-3. B) Comparação entre resultados obtidos por titulação e por qPCR para DENV-4. A barra sobre as colunas representa o erro padrão das triplicatas biológicas.

5.5 Padronização do iniciador de HPRT

Com o objetivo de quantificarmos não só a quantidade de partículas encontradas no sobrenadante, mas também as que se encontram no interior das células, decidimos mudar o protocolo de extração, do kit QIAGEN para o protocolo de extração com Trizol. Um dos

problemas dessa técnica, no entanto é a variação que ocorre na quantidade de RNA total extraído, o que pode influenciar os resultados de quantificação por PCR. Para evitar esse problema decidimos utilizar um normalizador, e escolhemos então o gene HPRT.

Utilizamos a concentração de uso 500nM, para verificar a eficiência da normalização. Para isso selecionamos duas amostras positivas para DENV-4, e repetimos a PCR com o iniciador para DENV-4 e HPRT, então analisamos os resultados da quantificação normalizando os resultados ou não as réplicas biológicas (Figura 24). Nas duas amostras, sem normalizar, observamos que há uma amostra com valor significativamente diferente das outras duas. Após a normalização, as réplicas ficam com valores muito próximos, indicando que a normalização com HPRT pode ser utilizada para corrigir variações causadas pelas técnicas anteriores.

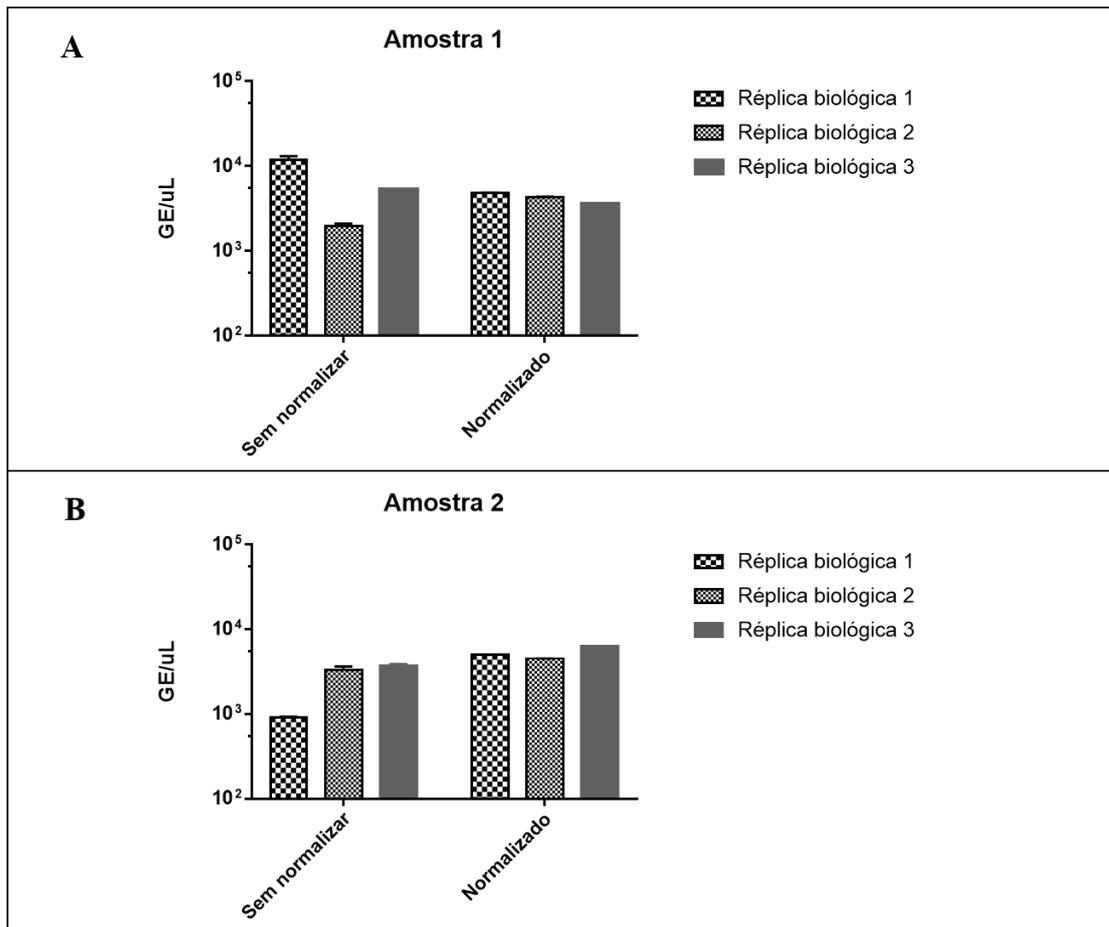


Figura 24: Amostras normalizadas com HPRT - Células VERO, foram infectadas com DENV-4, a MOI de 1, e após 48h foi feita a extração de RNA do sobrenadante e da monocamada celular. Em seguida, foi feita a transcrição reversa com a enzima M-MLV e as amostras foram então processadas para qPCR com os iniciadores de DENV-4 e HPRT.

Calculamos o número de cópias genômicas de DENV-4 com e sem normalizar com HPRT. A barra sobre as colunas representa o erro padrão das triplicatas biológicas e o asterisco representa diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

5.6 Curvas de multiplicação em coinfeção – DENV-3/4

Tendo em vista os resultados de coinfeção dos tópicos 5.3 e 5.4, decidimos manter utilizando a MOI de 1 para a coinfeção. A etapa seguinte foi realizar curvas de multiplicação por PCR para DENV-3 e DENV-4, isoladamente e em coinfeção. Com essa finalidade, células VERO foram infectadas a MOI de 1 com DENV-3 e/ou DENV-4 e, o sobrenadante e a monocamada celular foram submetidas a extração de RNA pelo protocolo de TRIZOL, nos seguintes tempos: 0h, 6h, 18h, 24h, 48h, 72h e 96h. Após isso foi feita a transcrição reversa utilizando a enzima M-MLV seguida da PCR. Todos os valores de EG foram normalizados pela expressão do gene HPRT. Foi feito um gráfico de pontos em linhas para mostrar os resultados (Figura 25)

Assim como observamos no tópico 5.4, as curvas de multiplicação de ambos os sorotipos são semelhantes, com o período de eclipse ocorrendo em torno das 6 horas, seguido da fase exponencial que ocorre até as 48 horas culminando na fase platô onde ocorre pouca variação na quantidade de EG. Não houve variação significativa ($p < 0,05$) em nenhum dos tempos analisados entre amostras individualmente infectadas e amostras coinfectadas tanto para DENV-3 quanto para DENV-4, sendo possível inferir que durante a coinfeção dos dois sorotipos a interferência viral não é um fenômeno relevante na multiplicação viral.

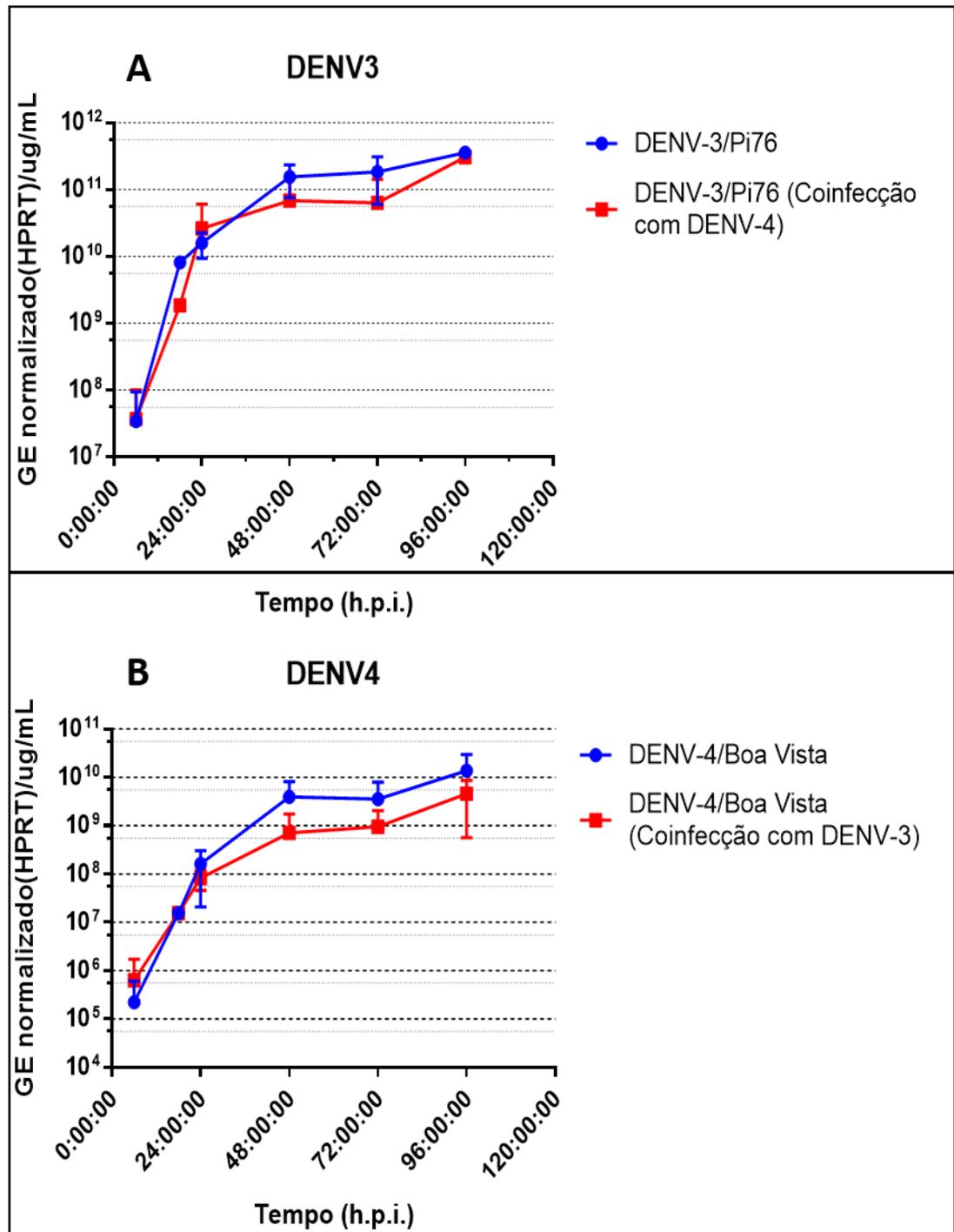


Figura 25: Curva de multiplicação viral em infecção individual e coinfecção- Células VERO, foram infectadas com DENV-3 e/ou DENV-4, a MOI de 1, e após os respectivos tempos foi feita a extração de RNA do sobrenadante e da monocamada celular. Em seguida foi feita a transcrição reversa com a enzima M-MLV e as amostras foram então processadas para qPCR com os iniciadores de DENV-3, DENV-4 e HPRT. A) Análise da curva de DENV-3. B) Análise da curva de DENV-4. A barra sobre as colunas representa o

erro padrão das triplicatas biológicas e o asterisco representa diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

5.7 Superinfecção DENV3/DENV4

Desde que não foram observadas diferenças significativas na quantidade de equivalentes genômicos durante os experimentos de coinfeção, tanto para DENV-3 quanto para DENV-4, decidimos verificar se durante uma superinfecção conseguiríamos observar alguma diferença e, a partir de que intervalo de tempo. Nesse experimento, células VERO foram semeadas em placas de 24 poços, e após 24 horas foram infectadas com DENV-3 ou DENV-4 a MOI de 1, após o tempo de adsorção, foi adicionado o meio apropriado, e após um intervalo de 6 horas as células foram novamente infectadas com o outro sorotipo (Células previamente infectadas com o sorotipo 3 por exemplo, foram infectadas com o sorotipo 4, secundário), a MOI de 1. Após 48 horas, o sobrenadante foi coletado e submetido a extração de RNA por TRIZOL, seguido de transcrição reversa com a M-MLV e qPCR. Os resultados foram mostrados em gráficos de colunas (Figura 26).

Não foi possível observar diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as amostras superinfectadas, esse resultado é condizente com o observado no tópico 5.3, onde alteração da MOI não afetou o perfil de coinfeção, sugerindo que ambos os vírus possuem capacidade de infectar e multiplicar-se estando as células previamente infectada ou não.

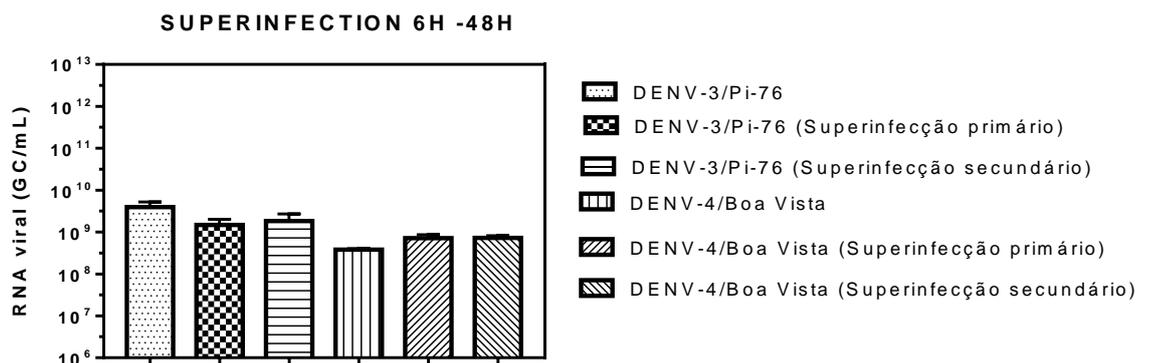


Figura 26: Superinfecção DENV3/4 6 horas Células VERO foram cultivadas em placas de 24 poços e, após 24 horas, as células foram infectadas com DENV-3 ou DENV-4 a MOI de 1, após adsorção de 1 hora foi adicionado meio e as placas colocadas na estufa a 37° com 5% de CO₂. Passadas 6 horas, o sobrenadante foi descartado e as células infectadas com o outro sorotipo (secundário), a MOI de 1 com adsorção de 1 hora, seguida de nova adição de

meio e colocadas na estufa as mesmas condições. Após 48 horas o sobrenadante das amostras foi coletado e submetido a extração de RNA pelo método de Trizol, transcrição reversa com a M-MLV e qPCR. A barra horizontal acima das colunas indica o erro padrão das triplicatas biológicas.

5.8 Teste de citotoxicidade MEKi-B

Para averiguar o efeito dos inibidores MEK/ERK na replicação de DENV-3 e DENV-4, a primeira etapa foi determinar a concentração de uso dos inibidores MEKi-A e MEKi-B. Trabalhos anteriores do GTS, já haviam averiguado a melhor concentração de uso de MEKi-A em 20 μ M. Para MEKi-B, a primeira etapa foi averiguar a concentração de uso menos tóxica para células VERO através do teste de citotoxicidade. Para isto células VERO foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 e 48 horas, e, após este período de tempo, o meio de cultura foi substituído por MEM 1% de SFB contendo o inibidor MEKi-B em diferentes concentrações. O novo meio contendo os inibidores foi deixado sobre as monocamadas celulares por 24/ 48 horas e, então, descartado para a adição de: A) solução de MTT em PBS, solução que se manteve sobre as células por um período de 3 horas antes da leitura em espectrofotômetro. B) Lavagem com PBS 2 vezes, seguido da adição de cristal violeta 1% (30 μ L) durante 15 minutos, lavagem com água 3 vezes, secagem a 37°C por 30 minutos, adição de 160 μ L de SDS 1% e leitura em espectrofotômetro.

Para o teste de citotoxicidade, o inibidor foi adicionado às células nas concentrações de 40 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M, e 2,5 μ M. Após a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570nm, os dados de densidade óptica foram mostrados em dois gráficos de colunas com valores em porcentagem de células viáveis com valores relativos ao controle celular (Figura 27).

Analisando-se os gráficos, observamos que houve uma diferença entre os resultados dados por MTT e cristal violeta com resultados no último tendo uma viabilidade celular mais baixa. A técnica de MTT avalia a viabilidade por meio do metabolismo de desidrogenases mitocondriais enquanto a técnica de cristal violeta avalia células viáveis ou não independente da atividade metabólica. Trabalhos anteriores do GTS, já indicavam que o uso de inibidores da via de MEK/ERK pode interferir com os resultados do teste por MTT, sendo essa a razão do uso da técnica de cristal violeta.

Os resultados observados 24 horas pós-tratamento, mostraram que as melhores concentrações de uso são 20 μ M e 10 μ M para MTT e cristal violeta, respectivamente.

Os resultados observados 48 horas pós-tratamento por cristal violeta indicaram alta toxicidade tendo a sobrevivência não ultrapassado a 70%, no entanto, ao observamos a placa notamos que a intensidade do controle celular estava demasiado elevada, o que poderia justificar esses valores. Por MTT os resultados foram semelhantes aos observados 24 horas pós infecção, com melhor concentração de uso sendo 20 μ M.

Considerando os resultados analisados, escolhemos a concentração de uso de MEKi-B de 20 μ M e 10 μ M, concentrações e, que a viabilidade foi próxima de 90% em MTT e cristal violeta, respectivamente.

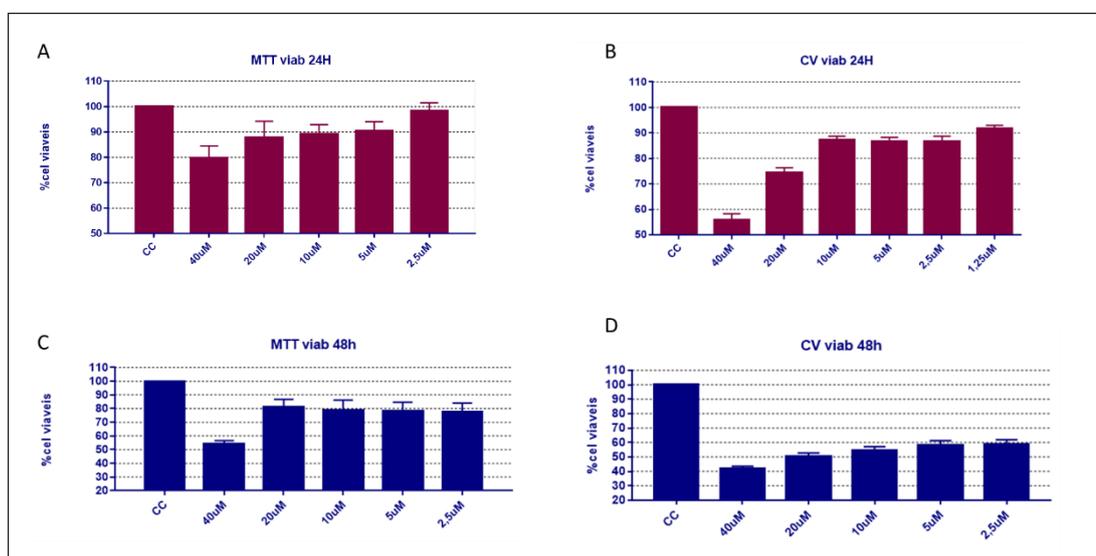


Figura 27: Citotoxicidade do inibidor MEKi-B-por MTT e cristal violeta. Células VERO foram cultivadas em placas de 96 poços e, após 24 e 48h, o meio de cultura foi descartado e um novo meio contendo diferentes concentrações do inibidor MEKi-B foi adicionado às monocamadas celulares. A placa foi incubada à 37°C sob atmosfera contendo 5% de CO₂ por 24/48 horas e, passado o tempo foram analisadas por cristal violeta ou MTT. A) Viabilidade celular por MTT com inibidor deixado na monocamada por 24 horas. B) Viabilidade celular por cristal violeta com inibidor deixado na monocamada por 24 horas. C) Viabilidade celular por MTT com inibidor deixado na monocamada por 48 horas. D) Viabilidade celular por cristal violeta com inibidor deixado na monocamada por 48 horas. Linhas horizontais sobre as colunas representam o erro padrão das triplicatas biológicas.

5.9 Tratamento das amostras coinfetadas com MEKi-A

O primeiro teste com os inibidores de MEK/ERK foi feito com o inibidor MEKi-A. Trabalhos anteriores do grupo já mostraram que o inibidor é capaz de reduzir a fosforilação de ERK em células VERO, e que a concentração de uso ideal é 20 μ M, sendo capaz de reduzir o título viral de DENV-3 e DENV-4 em 1-2 log₁₀ 24 horas pós-infecção. Para determinar se o mesmo é capaz de reduzir a replicação viral, células VERO foram infectadas/coinfetadas com DENV-3 e/ou DENV-4, o sobrenadante e a monocamada celular foram coletados após os tempos de 18,48 e 96 horas e submetidos a extração por Trizol seguido de transcrição reversa com a enzima M-MLV e finalmente a qPCR. Os resultados estão mostrados em gráficos de colunas com valores em equivalentes genômicos (EG) normalizados com o gene HPRT (Figura 5.9).

Como podemos observar nos gráficos na figura 26, não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as amostras tratadas ou não tratadas, indicando que o inibidor MEKi-A não interfere com a replicação viral, ao menos nesta concentração.

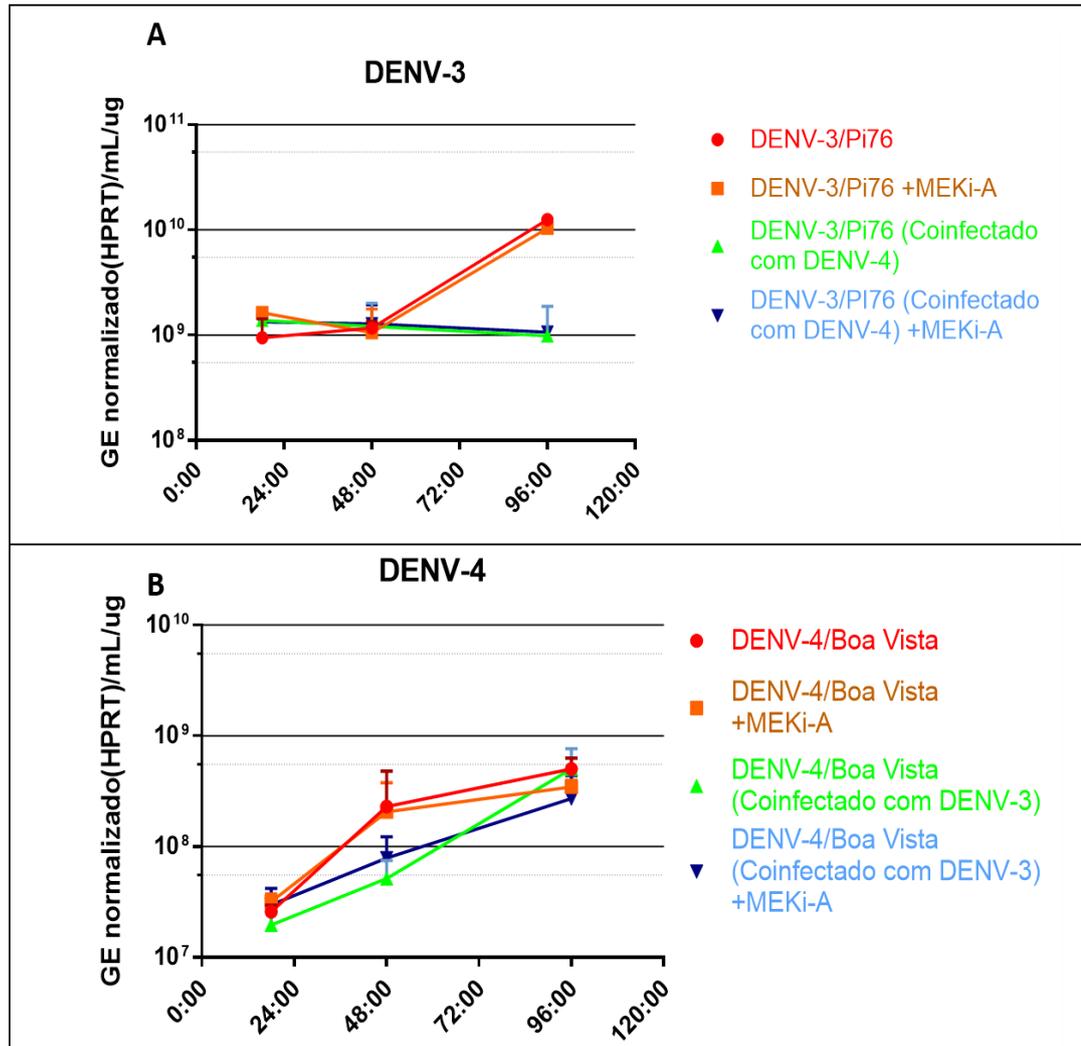


Figura 28: Tratamento das amostras coinfetadas com inibidor MEKi-A Células VERO foram cultivadas em placas de 24 poços e, no dia seguinte foram infectadas com DENV-3 e/ou DENV-4, a MOI de 1 após 1 hora de adsorção foi adicionado meio de cultura contendo 20 μ M do inibidor MEKi-A às monocamadas celulares. A placa foi incubada à 37°C sob atmosfera contendo 5% de CO₂ por 18/48/96 horas sem seguida sendo submetidas a extração de RNA pelo método de Trizol, transcrição reversa com a M-MLV e qPCR. A barra horizontal acima e abaixo indica o erro padrão das triplicatas biológicas.

5.10 Tratamento das amostras coinfetadas com MEKi-B

De posse dos resultados obtidos no tópico 5.7 repetimos o experimento do tratamento das amostras, dessa vez utilizando o inibidor MEKi-B com concentração de 20 μ M. Para determinar se o mesmo é capaz de reduzir a replicação viral, células VERO foram

infectadas/coinfectadas com DENV-3 e/ou DENV-4, o sobrenadante e a monocamada celular foram coletados após 48 horas e submetidos a extração por Trizol seguido de transcrição reversa com a enzima M-MLV e finalmente a PCR. Os resultados foram mostrados em gráficos de colunas com valores em EG normalizados com o gene HPRT (Figura 29).

Como podemos observar no gráfico, assim como com o inibidor MEKi-A, não foi possível observar diferenças significativas ($P < 0,05$) entre amostras tratadas e não tratadas. Esses resultados corroboram os observados no tópico 5.8, mostrando que os inibidores da via MEK/ERK não parecem afetar a replicação viral, independente da coinfeção.

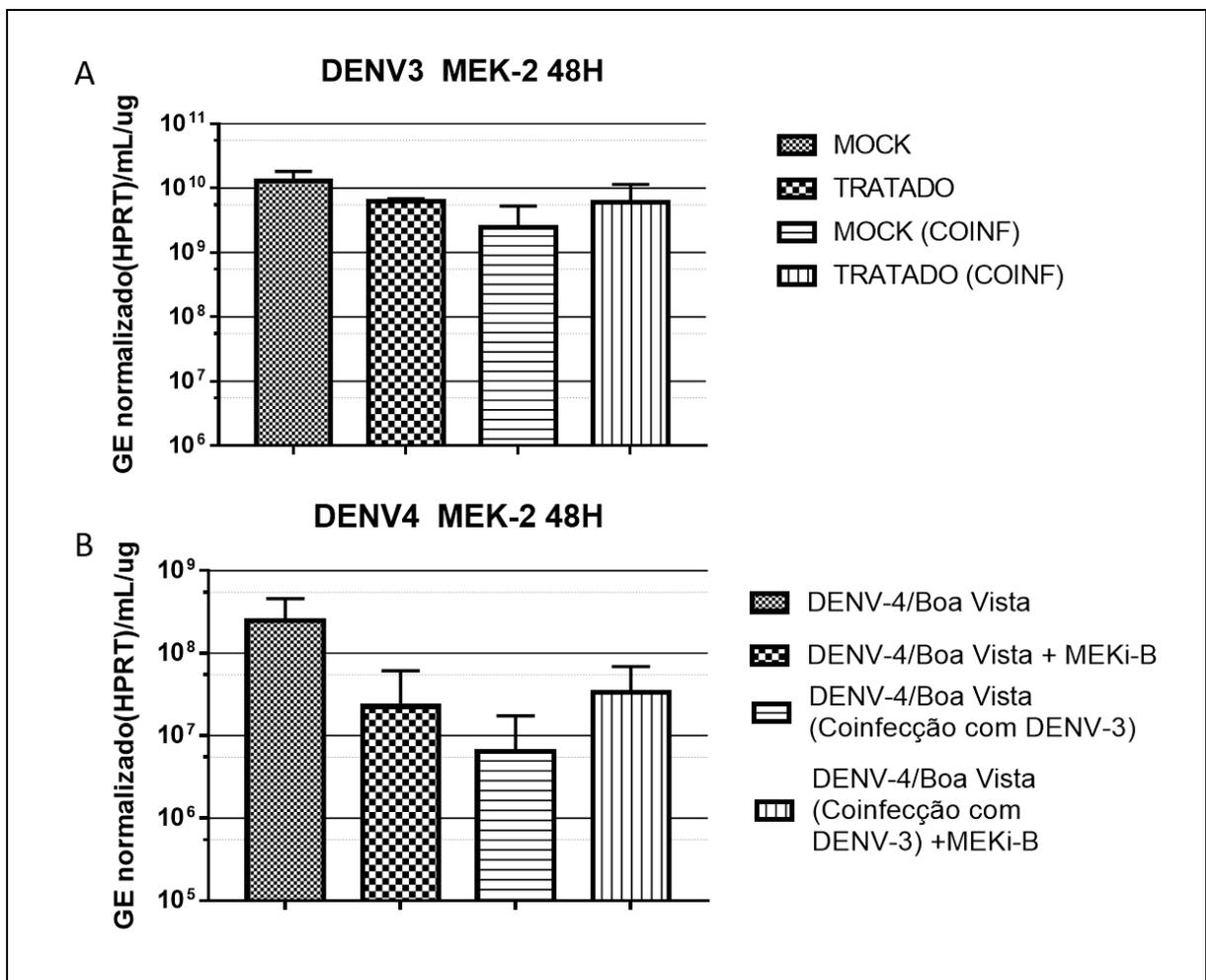


Figura 29: Tratamento das amostras coinfectadas com inibidor MEKi-B Células VERO foram cultivadas em placas de 24 poços e, no dia seguinte foram infectadas com DENV-3 e/ou DENV-4, a MOI de 1 após 1 hora de adsorção foi adicionado meio de cultura contendo 20 μ M do inibidor MEKi-B às monocamadas celulares. A placa foi incubada a 37°C sob atmosfera contendo 5% de CO₂ por 48 horas e em seguida sendo submetidas à extração de

RNA pelo método de Trizol, transcrição reversa com a M-MLV e qPCR. A barra horizontal acima das colunas indica o erro padrão das triplicatas biológicas.

5.11 Coinfecção DENV-4 e ZIKV

Com os resultados de coinfecção com DENV, realizamos experimentos semelhantes de coinfecção entre DENV-4 e ZIKV, buscando averiguar se o modelo de coinfecção testado anteriormente, funcionaria para outros vírus e se seria possível observar interferência viral entre eles. Os experimentos foram realizados com células VERO a MOI de 1, e diversos tempos foram coletados e usados para construir uma curva de multiplicação. Os resultados foram expressos em números de cópias genômicas (equivalentes genômicos) e normalizados com o gene HPRT. Os resultados foram mostrados em 2 gráficos de linha (Figura 28).

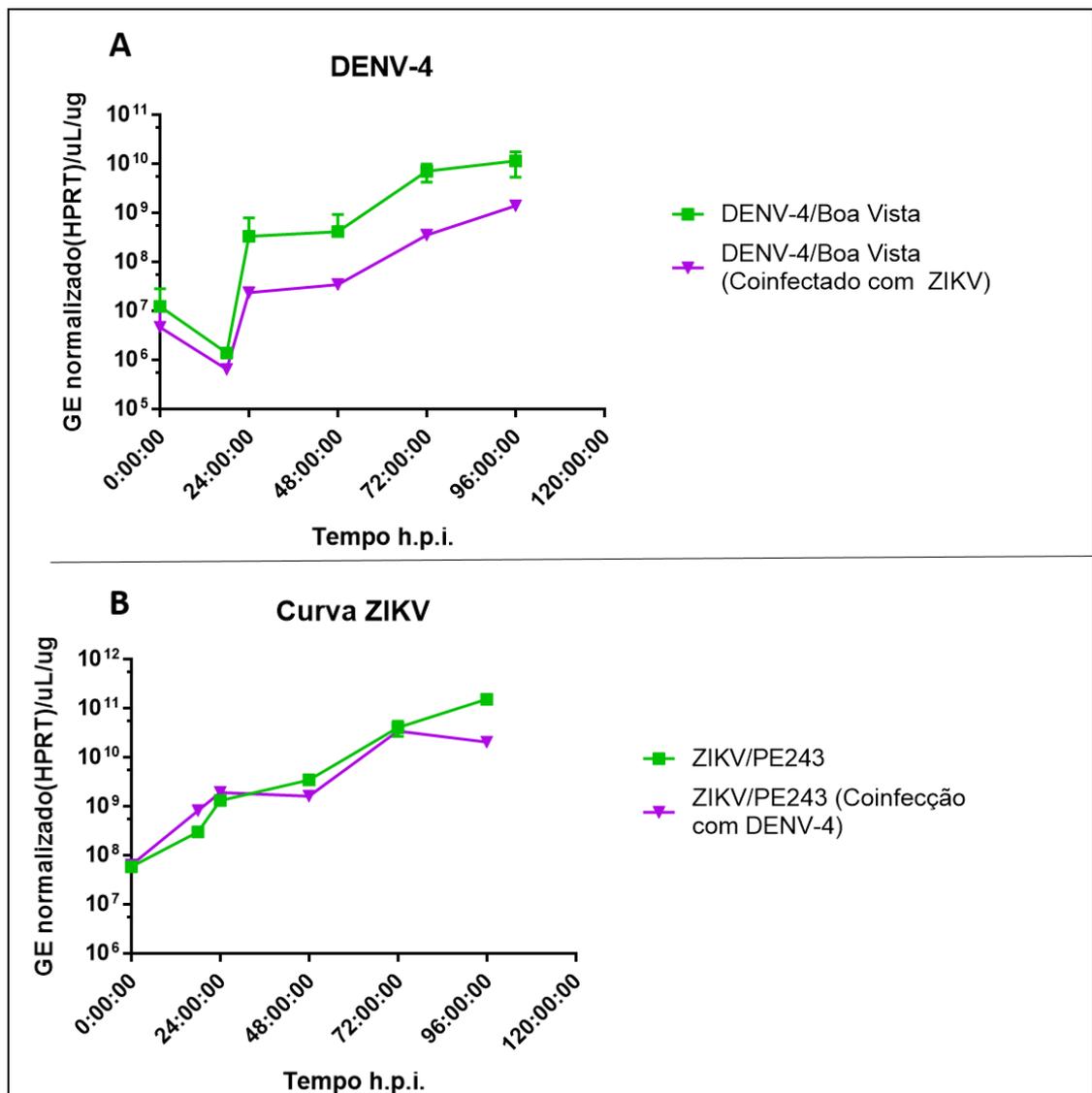


Figura 28: Curva de multiplicação viral em infecção individual e coinfeção - Células VERO, foram infectadas com DENV-4 e/ou ZIKV, a MOI de 1, e após os respectivos tempos foi feita a extração de RNA do sobrenadante e da monocamada celular. Em seguida foi feita a transcrição reversa com a enzima M-MLV e as amostras foram então processadas para qPCR com os iniciadores de DENV-4, ZIKV e HPRT. A) Análise da curva de multiplicação de DENV-4 isoladamente (verde) ou em infecção simultânea de DENV e ZIKV (roxo). B) Análise da curva de multiplicação de ZIKV isoladamente (verde) ou em infecção simultânea de ZIKV e DENV (roxo). A barra sobre as colunas representa o erro padrão das triplicatas biológicas e o asterisco representa diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Como podemos observar na figura 28, a curva de multiplicação de DENV-4 (A) apresenta o mesmo padrão comparada às infecções isoladas nestas células por este vírus, porém, a partir do tempo 24 horas até 96 horas de infecção, o número de equivalentes genômicos em coinfeção é reduzido em $\sim 1 \log_{10}$, indicando multiplicação reduzida deste vírus quando em coinfeção com ZIKV. Por outro lado, a curva de multiplicação do ZIKV (B) não apresentou diferenças significativas, independentemente de estar coinfectado, com a única exceção sendo o ponto de 96 horas.

6 – DISCUSSÃO

Os vírus são organismos dependentes de seus hospedeiros por não serem capazes de produzir a energia necessária aos diversos processos metabólicos e, na maioria das vezes, à síntese de precursores metabólicos utilizados na produção de macromoléculas. Em vista disso, os vírus necessitam usurpar a maquinaria biossintética de seus hospedeiros para completar seu próprio ciclo de multiplicação, sintetizando macromoléculas (exceto lipídios) essenciais para a formação de novas partículas, incluindo a manipulação da replicação e da síntese proteica, para produção do genoma e proteínas virais. Os vírus gigantes núcleo-citoplasmáticos de DNA (NCLDV), em particular os vírus gigantes, constituem exceção à regra, pois apresentam características distintas incluindo a capacidade de sintetizar muitos componentes necessários à síntese protéica, e, portanto, são menos dependentes da maquinaria celular do hospedeiro (SCHULZ et al., 2017). Para a maioria dos vírus, no entanto, o controle da maquinaria celular é importante, e depende da capacidade do vírus de manipular vias de sinalização celulares.

Devido a essa necessidade de controle da maquinaria biossintética do hospedeiro, é natural que a presença de outros vírus, por exemplo, coinfeccões, seja vista como uma forma de competição, denominada competição intracelular, que acarreta, na maior parte dos casos a perda de eficiência da multiplicação de um ou ambos os vírus, fenômeno denominado interferência viral. A interferência pode ocorrer entre vírus de famílias distintas, mesma família e até do mesmo entre sorotipos do mesmo vírus, dependendo das características de cada vírus e do hospedeiro (SALAS-BENITO & DE NOVA-OCAMPO, 2015).

Tendo-se já mencionado a importância dos estudos de coinfeção, o objetivo inicial desse trabalho foi averiguar a viabilidade de um modelo de coinfeção em células de mamífero. Para avaliar as taxas de multiplicação relativa de cada vírus coinfectante, optamos por utilizar um sistema de quantificação absoluta de cópias genômicas, que refletem a taxa de multiplicação intracelular destes vírus, por PCR quantitativo em tempo real. O método convencional de se analisar partículas viáveis por ensaio de placa não é viável para estudos de coinfeção sob condições normais devido às placas dos quatro sorotipos de DENV serem normalmente indistinguíveis umas das outras. Outras alternativas seriam a diferenciação das placas por meio de anticorpos marcados com fluorescência, ou a utilização de vírus recombinantes com características que permitissem essa diferenciação. Esses métodos, no entanto, são mais caros e demandam mais tempo. O uso do sistema de quantificação absoluta de cópias genômicas por meio da técnica de qPCR permite também avaliar melhor o impacto

dos inibidores de MEK/ERK na replicação viral. Trabalhos anteriores do GTS, já haviam mostrado uma redução significativa ($\sim 2\text{-log}_{10}$) no título viral (UFP/ml) do vírus da febre amarela quando tratado com o inibidor de MEK/ERK U0126. O efeito do mesmo na replicação, no entanto, foi consideravelmente menor com reduções não chegando a 1-log_{10} (ALBARNAZ et al., 2014).

Os resultados obtidos de coinfeccção comparando-se todos os sorotipos (Figuras 14-17), mostram que o fenômeno de interferência viral, não ocorre entre os sorotipos 2, 3 e 4, no entanto, o sorotipo 1 foi significativamente afetado pela presença dos outros, com redução chegando a até $\sim 2\text{-log}_{10}$ de cópias genômicas dependendo do sorotipo coinfectado. Esse resultado é compatível com aquele observado por VAZEILLE et al., 2016, onde se verificou que a coinfeccção com DENV-4 e DENV-1 resultou em redução na disseminação no intestino médio e não foi detectado na saliva do mosquito.

Os sorotipos 3 e 4 de DENV foram escolhidos para continuar as análises de coinfeccção, visto que não foi observada interferência viral entre os mesmos. Testamos diferentes MOIs, para verificar se a quantidade de células infectadas/coinfectadas inicialmente alteraria de os resultados de coinfeccção, no entanto, não foi observada interferência viral em nenhuma das condições (Figura 22).

Outro ponto importante, é que a coinfeccção analisada no presente trabalho refere-se a coinfeccção da monocamada celular, e não necessariamente da célula individualmente. Não foi possível efetuar experimentos para garantir que cada célula estivesse individualmente coinfectadas, no entanto, o uso de diferentes MOIs, foi utilizado para tentar responder parcialmente a esse questionamento. Alta MOI, teoricamente garante maior probabilidade de as células serem infectadas por mais de uma partícula, logo a alta MOI usada no tópico 5.3 (10 para cada vírus e 20 totais), estaticamente teriam mais células individualmente coinfectadas do que as outras 2 MOIs utilizadas (1 e 0,1). O que podemos deduzir desses resultados, são duas hipóteses diferentes. A primeira é que se não houve diferenças no perfil de coinfeccção, independente da MOI utilizada, pode-se concluir que se as células são individualmente capazes de serem coinfectadas, as condições iniciais do experimento (quantidade de células infectadas/coinfectadas) não são importantes para o resultado final, indicando que ambos os vírus conseguem dispersar-se independente da célula estar previamente infectada ou não. Uma segunda hipótese seria que, independentemente da quantidade de partículas iniciais, uma célula infectada por um dos dois vírus bloquearia a

entrada do segundo, desta forma a vantagem replicativa de um vírus sob o outro seria dependente da velocidade de multiplicação dos mesmos.

Para tentar responder qual hipótese estaria mais correta, decidimos realizar o experimento de superinfecção, com intervalo de 6 horas entre as infecções com o objetivo de verificar se com uma vantagem inicial um vírus conseguiria sobrepor-se ao outro e dessa forma seríamos capazes de observar uma alteração na quantidade de cópias genômicas entre as amostras superinfectadas. Como mostrado na figura 24, não houve diferença significativa entre as amostras superinfectadas, o que torna o resultado compatível com a primeira hipótese de que ambos os vírus são capazes de dispersar-se esteja a célula previamente infectada ou não. Devido ao limitado tempo, não conseguimos realizar superinfecções com intervalos de tempo maiores, que seriam interessantes para mostrar a vantagem temporal do vírus infectado primariamente com relação ao secundário.

Para analisar não só a quantidade de cópias genômicas encontradas no sobrenadante, mas também aquela da monocamada celular, decidimos acrescentar ao protocolo padrão de quantificação, a normalização utilizando o gene HPRT. Essa normalização se mostrou necessária visto que pequenas diferenças nas etapas de infecção e extração de RNA geravam discrepâncias no resultado final da PCR. O uso do normalizador permitiu corrigir essas discrepâncias e foi essencial para uma análise mais precisa dos resultados.

Os resultados expressos em cópias genômicas refletem um perfil de replicação viral, que como podemos observar na figura 21, parece refletir, ao menos em parte, o perfil de multiplicação viral visto por ensaio de placa. Em coinfeção, no entanto, não foi possível efetuar essa comparação, e pudemos apenas estimar que a proporção entre replicação e multiplicação foi a mesma. Seria importante, no entanto, confirmar essa informação, quer seja por ensaio de placa utilizando anticorpos, ou por outras técnicas.

As curvas de multiplicação, tanto de DENV-3 e DENV-4 revelaram que mesmo durante a coinfeção, a multiplicação dos vírus não foi alterada de maneira significativa em nenhum dos tempos analisados. Esses resultados diferem daqueles encontrados em trabalhos anteriores, onde um ou ambos os sorotipos apresentavam uma taxa de replicação e/ou multiplicação entre 10 e 1000 vezes menor (PEPIN et al., 2008; QUINTERO-GIL et al., 2014; VAZEILLE et al., 2016). Esses trabalhos, no entanto, foram feitos sob condições diferentes, em particular utilizando células de mosquito. O hospedeiro naturalmente é um fator crucial para a multiplicação e sobrevivência do vírus, então é esperado que o mesmo também possa

alterar como o vírus reage a uma situação de coinfeção. Em perspectiva, pretendemos realizar a análise feita nesse trabalho, também com células de mosquito, para tentar responder esse e outros questionamentos.

Os resultados da curva de multiplicação de DENV-4 e ZIKV, pudemos observar o fenômeno de interferência viral com a quantidade de equivalentes genômicos de DENV-4 sendo reduzida em $\sim 1 \log 10$ (Figura 28). Assim como o observado com DENV-1, apenas um dos vírus sofreu os efeitos de interferência viral, no caso DENV-4. Com relação ao ZIKV, apenas no tempo de 96 horas foi observado redução no número de EG, e é interessante notar que quando coinfectado o DENV-4 parece demorar mais a alcançar o platô da curva, e não possivelmente o decréscimo no valor de EG de ZIKV possa estar associado ao aumento de DENV-4. Mais experimentos são necessários para elucidar essa questão.

Os testes com os inibidores MEKi-A e MEKi-B apresentaram resultados diferentes do esperado. Em experimentos anteriores do GTS foi observado que na concentração de $20 \mu\text{M}$, o inibidor era capaz de reduzir em 1-2 \log_{10} a multiplicação de DENV. Além disso, no trabalho publicado pelo grupo em 2014 (ALBARNAZ et al., 2014), um outro inibidor de MEK/ERK, o U0126, foi capaz de reduzir a replicação do YFV em até 70% e a multiplicação de flavivírus incluindo DENV-2 e 3 em até 2 \log_{10} . O que observamos, no entanto, é que houve mínima diferença significativa entre os tempos analisados, independente das amostras estarem coinfectadas ou não (Figura 28). Com o inibidor MEKi-B só foi possível analisar até o momento o tempo de 48 horas e assim como com o MEKi-A, DENV-3 não apresentou diferenças significativas entre as amostras tratadas e não tratadas. Para DENV-4, no entanto, pudemos observar que as amostras individualmente infectadas apresentaram uma variação um pouco maior, no entanto, essa variação não foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$) (Figura 29).

Em experimentos feitos utilizando ensaio de placa por outro lado, fomos capazes de observar a redução no título viral de DENV com essa concentração de MEK-1, no entanto, o lote do inibidor foi diferente do utilizado nesse trabalho, o que poderia justificar a ausência de diferença observada na replicação com essa concentração. Para confirmar isso, realizaremos experimentos de ensaio de placa com ambos os vírus isoladamente para confirmar a hipótese. É importante lembrar, que esses IFs têm seu alvo de ação primário na morfogênese viral, logo estabelecer uma correlação entre o número de cópias (equivalentes genômicos) e a titulação viral (UFP/ml) para o tratamento das amostras pode não ser possível.

7–CONCLUSÕES

- ❖ Células VERO são capazes de ser coinfetadas com pelo menos dois sorotipos de DENV sendo observa da interferência viral apenas quando os experimentos foram realizados na presença do DENV-1 versus os sorotipos DENV-3 e DENV-4.
- ❖ Na coinfecção de DENV-3 e DENV-4, não se observa interferência viral, o que foi verificado independente da MOI utilizada, sugerindo que cada célula possa ser coinfetada.
- ❖ Na coinfecção de denv-4 e ZIKV, foi observada interferência viral para denv-3, reduzindo o número de cópias genômicas do mesmo em $1\log_{10}$ nos intervalos de tempo de 24, 48 e 72 horas.
- ❖ Verificou-se uma proporção EG/UFP de 1 para 10000 para DENV-3 e DENV-4.
- ❖ O gene HPRT pode ser utilizado como normalizador para a qPCR, e seu uso na quantificação absoluta minimiza as variações entre amostras biológicas.
- ❖ Durante a coinfecção com DENV-3/4 pôde-se observar que a replicação de ambos os vírus não foi afetada ao longo de toda curva de multiplicação.
- ❖ A superinfecção DENV3/4, no intervalo de 6 horas, também não afeta a replicação dos vírus, sendo estes utilizados na infecção primária ou secundária e vice-versa.
- ❖ O tratamento das amostras com MEKi-A e MEKi-B a $20\ \mu\text{M}$ não foi capaz de reduzir a quantidade de EG em DENV-3 e DENV-4.

8 – REFERÊNCIAS

ADIKARI, T. N. et al. Dengue NS1 antigen contributes to disease severity by inducing interleukin (IL)-10 by monocytes. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 184, n. 1, p. 90–100, 2016.

ADIKARI, T. N. et al. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. **Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases**, v. 78, n. 5, p. x, 147, 2009.

ALBARNAZ, J. D. et al. MEK/ERK activation plays a decisive role in yellow fever virus replication: Implication as an antiviral therapeutic target. **Antiviral Research**, v. 111, p. 82–92, 1 nov. 2014.

ALM, E. et al. One-step real-time RT-PCR assays for serotyping dengue virus in clinical samples. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2015.

ANDRADE, A. A. et al. The vaccinia virus-stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is required for virus multiplication. **The Biochemical journal**, v. 381, n. Pt 2, p. 437–46, 15 jul. 2004.

ANDRADE, E. H. P. et al. Spatial-Temporal Co-Circulation of Dengue Virus 1, 2, 3, and 4 Associated with Coinfection Cases in a Hyperendemic Area of Brazil: A 4-Week Survey. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 1080–1084, 2016.

ARAÚJO, J. M. G. DE J. M. G. DE et al. Origin and Evolution of Dengue Virus Type 3 in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, p. 1–10, 2012.

BAUD, D. et al. An update on Zika virus infection. **www.thelancet.com**, v. 390, n. 4, 2017.

BLITVICH, B. J.; FIRTH, A. E. Insect-specific flaviviruses: A systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. **Viruses**, v. 7, n. 4, p. 1927–1959, 2015.

BONJARDIM, C. A. Viral exploitation of the MEK/ERK pathway – A tale of vaccinia virus and other viruses. **Virology**, v. 507, n. October 2016, p. 267–275, 2017.

CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates , the MAPK-Activated Protein Kinases. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 75, n. 1, p. 50–83, 2011.

CEBALLOS-OLVERA, I. et al. JNK phosphorylation, induced during dengue virus infection, is important for viral infection and requires the presence of cholesterol. **Virology**, v. 396, n. 1, p. 30–36, 2010.

CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Revista de Microbiologia**, v. 44, p. 649–688, 1990.

CHEN, R.; VASILAKIS, N. Dengue-Quo tu et quo vadis? **Viruses**, v. 3, n. 9, p. 1562–1608, 2011.

CHRISTEN, L.; SETO, J.; NILES, E. G. Superinfection exclusion of vaccinia virus in virus-infected cell cultures. **Virology**, v. 174, n. 1, p. 35–42, jan. 1990.

DE LAMBALLERIE, X. et al. Genome sequence analysis of Tamana bat virus and its relationship with the genus Flavivirus. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 10, p. 2443–2454, 2002.

EL HUSSEIN, A. et al. Asynchronous mixed infection of *Culicoides variipennis* with bluetongue virus serotypes 10 and 17. **The Journal of general virology**, p. 3355–62, dez. 1989.

GEIB, T. et al. Selective virus resistance conferred by expression of Borna disease virus nucleocapsid components. **Journal of virology**, v. 77, n. 7, p. 4283–90, abr. 2003.

GRARD, G. et al. Ngoye virus: A novel evolutionary lineage within the genus Flavivirus. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 11, p. 3273–3277, 2006.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 12, p. S7–S16, 2010.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **The Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 453–465, 2015.

KOLCH, W.; ARTICLE, R. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. **Biochem J**, v. 351 Pt 2, p. 289–305,

2000.

KOURI, G. et al. DENGUE HEMORRHAGIC FEVER IN CUBA, 1981: RAPID DIAGNOSIS OF THE ETIOLOGIC AGENT¹. **Bull Pan Am Health Organ**, v. 17, 1983.

KRISHNA, M.; NARANG, H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 22, p. 3525–3544, 2008.

KUNO, G. et al. Phylogeny of the genus Flavivirus. **Journal of Virology**, v. 72, n. 1, p. 73–83, jan. 1998.

LANCIOTTI, R. S.; GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. **Journal of General Virology**, v. 78, n. 9, p. 2279–2286, set. 1997.

LORONO-PINO, M. A. et al. Common occurrence of concurrent infections by multiple dengue virus serotypes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 5, p. 725–730, 1999.

MARUYAMA, S. R. et al. Characterisation of divergent flavivirus NS3 and NS5 protein sequences detected in *Rhipicephalus microplus* ticks from Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 1, p. 38–50, 2014.

MITTAL, R. et al. Zika Virus: An Emerging Global Health Threat. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, n. December, p. 486, 2017.

MOUREAU, G. et al. New insights into flavivirus evolution, taxonomy and biogeographic history, extended by analysis of canonical and alternative coding sequences e0117849. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, 2015.

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

MUSSO, D.; LANTERI, M. C. Emergence of Zika virus: where does it come from and where is it going to? **The Lancet. Infectious diseases**, v. 17, n. 3, p. 255, 1 mar. 2017.

PEPIN, K. M.; LAMBETH, K.; HANLEY, K. A. Asymmetric competitive suppression between strains of dengue virus. **BMC microbiology**, v. 8, p. 28, 2008.

PETERSEN, L. R. et al. Zika Virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1552–1563, 21 abr. 2016.

QUINTERO-GIL, D. C. et al. Differential replication of dengue virus serotypes 2 and 3 in coinfections of C6/36 cells and *Aedes aegypti* mosquitoes. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 7, p. 876–884, 2014.

R., R.-H. MICROEVOLUTION AND VIRULENCE OF DENGUE VIRUSES. v. 4, n. 59, p. 315–341, 2003.

RASMUSSEN, S. A. et al. Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. **New England Journal of Medicine**, p. 1–7, 2016.

SALAS-BENITO, J. S.; DE NOVA-OCAMPO, M. Viral interference and persistence in mosquito-borne flaviviruses. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, 2015.

SANGKAWIBHA, N. et al. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. **American journal of epidemiology**, v. 120, n. 5, p. 653–69, nov. 1984.

SANTIAGO, G. A. et al. Analytical and Clinical Performance of the CDC Real Time RT-PCR Assay for Detection and Typing of Dengue Virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, p. 36–38, 2013.

SCHULZ, F. et al. Giant viruses with an expanded complement of translation system components. **Science**, v. 356, n. 6333, p. 82–85, 7 abr. 2017.

SCREATON, G. et al. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. **Nature Publishing Group**, v. 15, n. 12, p. 745–759, 2015.

SHEPARD, D. S. et al. Economic impact of dengue illness in the Americas. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 200–207, 2011.

SHEPARD, D. S.; UNDURRAGA, E. A.; HALASA, Y. A. Economic and Disease Burden of Dengue in Southeast Asia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 2, 2013.

SHYU, H.-W. et al. The dengue virus envelope protein induced PAI-1 gene expression via MEK/ERK pathways. **Thrombosis and haemostasis**, v. 104, n. 6, p. 1219–27, dez. 2010.

SMIT, J. M. et al. Flavivirus cell entry and membrane fusion. **Viruses**, v. 3, n. 2, p. 160–171, 2011.

SREEKANTH, G. P. et al. SB203580 modulates p38 MAPK signaling and Dengue virus-induced liver injury by reducing MAPKAPK2, HSP27, and ATF2 phosphorylation. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–26, 2016.

SRINIVAS, V. R.; SRINIVAS, V. R. Dengue Fever: a Review Article. **Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences**, v. 4, n. 29, p. 5048–5058, 2015.

VASILAKIS, N. et al. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 532–541, 2011.

VAZEILLE, M. et al. Competitive advantage of a dengue 4 virus when co-infecting the mosquito *Aedes aegypti* with a dengue 1 virus. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2016.

WANG, E. et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. **Journal of virology**, v. 74, n. 7, p. 3227–34, abr. 2000.

WATERMAN, S. H. et al. A Case of Natural Concurrent Human Infection with Two Dengue Viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 34, n. 1, p. 170–173, 1 jan. 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Weekly Epidemiological Report. **World Health Organization**, v. 30, n. 30, p. 349–364, 2016.

YACOUB, S. et al. Cardiovascular manifestations of the emerging dengue pandemic. **Nature reviews. Cardiology**, v. 11, n. 6, p. 335–45, 2014.

YANG, S. H.; SHARROCKS, A. D.; WHITMARSH, A. J. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. **Gene**, v. 513, n. 1, p. 1–13, 2013.