

BRENDA BLEY FOLLY

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DAS INTERAÇÕES ENTRE
PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DO VÍRUS DA DENGUE E
PROTEÍNAS DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS HUMANAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Almeriane M. Weffort Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Luís Roberto Benghi Soares

**CURITIBA
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Aos meus amados pais e irmão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, autor da minha vida, que me deu coragem para enfrentar os desafios, força nos momentos difíceis e persistência e paciência para nunca desistir.

Ao meu orientador Luís Soares, por todos os ensinamentos preciosos que me foram passados, os quais contribuíram enormemente para a minha formação profissional e pessoal. Por ter me ensinado a pensar nas questões científicas de forma diferente, por ter me estimulado a estudar e aprender cada vez mais, sempre me mostrando o lado mais interessante e fascinante da ciência e da pesquisa. Agradeço a ele por ter me recebido de braços abertos há alguns anos atrás quando o procurei com a humilde intenção de que ele fosse meu orientador de mestrado. Desde o início ele me acolheu, acreditou e confiou em mim. Neste período, muitas pedras surgiram no nosso caminho, mas ele nunca desistiu e sempre acreditou, fazendo com que eu o seguisse e também acreditasse que no fim tudo daria certo. E estas pedras nos serviram de degraus para chegarmos onde estamos hoje. Agradeço a ele pela paciência, compreensão e ajuda em todos os momentos. A você, meu querido orientador e amigo, muitíssimo obrigada.

À querida Almeriane, pois apesar de ela sempre dizer que é só a “laranja” da história, sempre me deu sugestões valiosas que contribuíram tanto para a melhoria do trabalho como para o meu crescimento profissional. O meu muito obrigada por ter me aceitado como sua aluna, por ter me tratado sempre com carinho e por estar sempre disposta a me ajudar no que fosse preciso. Agradeço a ela pela ajuda preciosa, não somente, mas principalmente nas etapas finais da dissertação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por proporcionar-me a oportunidade de fazer o mestrado. A Regina, pela atenção dada a mim todas as vezes que a procurei.

Aos meus amados pais, Neusa e Wilson, e ao meu querido irmão, Felipe, por todo apoio, compreensão, amor e paciência comigo durante todo este período. Por serem meu porto seguro, minha base, minha segurança em tudo na vida. Agradeço a eles por sempre terem investido na minha educação e me mostrado a importância do estudo e do conhecimento. Essa etapa cumprida na minha vida é uma vitória nossa.

Ao meu querido namorado, Hadriano, pelo amor e companhia durante este período. Obrigada por ter me ajudado nos momentos em que mais precisei, sempre com muito amor, paciência e carinho.

A todo o pessoal do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, pela ajuda e companhia durante o período em que lá estive fazendo parte do mestrado.

Aos meus queridos colegas do mestrado, pela companhia durante o nivelamento, nas disciplinas, e é claro, em todas as festas que fizemos. E em especial, obrigada a Adélia, a Ivanna, a Paola, a Débora, a Luciane (Gutia), ao Alexandre e ao Rodrigo, pela amizade.

Ao O Boticário, pelo laboratório e pela bolsa concedida no último ano de mestrado.

Ao Carlos Praes, meu chefe do O Boticário, por acreditar e investir em mim.

Aos queridos colegas do Labim, que acompanharam os últimos seis meses do mestrado, sendo estes os momentos mais estressantes e cansativos para mim, sempre apoiaram e ajudaram em tudo que fosse preciso. Conheço-os há pouco tempo, mas todos têm se mostrado pessoas ótimas de conviver e trabalhar. A Luciana, Gisele, Maristela, Flávia, Bruna, Graziela, Tatiana e ao Fernando, muito obrigada pelo carinho, amizade e boas risadas durante todo este período.

A Roberta, minha amiga maravilhosa, dos tempos de faculdade, sempre presente na minha vida, e que acompanhou de perto todas as dificuldades, as conquistas, as tristezas e as alegrias. Obrigada pela sua presença na minha vida e por todo o carinho e atenção que tens comigo. Agradeço por todos os conselhos, pelo incentivo e pela força que sempre me deu.

A todos vocês, os meus mais sinceros agradecimentos.

“O homem que deseja ser cientista e à ciência dedicar seu tempo e amor tem pelo menos três certezas: a de que morrerá um dia (como todo mundo), a de que não ficará rico (como quase todo mundo) e a de que se divertirá muito (como pouca gente).“

Newton Freire-Maia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 DENGUE	1
1.1.1 História e Epidemiologia.....	1
1.1.2 Vírus da Dengue	3
1.1.3 Doença Causada pelo Vírus da Dengue	6
1.1.4 Imunologia da Dengue	8
1.1.5 Biologia e Estrutura do Vírus da Dengue	10
1.1.6 Genoma Viral	13
1.2 INTERAÇÕES PROTÉICAS	19
1.2.1 Princípios da Biologia de Sistemas.....	22
2 OBJETIVOS	30
2.1.OBJETIVO PRINCIPAL	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3 METODOLOGIA	31
3.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA	31
3.2 SÍNTESE E CLONAGEM DAS FITAS DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA) DO VÍRUS.....	31
3.3 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS GENES QUE CODIFICAM AS PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DO VÍRUS.....	32
3.4 ISOLAMENTO DOS RNA MENSAGEIROS (RNAm) DE CÉLULAS DE FÍGADO E CÉREBRO HUMANO	33
3.5 SÍNTESE DAS FITAS DE cDNA DE CÉLULAS DE FÍGADO E DE CÉREBRO HUMANO E CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE cDNA ..	34
3.6 IDENTIFICAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE PROTEÍNAS VIRAIS E HUMANAS PELO MÉTODO DE DUPLO-HÍBRIDO EM BACTÉRIAS.....	34
3.7 ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS OBTIDAS	36
3.8 CONSTRUÇÃO DO INTERATOMA.....	37
3.9 CRUZAMENTOS DOS DADOS DE INTERAÇÕES ENTRE PROTEÍNAS VIRAIS E PROTEÍNAS DE CÉLULAS DE CÉREBRO COM OS DADOS DE EXPRESSÃO GÊNICA UTILIZANDO O PROGRAMA <i>MATISSE</i>	38
3.10 ANÁLISE DO INTERATOMA	39
4 RESULTADOS	41
4.1 SÍNTESE E CLONAGEM DAS FITAS DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA) DO VÍRUS.....	41
4.2 DUPLO-HÍBRIDO E SEQUENCIAMENTO DAS INTERAÇÕES POSITIVAS	42
4.3 CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DO INTERATOMA.....	46
5 CONCLUSÕES	64
6 REFERÊNCIAS	66
7 ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	MAPA DOS PAÍSES E ÁREAS COM RISCO DE TRANSMISSÃO DE DENGUE EM 2007.....	2
FIGURA 2	CLASSIFICAÇÃO DO VÍRUS DA DENGUE.....	4
FIGURA 3	ESQUEMA DO VÍRUS DA DENGUE.....	4
FIGURA 4	CICLO DE TRANSMISSÃO DO VÍRUS DA DENGUE.....	5
FIGURA 5	MECANISMO DE AÇÃO DO FENÔMENO CONHECIDO COMO AUMENTO DA INFECÇÃO DEPENDENTE DA OPSONIZAÇÃO POR ANTICORPOS.....	9
FIGURA 6	ESTRUTURA DO ECTODOMÍNIO DA PROTEÍNA Env NA CONFORMAÇÃO PRÉ-FUSÃO EM pH NEUTRO E PÓS-FUSÃO EM pH ÁCIDO.....	11
FIGURA 7	MECANISMO PROPOSTO PARA AS PROTEÍNAS DE FUSÃO DE CLASSE II VÁLIDO PARA A FUSÃO DAS MEMBRANAS VIRAL E ENDOSSOMAL MEDIADO PELA PROTEÍNA Env DO VÍRUS DA DENGUE.....	12
FIGURA 8	ILUSTRAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO DO GENOMA RNA DO VÍRUS DA DENGUE.....	13
FIGURA 9	ORIENTAÇÃO DAS PROTEÍNAS ESTRUTURAS NA MEMBRANA DO RETICULO ENDOPLASMÁTICO.....	14
FIGURA 10	ESQUEMA DO PROCESSAMENTO DE CLIVAGEM DA POLIPROTEÍNA VIRAL.....	15
FIGURA 11	CICLO DO VÍRUS DA DENGUE NO INTERIOR DA CÉLULA HOSPEDEIRA HUMANA.....	16
FIGURA 12	REPRESENTAÇÕES ESQUEMÁTICAS DAS PRINCIPAIS PROPRIEDADES DAS REDES.....	23
FIGURA 13	PRINCIPAIS DIFERENÇAS ENTRE AS REDES COM E SEM ESCALA.....	26
FIGURA 14	PROGRAMA <i>CYTOSCAPE</i> : REDE DE INTERAÇÕES.....	27
FIGURA 15	SISTEMA DO DUPLO-HÍBRIDO EM BACTÉRIAS.....	35
FIGURA 16	ESQUEMA DO CRUZAMENTO DOS VETORES NO DUPLO-HÍBRIDO.....	37
FIGURA 17	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE COM AS AMPLIFICAÇÕES DOS GENES ESTRUTURAS DO VÍRUS OBTIDOS POR PCR.....	41
FIGURA 18	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE MOSTRANDO A DIGESTÃO DO VETOR pBT [®] CONTENDO OS GENES Cap, prM, M E Env COM AS ENZIMAS EcoRI E XhoI.....	42
FIGURA 19	PLACAS DE CULTURA OBTIDAS NO DUPLO-HÍBRIDO DA PROTEÍNA Cap NAS TRÊS TRIAGENS.....	43

FIGURA 20	EXEMPLO DE UMA DAS ANÁLISES REALIZADAS NO PROGRAMA BLAST	45
FIGURA 21	REDE DE INTERAÇÕES ENTRE AS PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DO VÍRUS DA DENGUE E PROTEÍNAS DE CÉLULAS DE CÉREBRO HUMANO	49
FIGURA 22	REDE DE INTERAÇÕES ENTRE AS PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DO VÍRUS DA DENGUE E PROTEÍNAS DE CÉLULAS DE FÍGADO HUMANO	50
FIGURA 23	CRUZAMENTO DAS REDES DE INTERAÇÕES PROTÉICAS DE FÍGADO E DE CÉREBRO RESSALTANDO AS PROTEÍNAS QUE FORAM ENCONTRADAS EM AMBOS OS DUPLO-HÍBRIDOS.....	52
FIGURA 24	REDE DE INTERAÇÕES PROTÉICAS DA CLUSTERINA: VISTA PARCIAL.....	53
FIGURA 25	PLANILHA PARCIAL ESTRUTURADA COM DADOS DE EXPRESSÃO GÊNICA E DE INTERAÇÕES PROTÉICAS DE CÉREBRO	54
FIGURA 26	PROGRAMA <i>MATISSE</i> : REDE GERADA PELO CRUZAMENTO DE DADOS DE EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS INFECTADAS COM VÍRUS DA DENGUE COM OS DADOS DE INTERAÇÕES PROTÉICAS OBTIDOS NO DUPLO-HÍBRIDO COM cDNA DE CÉLULAS DE CÉREBRO.....	55
FIGURA 27	REDE PARCIAL GERADA NO <i>MATISSE</i> , MOSTRANDO AS DISTINTAS CAMADAS PRESENTES NA REDE.	56
FIGURA 28	REDE PARCIAL CONSTRUÍDA NO PROGRAMA <i>MATISSE</i> E EXPORTADA PARA O PROGRAMA <i>CYTOSCAPE</i>	57
FIGURA 29	PROGRESSÃO DAS CAMADAS DA REDE VISUALIZADA NO <i>CYTOSCAPE</i>	58
FIGURA 30	REDE VISUALIZADA NO <i>CYTOSCAPE</i> RESSALTANDO AS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO MÓDULO FUNCIONAL DA APOPTOSE.....	61
FIGURA 31	BUSCA POR DOMÍNIOS UTILIZANDO A SEQUÊNCIA DA PROTEÍNA DE MEMBRANA DO VÍRUS DA DENGUE.....	62
FIGURA 32	ALINHAMENTO COM MÚLTIPLAS SEQÜÊNCIAS REALIZADO NO PROGRAMA <i>Clustal W</i>	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE SÍNTESE DAS FITAS DE cDNA E NAS AMPLIFICAÇÕES REALIZADAS POR PCR.....	32
TABELA 2	INTERAÇÕES ENTRE AS PROTEÍNAS VIRAIS HUMANAS RESULTANTES DO DUPLO-HÍBRIDO COM CÉLULAS DE CÉREBRO.....	46
TABELA 3	INTERAÇÕES ENTRE AS PROTEÍNAS VIRAIS HUMANAS RESULTANTES DO DUPLO-HÍBRIDO COM CÉLULAS DE FÍGADO.....	47
TABELA 4	PRINCIPAIS FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS HUMANAS QUE INTERGIRAM COM AS PROTEÍNAS ESTRUTURAS DO VIRUS, Cap, Env E prM, NO DUPLO-HÍBRIDO REALIZADO COM CÉLULAS DE CÉREBRO E DE FÍGADO	48

RESUMO

O vírus de Dengue necessita de diversas proteínas da célula hospedeira humana para que possa completar o ciclo de infecção viral. Nas diversas etapas do ciclo, ocorrem interações com diferentes tipos de proteínas da célula. O presente trabalho, utilizando-se de ferramentas de biologia molecular e de bioinformática, teve como objetivo identificar e analisar, pela construção de um interatoma, as interações entre as proteínas do vírus da Dengue e as da célula hospedeira humana, a fim de identificar aquelas essenciais ao ciclo viral e ao desenvolvimento do quadro fisiopatológico da doença. Para tanto, realizou-se o cruzamento entre as proteínas estruturais Capsídeo, pré-Membrana e Envelope do vírus da Dengue, clonadas no vetor pBT, com as bibliotecas de cDNA construídas de células de cérebro e fígado humanos. Os dados obtidos por este cruzamento, assim como as respectivas seqüências, foram analisados e utilizados para alimentar o programa *Cytoscape*, no qual uma rede foi gerada. Análise desta rede permitiu a identificação de proteínas com funções relacionadas à infecção viral da célula, como a Clusterina, envolvida na ativação do sistema complemento e na resposta apoptótica, e das moléculas COX-1, -2 e -3, envolvidas na resposta inflamatória. Subseqüentemente, os dados obtidos no duplo-híbrido foram cruzados com dados de expressão gênica obtidos de células infectadas com o vírus da Dengue no programa *Matisse* e uma segunda rede foi gerada, possibilitando a identificação de módulos funcionais, dentre os quais o da apoptose, de interesse do presente trabalho, visto não ser interessante para o vírus promover apoptose da célula que o abriga, ao menos nos momentos iniciais da infecção. A seqüência das proteínas estruturais do vírus foi analisada, o que possibilitou a identificação de um domínio anti-apoptótico *Bcl-2* na seqüência da proteína de Membrana. Este domínio também foi encontrado na seqüência protéica de outros vírus que apresentam função anti-apoptótica conhecida. A abordagem diferenciada adotada neste trabalho possibilitou não só observar e elaborar hipóteses sobre o modo pelo qual o vírus atua na célula hospedeira após ser infectada, como também abordar, de forma global, aspectos envolvidos nos processos celulares da interação entre o vírus da Dengue e as células humanas, os quais deverão ser biologicamente validados, a fim de comprovar ou refutar sua essencialidade.

Palavras-chave: Vírus da Dengue; Interatoma; Duplo-híbrido; *Cytoscape*; *Matisse*.

ABSTRACT

The Dengue virus uses several of the human host cell proteins to complete the cycle of viral infection. Therefore, during the progressive stages of this cycle, many interactions with different types of cellular proteins take place. The aim of this work, which involved bioinformatics, was to identify and analyse some essential interactions for the virus replication cycle and for the development of the host disease established between the proteins from the Dengue virus and from the human host cells, resulting in a protein interactome. To achieve this, a screening of the in vitro binding between the Dengue virus Capsid, Premembrane and Envelope structural proteins, which were cloned in the pBT vector, and human brain and liver cDNA libraries was performed. The binding data obtained were analysed and the respective protein sequences involved determined. Both results were then used to feed the Cytoscape software in which a network of interacting proteins was generated. Analyses of this network identified proteins with functions related to cellular viral infection, such as Clusterin, involved in the activation of the complement system and cellular apoptosis, and Cox-1, -2 and 3, all involved in the inflammatory response. Subsequently, using the Matisse software, data obtained with the double-hybrid system were matched up against gene expression results obtained from cells infected with the Dengue virus. The network generated allowed the identification of some cellular functional modules, such as the apoptosis one, which is of particular interest in this work as interference in this cellular process is expected given the fact that, at least initially, it is not advantageous for the virus to kill the host cell. Analyses of the structural proteins sequences revealed the presence of a Bcl-2 anti-apoptotic domain in the Membrane viral protein, which has been reported for some other viruses with already known anti-apoptotic activity. The innovative approach used in this study not only allowed the formulation of questions and hypothesis about the way the virus behaves inside cells after infection, but also to speculate, in a more global view, about some of the cellular aspects involved in the relationship between the proteins of the Dengue virus and host cell interaction, which must be biologically validated in the future in order to confirm or refute their essentiality.

Keywords: *Dengue virus; Interactome; Two-hybrid screen; Cytoscape; Matisse.*

1. INTRODUÇÃO

1.1 DENGUE

1.1.1 História e Epidemiologia

Epidemias de uma doença semelhante à febre da Dengue foram, primeiramente, descritas na literatura médica em 1779-80. Entretanto, existem evidências de que uma doença clinicamente compatível tenha ocorrido ainda antes destas datas (RIGAU-PEREZ *et al.*, 1998). A Dengue, ou uma doença muito similar, apresentou ampla distribuição geográfica antes do século XVIII, quando se teve conhecimento da primeira pandemia (GUBLER, 1998).

Durante e após a Segunda Guerra Mundial houve um aumento na ocorrência de arboviroses (doenças transmitidas por artrópodes), e foi neste cenário que uma pandemia global de Dengue teve início. A co-circulação de múltiplos sorotipos do vírus ocorreu em cidades do sudeste da Ásia, bem como o surgimento da Febre Hemorrágica da Dengue (DHF¹). Os primeiros relatos da ocorrência de DHF datam de 1953 em Manila, Filipinas, a qual se espalhou pelo sudeste da Ásia, tornando-se epidêmica na metade da década de 70, sendo considerada a principal causa de hospitalização e morte entre crianças na região. Em 1970, também ocorreram epidemias nas Ilhas do Pacífico e nas Américas (GUBLER, 1998; RIGAU-PEREZ *et al.*, 1998).

Entre as décadas de 50 e 70, o mosquito vetor da Dengue, *Aedes aegypti*, havia sido erradicado da maior parte das Américas Central e Sul e, portanto, epidemias eram consideradas raras. Com a descontinuação dos programas de erradicação em 1970, os mosquitos voltaram a ocorrer nestas regiões. Na década de 90, o *A. aegypti* repovoou quase toda a área geográfica que ocupava antes do início do programa de erradicação. As epidemias da referida doença invariavelmente acompanharam a ressurgência do mosquito vetor. Na década de

¹ As principais abreviações utilizadas no presente projeto serão mantidas na forma original, provindas da língua inglesa, a fim de evitar que o significado destas seja alterado.
DHF = *Dengue Hemorrhagic Fever*.

80, o continente americano sofreu a maior epidemia de Dengue, sendo que, nesta região, a doença havia sido erradicada por períodos que variam de 35 até 130 anos (GUBLER, 1998). Novas cepas e sorotipos do vírus foram introduzidos e, com isso, muitos países tornaram-se hiperendêmicos (presença de múltiplos sorotipos) e epidemias de DHF começaram a surgir. Em 1981, 24 países do continente americano confirmaram casos de DHF. Como ilustra a FIGURA 1, em 2007, o vírus da Dengue e o mosquito vetor *A. aegypti* apresentavam distribuição por toda a região dos trópicos, região endêmica da doença, onde atualmente habitam cerca de 2,5 bilhões de pessoas.

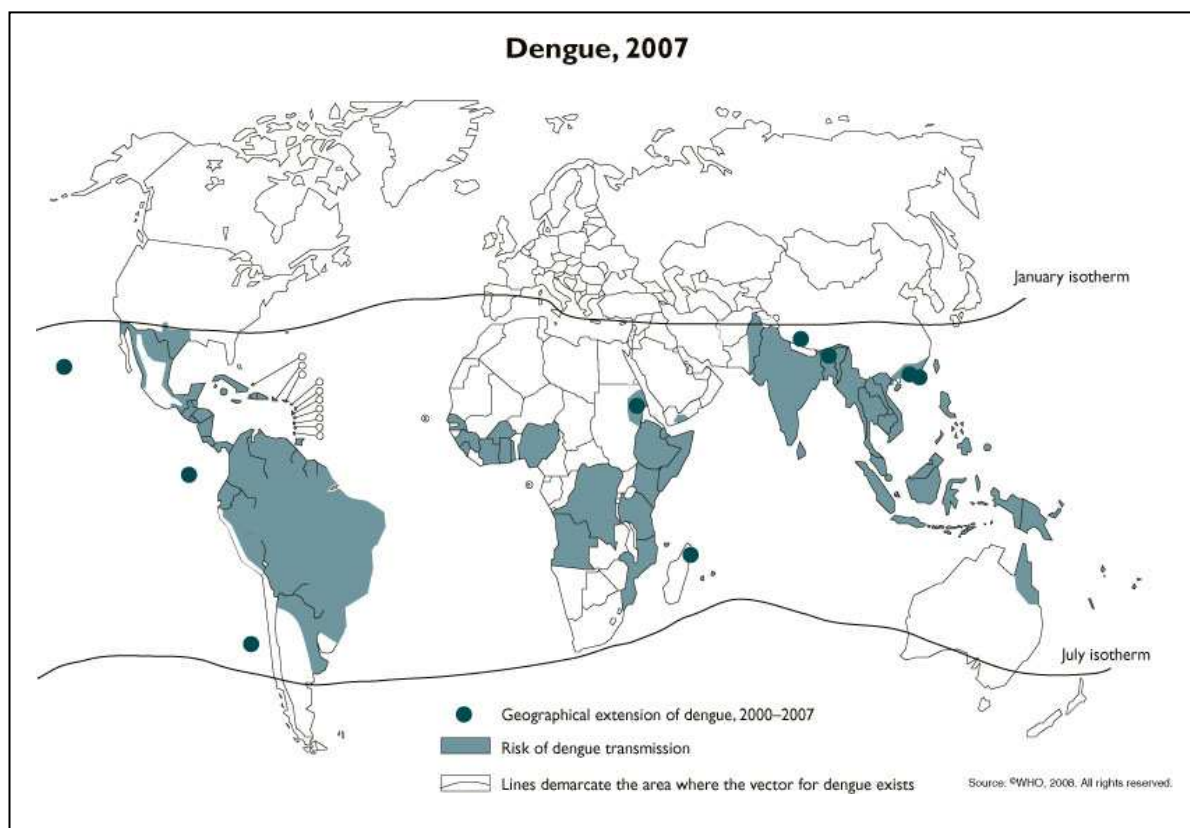


FIGURA 1 – MAPA DOS PAÍSES E ÁREAS COM RISCO DE TRANSMISSÃO DE DENGUE EM 2007. FONTE: <http://www.who.int/ith/en/>

Diversos fatores contribuíram para a ressurgência de epidemias e, também, para o aparecimento da DHF, considerados atualmente um problema global de saúde pública. Entre esses fatores, pode-se citar o grande crescimento da população mundial associado à urbanização das cidades, realizada muitas

vezes sem prévio planejamento e/ou controle. Este fato contribui para a decadência da infraestrutura na saúde pública em diversas regiões, criando com isto condições ideais para o aumento da ocorrência de doenças transmitidas por mosquitos. Outro fator importante está relacionado à falta de controle efetivo do mosquito transmissor *A. aegypti* em áreas endêmicas. Ao contrário, tem ocorrido um aumento na distribuição geográfica e na densidade populacional do mosquito, especialmente em centros urbanos de regiões tropicais, devido ao aumento de *habitat* propício para o desenvolvimento de suas larvas em ambientes domésticos. Outro fator responsável é o aumento da mobilidade humana, principalmente em viagens aéreas, o que possibilitaria o mecanismo ideal para o transporte do transmissor da Dengue e de outros patógenos urbanos. Muitas pessoas que viajam para países tropicais onde a Dengue é endêmica podem ser infectadas e manifestar os sintomas apenas no retorno para casa, resultando em uma constante movimentação dos agentes infectantes, garantindo repetidas introduções de novas cepas virais e novos sorotipos em regiões onde o mosquito vetor ocorre (GUBLER, 1998; RIGAU-PEREZ *et al.*, 1998).

1.1.2 Vírus da Dengue

O vírus da Dengue é um arbovírus pertencente ao gênero *Flavivirus*, família Flaviviridae, a qual inclui aproximadamente setenta diferentes agentes, sendo que cerca de trinta causam doenças ao homem (FIGURA 2). As partículas virais dos flavivírus são esféricas, com aproximadamente 50 nm de diâmetro. Constituem-se de um envelope lipoprotéico, um nucleocapsídeo contendo uma proteína central e um genoma RNA de fita simples positiva (FIGURA 3). Existem quatro sorotipos conhecidos até o momento: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

Os vírus da Dengue são eficientemente transmitidos entre os mosquitos vetores e o homem devido ao alto nível de viremia resultante da infecção em humanos, bem como a replicação viral que ocorre no inseto. A principal espécie transmissora é o mosquito *Aedes aegypti*, apesar de que outras espécies, como o *A. albopictus*, o *A. scutellaris* e o *A. polyniensis*, tenham sido implicadas principalmente na Ásia e na Oceania. Nas Américas não se verificou, até o

momento, a transmissão de Dengue pelo *A. albopictus*. O *A. aegypti* apresenta distribuição nas regiões tropicais e subtropicais e alguns fatores extrínsecos, como chuva, temperatura, altitude, topografia e umidade, condicionam sua sobrevivência. É considerada espécie domiciliada, sendo que sua convivência com o homem é favorecida pela utilização de recipientes artificiais para o desenvolvimento de suas formas imaturas, condição ecológica que torna esta espécie essencialmente urbana (PEREIRA, 2000).

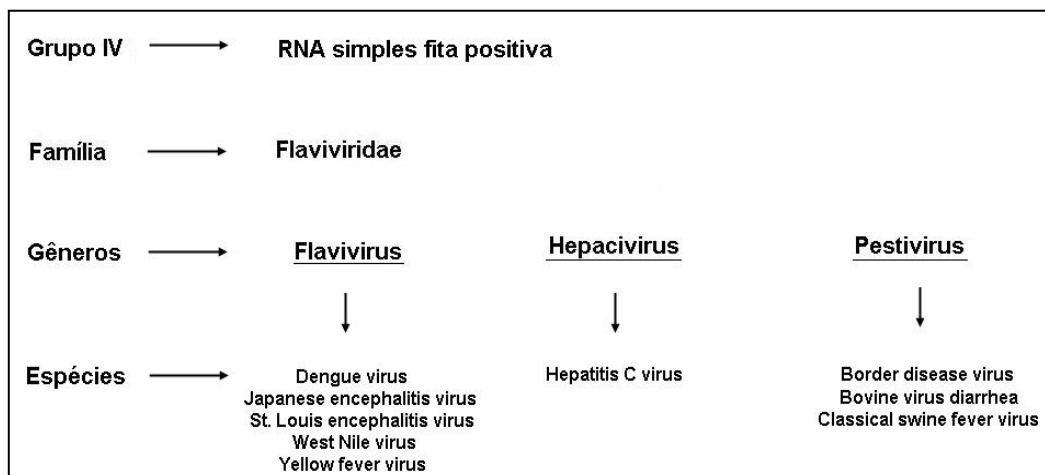


FIGURA 2 – CLASSIFICAÇÃO DO VÍRUS DA DENGUE.

FONTE: http://www.bio-medicine.org/biology-definition/Virus_classification/

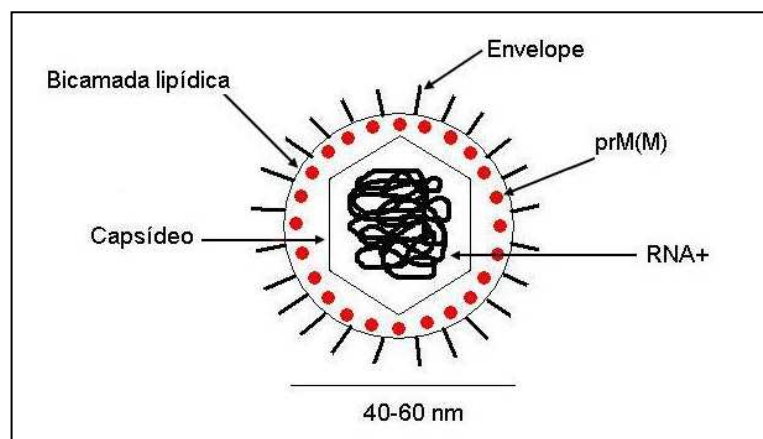


FIGURA 3 – ESQUEMA DO VÍRUS DA DENGUE.

MODIFICADO DE www2.prefeitura.sp.gov.br

Os mosquitos adultos não apresentam grande dispersão. Os machos costumam permanecer próximos aos criadouros, onde ocorre o acasalamento. As fêmeas apresentam hábitos diurnos e, quando grávidas, praticam hematofagia, visto que o sangue humano é essencial para o desenvolvimento dos ovos (FIGURA 4).

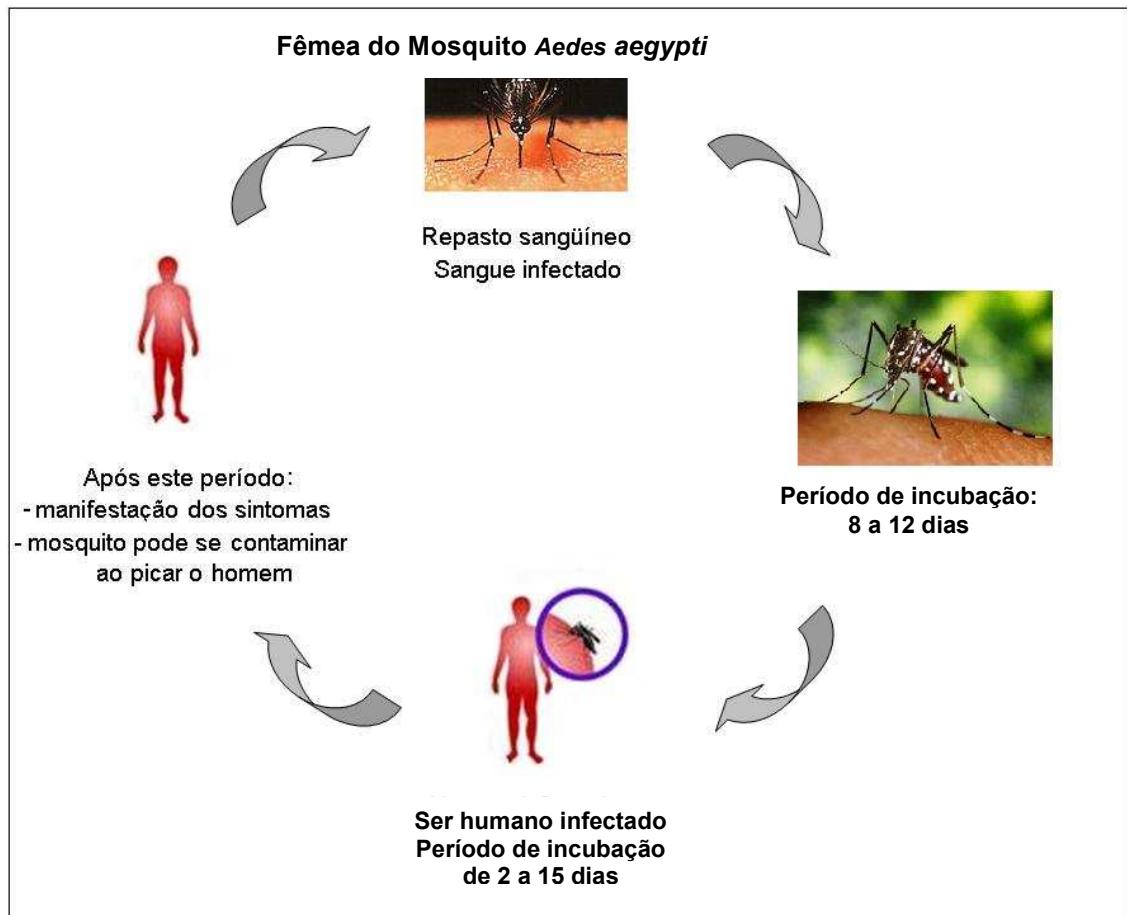


FIGURA 4 – CICLO DE TRANSMISSÃO DO VÍRUS DA DENGUE. O MOSQUITO FÊMEA REALIZA REPASTO DE SANGUE INFECTADO PELO VÍRUS DA DENGUE, NO QUAL DECORRE UM PERÍODO DE INCUBAÇÃO DE 8 A 12 DIAS. PASSADO ESTE PERÍODO, AO SE ALIMENTAR DE SANGUE HUMANO, OS MOSQUITOS INFECTAM O HOMEM. NESTE, O PERÍODO DE INCUBAÇÃO VARIA DE 2 A 15 DIAS QUANDO, ENTÃO, OCORRE A MANIFESTAÇÃO DOS SINTOMAS E O MOSQUITO PODE SE CONTAMINAR AO PICÁ-LO.

O repasto sangüíneo é feito em horários diurnos, com predominância ao amanhecer e próximo ao crepúsculo vespertino. Elas depositam seus ovos em

recipientes contendo água limpa, nas proximidades de áreas domésticas, onde as larvas se desenvolverão. Após a ingestão de sangue infectado, transcorre, no inseto, um período de incubação intrínseca, que pode variar de 8 a 12 dias. Após esse período, as fêmeas tornam-se aptas à transmitir o vírus. A vida média do mosquito *Aedes aegypti* é de 45 dias e, nesse período, um único mosquito pode contaminar até 300 pessoas. Quando o homem é contaminado pela picada do mosquito, o vírus fica incubado de 2 a 15 dias (em média de 5 a 7 dias) em seu organismo. Apenas após esse período é que surgirão os primeiros sintomas da doença. O período em que o mosquito pode se contaminar ao picar um humano infectado vai desde um dia antes de aparecer a febre no homem até seis dias depois da manifestação desta. Fora deste período o mosquito pode picar o homem, mas não irá se contaminar (PEREIRA, 2000).

1.1.3 Doença Causada pelo Vírus da Dengue

A infecção pelo vírus da Dengue causa uma doença cujo espectro inclui desde infecções inaparentes até quadros de hemorragia e choque, podendo levar o paciente a óbito.

A Febre da Dengue (DF)², ou Dengue Clássica, é a manifestação sintomática mais branda da doença, começando com uma febre alta de início súbito, dores de cabeça e no corpo, fraqueza, falta de apetite, dor nos olhos, náuseas, vômitos, coceira, manchas no corpo, dores abdominais e comprometimento das vias aéreas superiores. Acredita-se que, após a inoculação na pele pela picada do mosquito, o vírus replique nas células dendríticas locais e, posteriormente, ocorra infecção sistêmica dos macrófagos e linfócitos, seguida pela entrada do vírus na corrente sanguínea (WHITEHEAD *et al.*, 2007). Após um período de cinco a sete dias, há o término do ciclo infeccioso. Ocorre, então, melhora no quadro da doença, sendo que o indivíduo ficará imunizado para o sorotipo que o infectou. Os pacientes com DF geralmente se recuperam dos

² DF = *Dengue Fever*.

sintomas sem complicações nem seqüelas dentro de dez dias após o início da doença (GUBLER, 1998).

Há um período considerado crítico na doença que, em geral, ocorre após o terceiro dia de infecção. O paciente deixa de ter febre, embora a sensação de cansaço, fraqueza e mal-estar continuem. Esta manifestação pode levar a uma falsa sensação de melhora, porém, em seguida, ocorre piora no quadro clínico do paciente. Podem surgir algumas manchas vermelhas e prurido na pele. Em função da inflamação dos vasos ocasionada pela instalação dos vírus no tecido que os envolve, há um grande consumo de plaquetas. A falta de plaquetas interfere na homeostase do organismo, que passa a apresentar forte tendência hemorrágica. Esta é a típica manifestação da Febre Hemorrágica da Dengue (DHF), a qual apresenta quadro clínico semelhante a DF, porém surgem hemorragias gastrintestinais, cutâneas, gengivais e nasais leves e/ou severas, além de tontura e queda de pressão (KURANE; TAKASAKI, 2001).

Nos casos graves de DHF, a Síndrome do Choque da Dengue (DSS)³ pode ocorrer entre o 3º e o 7º dia de infecção. O choque é decorrente do aumento da permeabilidade vascular seguido de aumento na quantidade de glóbulos vermelhos no sangue e falência circulatória. É de curta duração e pode levar a óbito em 12 a 24 horas ou à recuperação rápida após terapia antichoque apropriada. DHF e DSS são doenças primariamente encontradas em crianças, em áreas hiperendêmicas, nas quais os quatro sorotipos circulam (KURANE; TAKASAKI, 2001).

A Organização Mundial de Saúde classifica a DHF em quatro categorias, sendo grau 1 a menos severa e grau 4 a mais severa. Nos graus 3 e 4, nos quais o vazamento de plasma é acentuado, ocorre DSS. A patogênese da DHF e da DSS é complexa e ainda não é completamente entendida (KURANE; TAKASAKI, 2001).

A encefalopatia também consiste em uma das manifestações mais graves da infecção causada pelo vírus da Dengue. Esta tem sido reportada em 0,5% dos pacientes com DHF e apresenta taxa de mortalidade de 22%. Diversos fatores contribuem para o seu desenvolvimento, incluindo disfunção hepática,

³ DSS = *Dengue Shock Syndrome*.

desequilíbrio eletrolítico, edema cerebral (causado pelas alterações vasculares as quais levam ao extravasamento de fluido), hipoperfusão (devido a distúrbios na circulação) e encefalite. O vírus da Dengue foi isolado do fluido cérebro-espinhal de alguns pacientes que apresentaram características de encefalite. Além disso, em camundongos, foi visto o colapso da barreira hemato-encefálica e a infecção viral direta do cérebro. Estudos sugerem que a histamina deve ter uma função essencial neste processo. Outras manifestações neurológicas, como consciência alterada, ataques de epilepsia, espasmos dos membros, hemiplegia (paralisia de um dos lados do corpo), também foram reportados em 5,4% dos pacientes com Dengue (MALAVIGE, *et al*, 2004).

A patofisiologia dos sintomas neurológicos em casos estudados foi atribuída a edema cerebral, anóxia, hemorragia, hiponatremia, falha hepática, hemorragia microcapilar e a liberação de substâncias tóxicas. Estudos clínicos e em animais sugerem um potencial neurotrófico do vírus da Dengue que poderia justificar os casos de encefalite (CAM, *et al*, 2001).

1.1.4 Imunologia da Dengue

Enquanto a infecção com um sorotipo da Dengue confere proteção imune típica àquele sorotipo, um indivíduo ainda pode ser infectado com sorotipos diferentes. Em um estudo em Bangkok, foi observado que mais de 85% dos pacientes com DHF apresentavam altos níveis de anticorpos contra outros sorotipos do vírus, e supõe-se que isto seja consequência de uma infecção anterior. Tais observações, uma vez amplamente relatadas nas epidemias de Dengue, foram atribuídas ao fenômeno conhecido como aumento da infecção dependente de opsonização por anticorpos (ADE⁴), onde anticorpos preexistentes contra a primeira infecção reagem de forma cruzada com o vírus causador da segunda infecção, levando a um agravamento da doença (FINK; GU; VASUDEVAN, 2006).

Acredita-se que o mecanismo de ação do ADE esteja envolvido na formação de complexos de vírus com anticorpos preexistentes, não

⁴ ADE = *Antibody-dependent enhancement*

neutralizantes, contra um sorotipo diferente do vírus da Dengue; estes complexos se ligariam via porção Fc do anticorpo. As células contendo receptores FcγRI e FcγRII, por sua vez, capturariam estes complexos, internalizando-os via endocitose, e infectariam a célula (FIGURA 5).

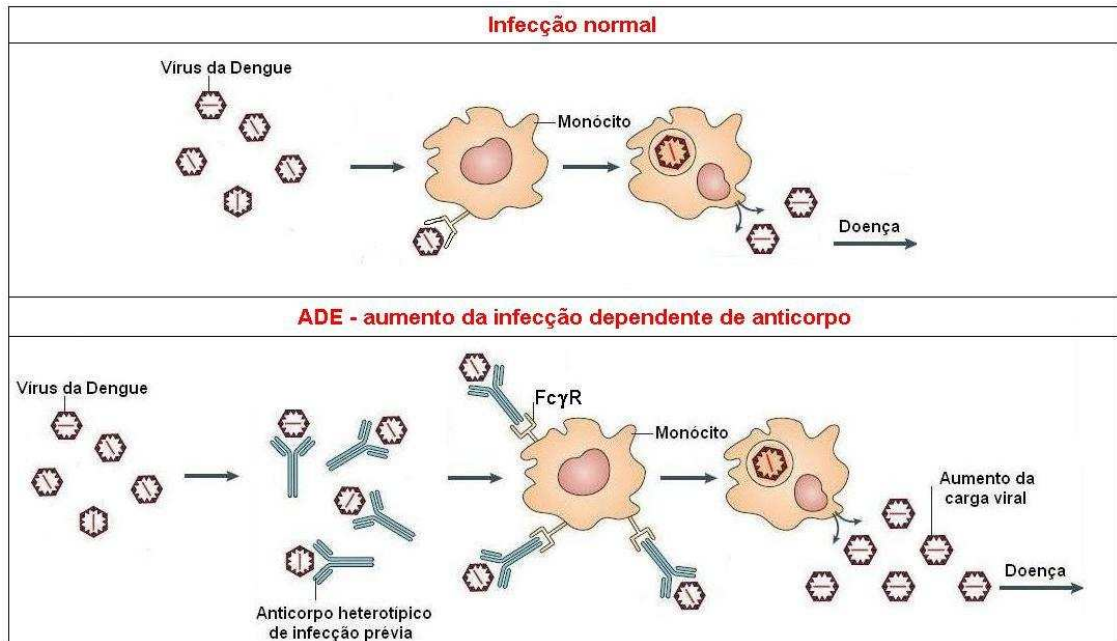


FIGURA 5 – MECANISMO DE AÇÃO DO FENÔMENO CONHECIDO COMO AUMENTO DA INFECÇÃO DEPENDENTE DE OPSONIZAÇÃO POR ANTICORPO (ADE). ADAPTADO DE WHITEHEAD, 2007.

Este processo permite que um amplo número de células sejam infectadas, podendo levar a uma grande carga viral, particularmente no início da infecção. Altos títulos de viremia durante a febre da Dengue são correlacionados ao progresso da DHF na fase final da febre, tendo seu pico dois dias antes da defervescência. No entanto, é relativamente raro que um paciente de Dengue experimente uma segunda infecção que progrida às formas mais severas da doença, o que indica que outros fatores devem atuar na patogênese. Além disso, é provável que nem todos os casos de doenças severas resultem de infecção secundária. De fato, existe uma série de outros possíveis fatores de risco associados a Dengue, incluindo estado nutricional, sexo, idade, estado imune, genética do indivíduo e sorotipo, além da virulência da cepa viral causadora da infecção (FINK; GU; VASUDEVAN, 2006).

Atualmente, a infecção pelo vírus da Dengue causa mais enfermidades e mortes em humanos do que qualquer outra arbovirose. Estima-se que cerca de 100 milhões de casos de febre da Dengue e 500 mil casos de DHF ocorram em todo o mundo anualmente. Dos casos de DHF, cerca de 90% são em crianças com idade inferior a 15 anos (MALAVIGE *et al.*, 2004). Apesar do grande impacto clínico e econômico do vírus da Dengue, não existem ainda vacinas ou terapias específicas para a prevenção ou o tratamento da infecção.

1.1.5 Biologia e Estrutura do Vírus da Dengue

O processo de infecção inicia-se pela ligação da partícula viral a um receptor celular de superfície (FIGURA 6). Acredita-se que o vírus interaja inicialmente com células dendríticas, conhecidas como células de Langerhans, as quais têm se mostrado mais permissivas à infecção. Estas células expressam o receptor DC-SIGN⁵, ao qual se liga a proteína viral do Envelope (Env), que contém sítios de ligação ao receptor e um peptídeo responsável pela fusão entre as membranas viral e celular (WU *et al.*, 2000). Este receptor interage especificamente com os resíduos de carboidrato na proteína Env e medeia a entrada do vírus na célula por endocitose, permitindo a invasão. Embora outros receptores foram descritos, como sulfato de heparina, Hsp70, Hsp90, GRP78/BiP e CD14, a interação mais bem caracterizada é entre o vírus e o receptor DC-SIGN (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005), a qual mostra um amplo espaço na superfície do vírus para a ligação de um co-receptor, como demonstrado por microscopia crio-eletrônica (POKIDYSHEVA *et al.*, 2006).

Estudos recentes sugerem que a entrada do vírus via endocitose envolva dois ou mais receptores: um receptor comum, de baixa afinidade, como o DC-SIGN, que inicialmente capturaria o vírus na superfície celular aumentando a concentração local; e outro, menos comum, mas de alta afinidade, que possibilitaria a internalização da partícula (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

⁵ DC-SIGN = *Dendritic cell specific ICAM grabbing non-integrin*

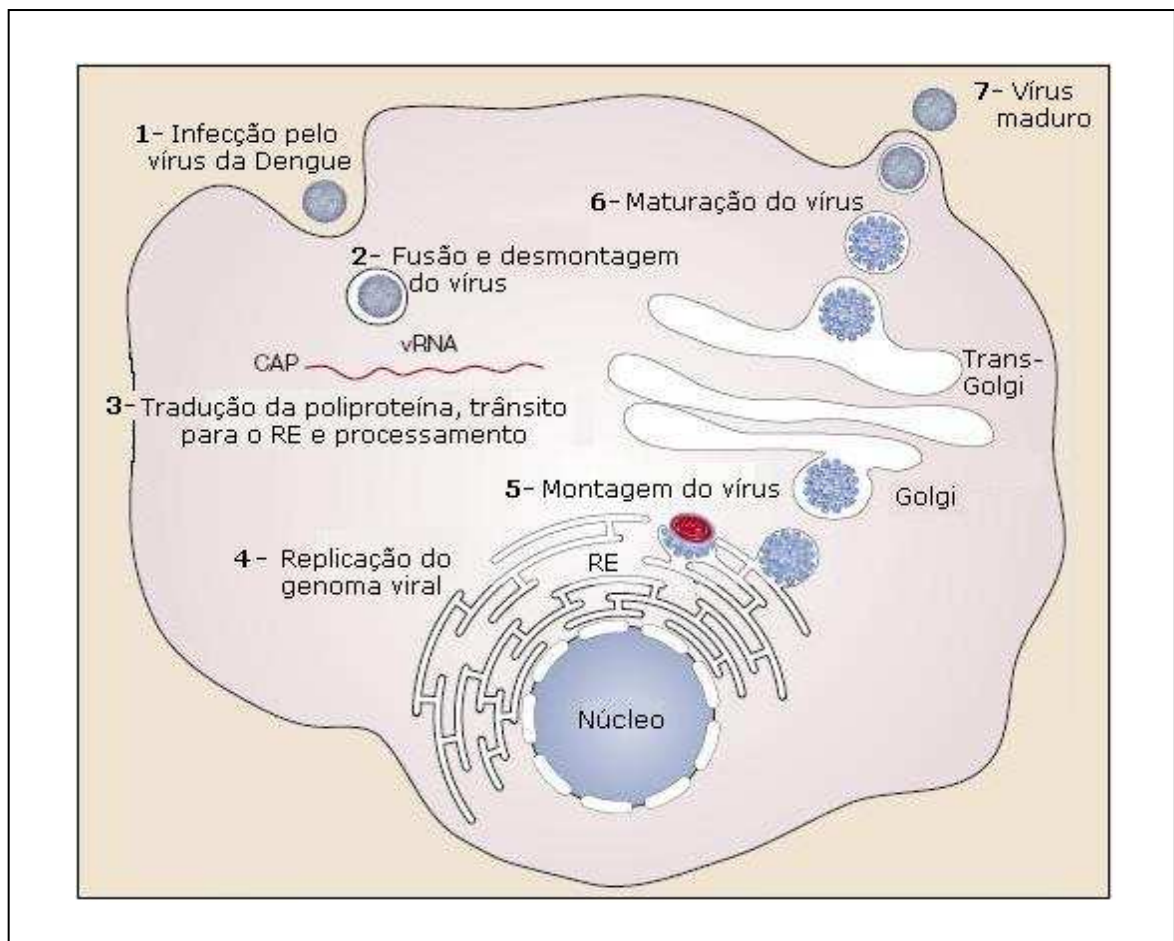


FIGURA 6 – CICLO DO VÍRUS DA DENGUE NO INTERIOR DA CÉLULA HOSPEDEIRA HUMANA. **1** – ENTRADA DO VÍRUS NA CÉLULA PELA LIGAÇÃO A RECEPTORES E SUBSEQUENTE INTERNALIZAÇÃO VIA ENDOCITOSE. **2** – FUSÃO DAS MEMBRANAS ENDOSSOMAL E VIRAL, E DESMONTAGEM DO VÍRUS COM LIBERAÇÃO DO GENOMA VIRAL NO CITOPLASMA. **3** – TRADUÇÃO DA POLIPROTEÍNA COM INÍCIO NO CITOPLASMA, CONTINUAÇÃO E PROCESSAMENTO NO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO (RE). **4** – REPLICAÇÃO VIRAL NO RE. **5** – O INÍCIO DA MONTAGEM DE NOVAS PARTÍCULAS VIRAIS OCORRE NO RE E PROSEGUE PARA O GOLGI. **6** – MATURAÇÃO VIRAL NAS CISTERNAS DO GOLGI. **7** – EXOCITOSE DAS NOVAS PARTÍCULAS VIRAIS MADURAS. ADAPTADO DE MUKHOPADHYAY, 2005.

Após a ligação da glicoproteína Env aos receptores de superfície celular, a partícula viral é internalizada em um compartimento endossomal. Na partícula viral madura, Env ocorre na forma de homodímeros, com o peptídeo de fusão inacessível. Sob as baixas condições de pH encontrada nos endossomos,

os homodímeros da proteína Env se dissociam em monômeros e, em seguida, se re-associam formando trímeros irreversíveis. Estruturas feitas por cristalografia de raios-X da proteína Env em pH ácido (representando a estrutura de pós-fusão) mostraram um arranjo trimérico, com longas dimensões da proteína Env posicionadas aproximadamente paralelas umas às outras, e com o peptídeo de fusão exposto na extremidade do trímero (FIGURA 7) (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005) e (MODIS *et al.*, 2003).

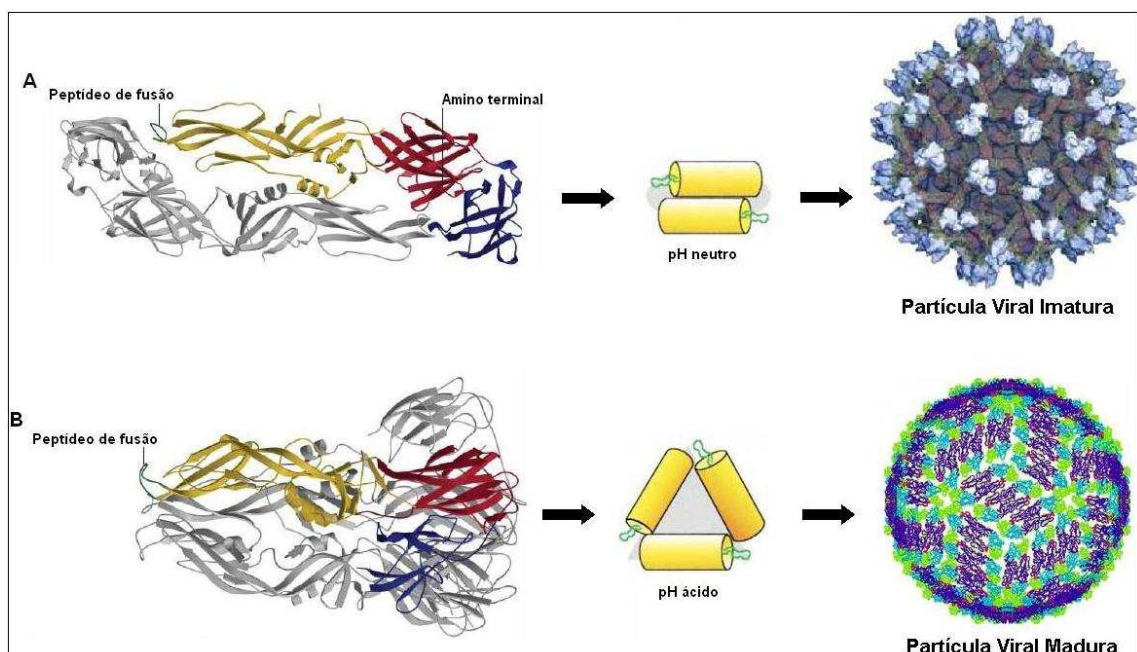


FIGURA 7 – ESTRUTURA DO ECTODOMÍNIO DA PROTEÍNA Env. NA CONFORMAÇÃO PRÉ-FUSÃO EM pH NEUTRO (A) E NA CONFORMAÇÃO PÓS-FUSÃO EM pH ÁCIDO (B). ADAPTADO DE KUHN, 2002; MUKHOPADHYAY, 2005.

No processo de fusão desta proteína, o trímero da proteína Env estende-se em direção à membrana do endossomo, e o peptídeo de fusão se insere nesta. A proteína de fusão Env fica ancorada nas membranas celular e viral. Quando as duas membranas lipídicas se fundem, o domínio transmembrana e o peptídeo de fusão de Env ficam próximos. A fusão da membrana do endossomo e da partícula viral possibilita a desmontagem da partícula viral e liberação do genoma no

citoplasma da célula hospedeira (FIGURA 8) (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

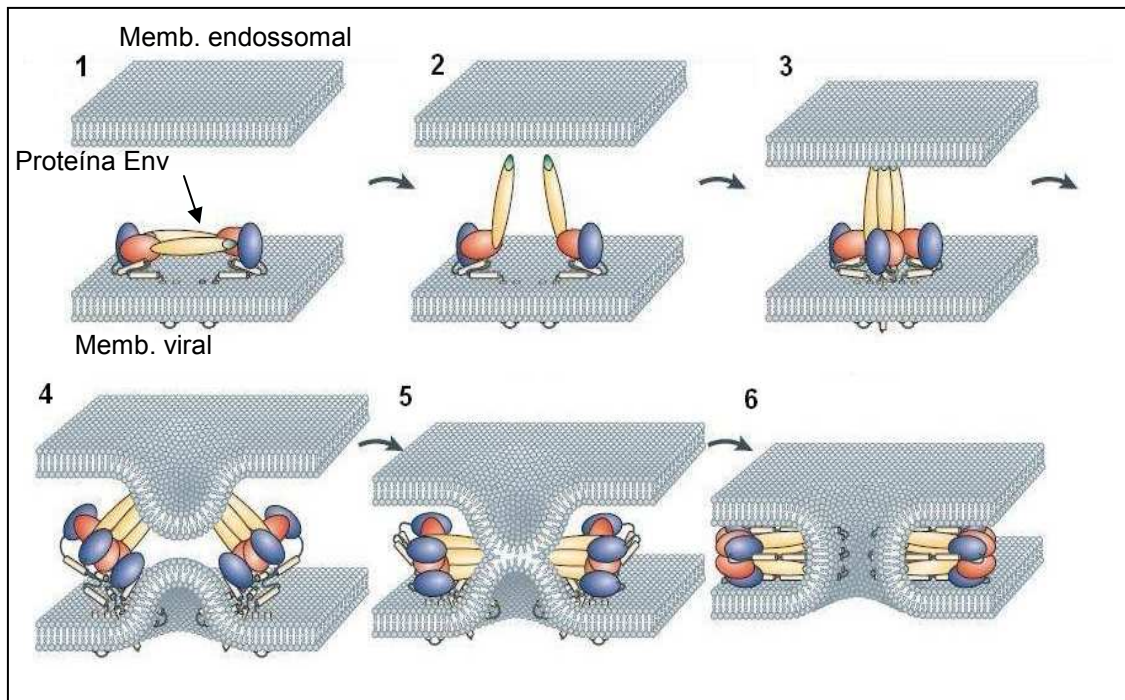


FIGURA 8 – MECANISMO PROPOSTO PARA AS PROTEÍNAS DE FUSÃO DE CLASSE II VÁLIDO PARA A FUSÃO DAS MEMBRANAS VIRAL E ENDOSSOMAL, MEDIADO PELA PROTEÍNA Env DO VÍRUS DA DENGUE. ADAPTADO DE MUKHOPADHYAY, 2005.

1.1.6 Genoma Viral

O genoma RNA do vírus da Dengue, com aproximadamente 11 kb, contém um *cap* 5' do tipo 1 (7-metil guanossina), uma região 5' não traduzida (UTR⁶), uma única fase aberta de leitura (ORF⁷), que codifica apenas uma poliproteína, e uma região 3' UTR, que não é poliadenilada, diferentemente da maioria dos RNAm celulares. A ausência da cauda poli-A indica que o vírus não utiliza o mesmo mecanismo de tradução que os RNAs celulares. As regiões não traduzidas do

⁶ UTR = *Untranslated region*

⁷ ORF = *Open reading frame*

genoma, nas porções amino- e carboxi-terminais, são cruciais para a iniciação e regulação da tradução, replicação e montagem do vírus (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

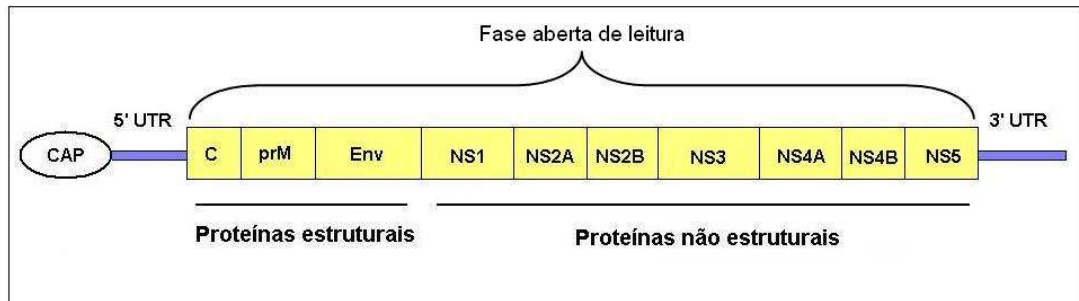


FIGURA 9 – ILUSTRAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO DO GENOMA RNA DO VÍRUS DA DENGUE: CAP NA REGIÃO 5', EXTREMIDADE 5' UTR, FASE ABERTA DE LEITURA DO GENOMA MOSTRANDO AS PROTEÍNAS ESTRUTURAIIS E NÃO ESTRUTURAIIS DO VÍRUS, EXTREMIDADE 3' UTR NÃO POLIADDELINADA. ADAPTADO DE STEPHEN, *et al*, 2007.

Visto que a maquinaria de replicação viral não se encontra empacotada na partícula viral, o primeiro evento realizado pelo vírus no citoplasma das células é a tradução do seu genoma. Uma pequena parte do polipeptídeo é sintetizada, com isto o complexo proteína-RNA-ribossomal nascente se liga ao retículo endoplasmático (RE), onde a tradução e processamento da poliproteína continuam. A região 5' do genoma codifica três proteínas estruturais que constituem o vírus maduro: capsídeo (Cap), membrana (M) e envelope (Env). Entretanto, a membrana é primeiramente expressa na forma precursora, prM, constituinte das partículas virais intracelulares imaturas. Inicialmente, as partículas imaturas são formadas no lúmen do RE. Estas, que contém as proteínas Env e prM, membrana lipídica e nucleocapsídeo, não podem induzir fusão na célula do hospedeiro, sendo desta forma não infecciosas (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

A proteína estrutural Cap contém uma seqüência hidrofóbica de sinalização na porção C-terminal que transloca prM do seu sítio na superfície do RE para dentro do lúmen (FIGURA 10). A proteína prM possui dois domínios transmembrana, os quais contém uma seqüência de parada de transferência e

uma de sinalização. Como resultado, a proteína Env também é transportada para dentro do lúmen do RE.

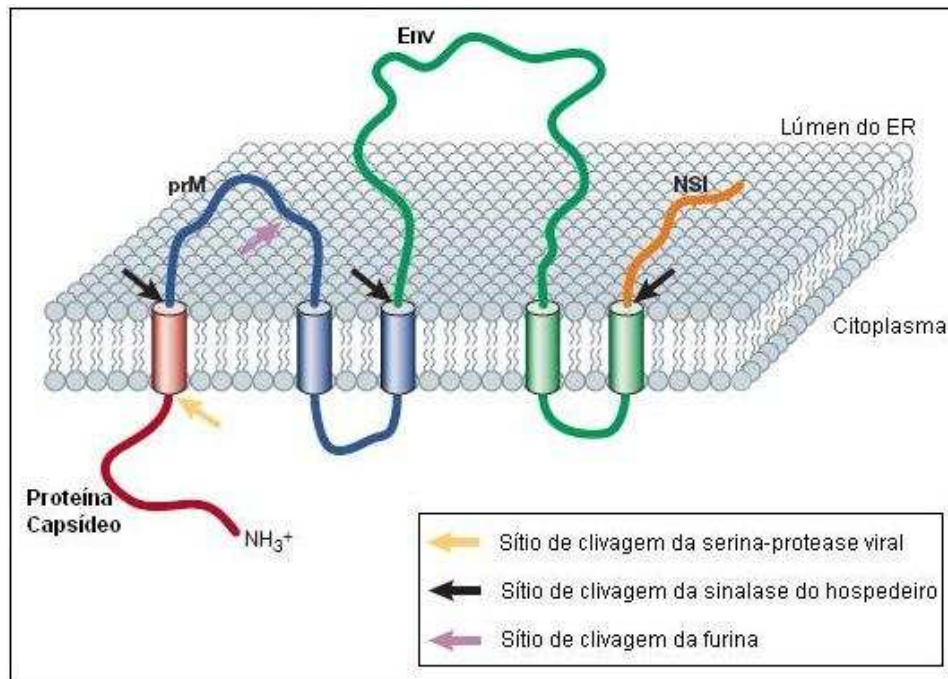


FIGURA 10 – ORIENTAÇÃO DAS PROTEÍNAS ESTRUTURAIS NA MEMBRANA DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO. AS SETAS INDICAM OS SÍTIOS DE CLIVAGEM PÓS-TRADUCIONAL. ADAPTADO DE MUKHOPADHYAY, 2005.

Após a clivagem proteolítica apropriada, a proteína Cap e o RNA viral ficam localizados na porção citoplasmática, sendo que a proteína Cap permanece associada à membrana do RE. No lúmen, prM e Env formam um heterodímero estável em poucos minutos de tradução (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). A proteína Cap está envolvida no empacotamento do genoma viral, na formação do nucleocapsídeo e, também, auxilia na estabilidade da proteína Env.

Acredita-se que prM proteja a proteína Env da reorganização induzida pelo pH ácido e da fusão prematura durante a secreção da mesma. A prM possivelmente atua como chaperona, auxiliando no dobramento e na montagem desta proteína. O evento de maturação de prM é necessário para expor o domínio de ligação ao receptor da proteína Env e, desta forma, é necessário para a

formação da partícula viral infectante (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006). A clivagem proteolítica de prM durante a maturação viral é realizada por proteases celulares, como as proteínas furinas, resultando na formação da proteína M. A clivagem ocorre na face *trans* das cisternas do aparato de Golgi, onde as partículas são secretadas, evento este que precede a saída do vírus da célula. A formação de M a partir de prM parece ser o evento crucial para a maturação viral, resultando no aumento da capacidade infectante e na reorganização estrutural da superfície viral (HENCHAL; PUTNAK, 1990). A FIGURA 11 ilustra de forma esquemática, a posição das proteínas do vírus da Dengue e seus sítios de clivagem.

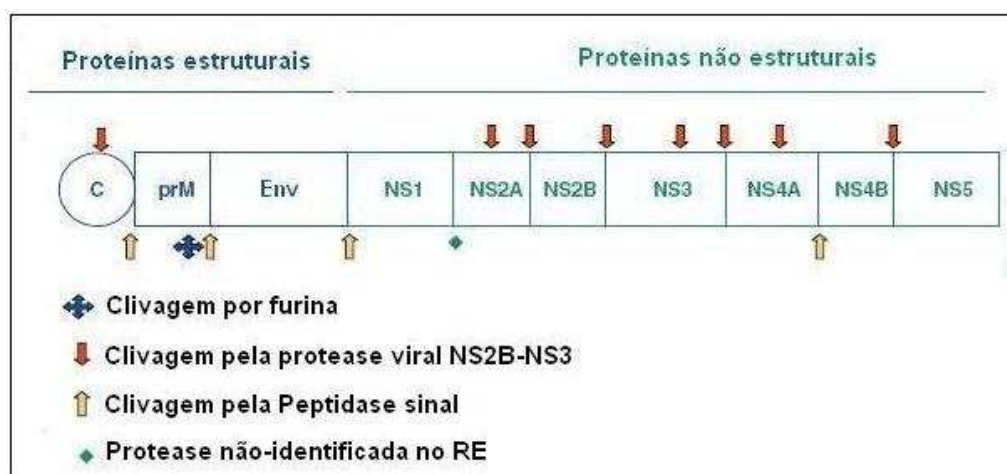


FIGURA 11 - ESQUEMA DO PROCESSAMENTO DE CLIVAGEM DA POLIPROTEÍNA VIRAL. ADAPTADO DE MELINO, 2007.

Estudos recentes mostram que a regulação eficiente desta clivagem é essencial para a replicação viral. Por exemplo, havendo um aumento moderado da clivagem, ocorre uma melhora na capacidade infectante do vírus, porém há também uma redução na habilidade do vírus de escapar da célula infectada, resultando na retenção ou na fusão prematura do mesmo com a rede do aparato de Golgi, levando a uma redução geral do título viral (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

As funções de M na partícula viral madura ainda não são conhecidas. A glicoproteína Env, como dito anteriormente, medeia a ligação do vírus a receptores de superfície da célula hospedeira, definindo assim o tropismo primário

do vírus. As proteínas Env são diferencialmente glicosiladas de acordo com o sorotipo e com a célula na qual o vírus é propagado. Esta glicosilação está associada com a ligação ao receptor e com a fusão endossomal. A glicoproteína Env é, também, o principal alvo da resposta imunológica do tipo humoral (FINK; GU; VASUDEVAN, 2006).

As outras regiões do genoma codificam cinco proteínas não estruturais denominadas NS1⁸, NS2, NS3, NS4, e NS5. Após a tradução da poliproteína, ocorre sua clivagem por meio de proteases virais e celulares (MELINO; PACI, 2007), como pode ser visto também na FIGURA 11.

As proteínas não-estruturais estão envolvidas em diferentes funções do ciclo da replicação viral. A glicoproteína NS1 é expressa em três formas: residente no retículo endoplasmático, ancorada à membrana e secretada (sNS1). Observou-se que esta proteína co-localiza-se com o complexo de replicação viral, o que sugere que NS1 seja necessária ao processo de replicação do genoma. NS1 é glicosilada em dois sítios e acredita-se que esta glicosilação seja necessária para a replicação viral nas células do mosquito vetor (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

A proteína NS2 é primeiramente clivada em duas subunidades, NS2A e NS2B, que são pequenas moléculas hidrofóbicas associadas a membranas celulares. A primeira é necessária na coordenação da replicação do RNA e auxilia no empacotamento do genoma. NS2B atua como co-fator de NS3, a serina-protease do vírus, formando um complexo ativo (MELINO; PACI, 2007).

NS3 é uma proteína multifuncional, com um domínio protease na porção N-terminal, uma atividade RNA helicase no domínio central, um domínio NTPase estimulado por RNA e um domínio RNA trifosfatase, ambos na porção C-terminal. A atividade RNA trifosfatase contribui na formação da estrutura *cap* no RNA, possivelmente auxiliando na defosforilação da extremidade 5' não traduzida do RNA viral, antes da adição desta estrutura. As atividades NTPase e RNA helicase auxiliam na síntese do RNA viral. A função de serina-protease da NS3, juntamente com seu co-fator NS2B, é essencial para a clivagem da poliproteína e para a replicação do vírus (MELINO; PACI, 2007).

⁸ NS = *Nonstructural proteins*

NS4, assim como NS2, é clivada em duas subunidades, NS4A e NS4B, as quais também são pequenas proteínas hidrofóbicas associadas a membranas. Suas funções ainda não são bem conhecidas, porém, estas proteínas foram localizadas em sítios de replicação de RNA e de montagem da partícula viral. Recentemente, foi visto que NS4B, e em menor extensão NS2A e NS4A, são capazes de bloquear a transdução de sinal mediada pelo interferon γ (IFN γ). Embora as três proteínas em combinação sejam mais efetivas, NS4B sozinha é um potente inibidor da sinalização de IFN β e γ (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

NS5 é a proteína mais conservada entre os flavivírus. Caracteriza-se por uma atividade metiltransferase na porção N-terminal, por também ser essencial no processamento da estrutura *cap*, e por uma atividade RNA polimerase dependente de RNA na porção C-terminal, necessária para replicação do genoma viral (MELINO; PACI, 2007).

Após o processamento das proteínas virais, a maioria das proteínas não-estruturais se associa a região 3' não traduzida do genoma, formando um complexo de síntese de RNA (FINK; GU; VASUDEVAN, 2006). Na replicação do genoma que ocorre em membranas do RE, uma fita de RNA negativa é primeiramente produzida. Esta é usada como molde para a produção de cópias de fitas de RNA positivas (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006). A montagem do vírus ocorre na superfície do RE, quando as proteínas estruturais e o RNA recentemente sintetizado brotam no lúmen da organela (ver FIGURA 6). Os vírus maduros e as partículas subvirais são liberados da célula hospedeira por exocitose (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

O genoma viral, como já visto, codifica diversas proteínas necessárias para o ciclo do vírus da Dengue na célula. O vírus também interage com diversas proteínas da célula hospedeira humana, porém não se tem conhecimento detalhado dessas interações, mas sabe-se que as proteínas celulares participam em diferentes etapas no ciclo viral, como, por exemplo, na clivagem da poliproteína. Conhecer e estudar as interações que ocorrem entre as proteínas virais e as celulares é de extrema importância.

Neste contexto, é interessante citar o vírus HPV, que interage com algumas proteínas humanas, sendo estas interações necessárias para eficiente infecção. Neste sentido, cerca de 85% dos carcinomas cervicais humanos

possuem seqüências de DNA do vírus HPV, e os genes virais E6 e E7 são regularmente expressos nestes cânceres. Em infecções por HPV-16 e HPV-18, observa-se que a proteína E6 é capaz de se ligar a proteína supressora de tumor p53, e a proteína E7 interage com proteínas como pRB e p107. Mutações nos genes produtores destas proteínas em células germinais causam retinoblastoma congênito (MOLÉS, *et al*, 1994). A interação de E6 com a p53 induz a degradação da p53 por uma via ubiquitina dependente de ATP. Acredita-se que a formação de complexos com pRB e p53 previne que estas desempenhem suas funções celulares normais e ainda seja responsável, pelo menos em parte, pelas propriedades de transformação de vários oncogenes virais (SCHEFFNER, *et al*, 1992).

1.2 INTERAÇÕES PROTÉICAS

A grande maioria das proteínas não atua isoladamente e, sim, de forma conjunta com outras proteínas. Sendo assim, os processos biológicos devem ser considerados como redes de componentes interconectados (VIDAL, 2005).

Ter conhecimento das proteínas essenciais para o funcionamento de uma rede é de grande importância para compreender o funcionamento global de um sistema (KOHN, 1999; DARTNELL *et al.*, 2005). Da mesma forma, conhecer as interações que ocorrem entre as proteínas do vírus da Dengue e as humanas poderá facilitar o entendimento do ciclo viral, bem como a compreensão do quadro da doença em humanos, gerando alvos potenciais de agentes terapêuticos.

As interações que ocorrem entre as proteínas, entre proteínas e DNA, e proteínas e RNA são cruciais para a maioria dos processos biológicos. Centenas de milhares de proteínas e outras macromoléculas são expressas em uma célula, mediando milhares de interações físicas constantemente, possibilitando a formação das maquinarias moleculares e a participação destas moléculas em diferentes processos celulares. Desta forma, é essencial considerar as proteínas como redes de interações, que atuam de forma integrada, onde a função de uma

irá interferir na ação da outra, formando um sistema complexo que rege as funções celulares de maneira integrada (BREITKREUTZ; STARK; TYERS, 2003). Portanto, se faz necessário utilizar uma abordagem holística, na qual o comportamento e a função da rede correspondente são analisados como um todo (GE; WALHOUT; VIDAL, 2003).

A noção de interatoma, definida como o conjunto de interações físicas mediadas por todas as proteínas de um organismo, reflete uma drástica mudança na maneira como os pesquisadores têm formulado questões fundamentais, sendo estas focadas cada vez mais nestes complexos sistemas de redes moleculares (VIDAL, 2005). A biologia de sistemas é um campo emergente que busca justamente o entendimento dos processos biológicos em nível sistêmico, através da integração de conjuntos de dados obtidos por diferentes metodologias (KITANO, 2002b).

Ao contrário da biologia molecular, que estuda as moléculas que compõem as células, como proteínas e cadeias de ácidos nucleicos, a biologia de sistemas concentra-se em conjuntos que reúnem os componentes moleculares. Embora os sistemas sejam compostos de matéria, a sua essência está na dinâmica, a qual não pode ser descrita pela enumeração dos seus componentes. Ao mesmo tempo, é equivocado acreditar que apenas a estrutura de um sistema, como a topologia de uma rede de interações, por exemplo, possa fornecer respostas às questões biológicas formuladas (KITANO, 2002b).

Para isso, é necessário que a devida atenção seja dada à diversidade e funcionalidade dos componentes que atuam de maneira integrada. Fazendo uma analogia, identificar todos os genes e proteínas presentes em um organismo é como relacionar todas as peças necessárias para a montagem de um avião. Enquanto a lista de peças fornece um catálogo completo dos componentes individuais necessários para que a máquina funcione, ainda não é suficiente para compreender a complexidade da engenharia da aeronave em questão. Ou seja, é necessário saber como é feita a montagem destas partes na formação da estrutura do avião, de que forma estas partes atuam, com quais outras elas se relacionam *etc.*, para que eventualmente se possa entender o seu funcionamento (KITANO, 2002b).

O mesmo ocorre com uma célula viva. Pode-se catalogar todas as suas moléculas, genes e proteínas, conhecer suas funções, mas, ainda assim, não nos sentimos totalmente competentes e capazes de entender o funcionamento global da célula. Este é o objetivo da biologia de sistemas. As estruturas e os componentes de um sistema desempenham funções indispensáveis na formação e funcionamento deste como um todo (KITANO, 2002a).

Avanços na área de biologia molecular, bem como o progresso na determinação de seqüências do genoma humano e de diversos outros organismos, trouxeram consigo relevante conhecimento sobre os sistemas biológicos. Neste contexto, questões como a robustez destes sistemas, a estrutura e dinâmica das estruturas de rede e sua aplicação na descoberta de novas drogas vêm sendo ativamente investigadas. A biologia de sistemas encontra-se, ainda, em sua infância, o que permite o desenvolvimento de estudos utilizando abordagens inovadoras a fim de responder questões diversas, bem como propiciar o entendimento mais abrangente a respeito dos sistemas biológicos (KITANO, 2002a; 2002b).

Projetos vêm sendo desenvolvidos atualmente nas áreas da genômica, a ciência que estuda o genoma completo de um organismo, e da proteômica, que analisa as estruturas, as funções, e as interações entre proteínas. As metodologias utilizadas em ambas são geralmente realizadas em larga escala, resultando em uma quantidade imensa de dados. No estudo das interações que ocorrem entre proteínas, técnicas como duplo-híbrido e co-imunoprecipitação, por exemplo, têm sido amplamente utilizadas. A quantidade de informação gerada por tais técnicas torna inexecutável a análise manual dos dados. Para obter significado biológico, descrever conclusões significativas e gerar hipóteses testáveis a partir destes conjuntos de dados é necessário a utilização de ferramentas de bioinformática. Assim, o uso de computadores tornou-se obrigatório como ferramenta auxiliar na extração de informações biologicamente relevantes (BELL; LEWITTER, 2006).

No presente trabalho, as interações que ocorrem entre as proteínas do vírus da Dengue e as proteínas das células hospedeiras humanas são o alvo de estudo. A análise dos dados de interações resultantes foi auxiliada pela utilização de programas de bioinformática que permitiram a visualização de redes de

interação entre as proteínas estudadas, como será exposto na seção de Resultados e Discussão.

1.2.1 Princípios da Biologia de Sistemas

Um sistema de elementos que interagem ou regulam uns aos outros pode ser representado por uma ferramenta matemática chamada “rede” ou “grafo”. As interações protéicas, portanto, podem ser representadas desta forma (ALBERT, 2005).

As redes têm sido utilizadas como uma representação matemática essencial de dados. Pode-se pensar em uma rede como um conjunto de elementos chamados “nós”, representando as proteínas, os quais são ligados a outros nós por “arestas” ou “linhas”, as quais representam as interações (BELL; LEWITTER, 2006). As linhas podem ou não ser direcionadas, especificando um ponto de partida e um ponto alvo final. As direcionadas são adequadas para a representação do fluxo de material de um substrato para um produto em uma reação, ou o fluxo de informação de um fator de transcrição para um gene cuja transcrição é regulada por este. Linhas não direcionadas são utilizadas para representar interações mútuas, como as que ocorrem entre proteínas (BARABASI; OLTVAI, 2004; ALBERT, 2005). A FIGURA 12 ilustra as principais propriedades das redes de interações.

Os nós de uma rede podem ser caracterizados pelo número de linhas que possuem (o número de nós adjacentes a eles), esta propriedade é denominada grau do nó (*node degree*⁹). Em redes direcionadas, é possível distinguir o número de linhas que chegam até o nó, o grau de entrada (*in-degree*) e o número de linhas que partem do nó, o grau de saída (*out-degree*). Apesar do grau do nó caracterizá-lo individualmente, é possível usar o grau de distribuição (*degree distribution*) para quantificar a diversidade da rede como um todo (BARABASI; OLTVAI, 2004; ALBERT, 2005).

⁹ Pelo fato de que as expressões utilizadas na denominação dos componentes de rede, e de suas características, provêm da língua inglesa, e que muitas destas não possuem denominação adequada na língua portuguesa, serão utilizadas no presente trabalho expressões em ambas as línguas, a fim de evitar que o significado destas seja alterado.

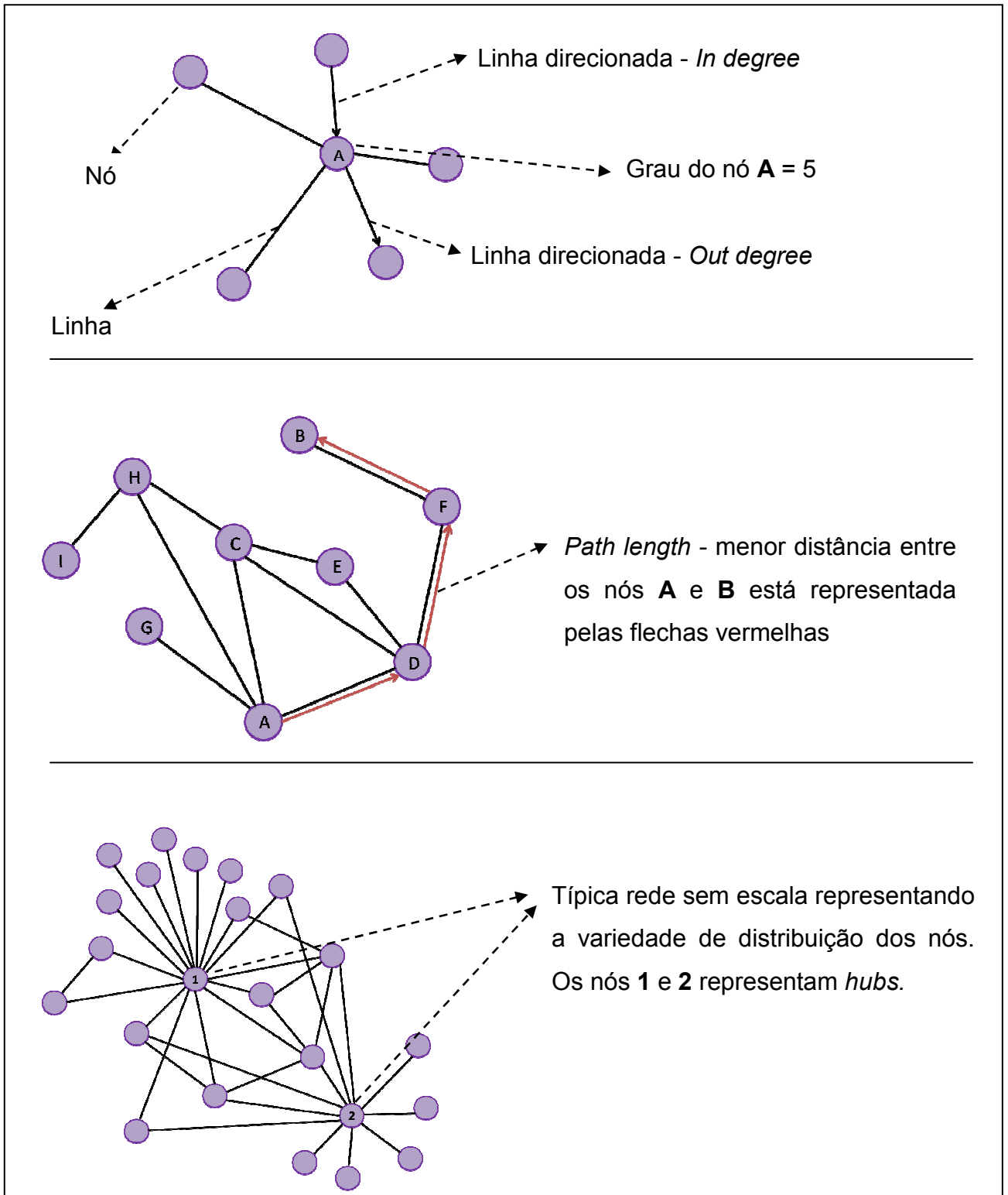


FIGURA 12 – REPRESENTAÇÕES ESQUEMÁTICAS DAS PRINCIPAIS PROPRIEDADES DAS REDES.

O grau de distribuição, $P(k)$, fornece a fração de nós que possui determinado grau k , o qual é obtido pela contagem do número de nós $N(k)$ que possui este determinado grau ($k = 1, 2, 3\dots$) e dividindo este pelo número total de nós N . O grau de distribuição de diversas redes, como a Internet ou as redes de colaboração humana ou mesmo as redes metabólicas, segue uma distribuição definida como $P(k) = Ak^{-\gamma}$, conhecida como lei de potenciação (*power law*). Nesse caso, A é uma constante que assegura que o valor de $P(k)$ adicionado é igual a 1, e o expoente de grau γ está geralmente na ordem $2 < \gamma < 3$ (BARABASI; OLTVAI, 2004; ALBERT, 2005).

Esta função indica que há grande diversidade nos graus dos nós e não há nós típicos na rede que possam ser usados para caracterizar todos os outros nós. Em outras palavras, indica que a maioria das proteínas interage com poucas proteínas, e que apenas algumas proteínas interagem com diversas outras proteínas. Estas são também chamadas *hubs*, e tendem a ser as mais essenciais. A ausência de um grau típico (ou escala típica) descreve tais redes como sem escala (BELL; LEWITTER, 2006).

A aderência da vizinhança de um nó i é geralmente quantificada pelo coeficiente de agrupamento (*clustering coefficient*), C_i , definido como a razão entre o número de linhas ligando os nós adjacentes a i , e o número total possível de linhas entre eles. Em outras palavras, o coeficiente de agrupamento irá quantificar quão perto a vizinhança local de um nó está sendo parte de um *clique*, uma região da rede (uma sub-rede) onde todos os nós estão conectados entre si (BARABASI; OLTVAI, 2004; ALBERT, 2005).

Várias redes, incluindo as de interação entre proteínas e as metabólicas, mostram uma média alta do coeficiente de agrupamento, a qual indica um alto nível de redundância e aderência. O cálculo da média do coeficiente de agrupamento dos nós que têm o mesmo grau k fornece a função $C(k)$, que caracteriza a diversidade de aderência da vizinhança local. Várias medições indicam uma diminuição no $C(k)$ nas redes metabólicas e nas redes de interação entre proteínas, seguindo a relação $C(k) = Bk^\beta$, onde B é uma constante, e β está entre 1 e 2. Isto sugere que os nós com um grau baixo tendem a pertencer à vizinhança com alta aderência, enquanto os nós com alto grau tendem a ter

vizinhos que são menos conectados uns aos outros (BARABASI; OLTVAI, 2004; ALBERT, 2005).

Dois nós de uma rede são conectados se uma seqüência de nós adjacentes os liga, chamada via (*path*). Uma via pode, portanto, significar uma rota de transformação de um nutriente para um produto final em uma rede metabólica, ou uma cadeia de reações pós-traducionais de um sentido de um sinal para seu alvo em uma rede de transdução de sinais. A distância entre dois nós da rede (*graph distance*), também conhecida como comprimento da via (*path length*), é definida como o menor número de linhas que os conecta ao longo da via (BARABASI; OLTVAI, 2004; ALBERT, 2005).

Na maioria das redes observadas, a maioria dos nós não é vizinho próximo de outros, porém estes podem alcançar uns aos outros passando por poucos nós. Ou seja, existe uma via relativamente curta entre dois nós, e essa via corresponde na ordem logarítmica ao tamanho da rede. Tal propriedade, chamada de área restrita (*small world*), caracteriza as redes mais complexas, incluindo as metabólicas e as de interações entre proteínas. Esta é uma propriedade muito importante que garante uma reação rápida e eficiente quando há perturbações da rede (BARABASI; OLTVAI, 2004; ALBERT, 2005).

Uma característica chave das redes complexas sem escala (*scale free*) é a robustez, que se refere a habilidade do sistema em responder a mudanças nas condições externas ou na organização interna enquanto mantém o comportamento relativamente normal da rede como um todo (FIGURA 13) (BARABASI; OLTVAI, 2004). Esta organização, em geral, cria um sistema relativamente imune a defeitos em componentes individuais. Acredita-se que o rompimento da arquitetura da rede esteja relacionado com o desenvolvimento de doenças. A perda de múltiplos componentes, como ocorre em diversas formas de câncer, por exemplo, é necessária para o colapso da rede.

Esta arquitetura deve explicar, em parte, a observação de que múltiplas mutações são freqüentemente requeridas para a carcinogênese. Apesar disso, algumas regiões da rede devem ser mais vulneráveis a rompimento do que outras. Mutações que resultem na perda da atividade e que afetem *hubs* têm maior probabilidade de provocar defeitos do que aquelas que afetam a periferia da rede. Além disso, acredita-se que mutações que afetam os principais

reguladores das atividades de *hubs* reguladores principais apresentam maior probabilidade de causar defeitos aparentes em processos celulares ou de desenvolvimento do que aqueles que ocorrem em outros locais da rede (ZHU; GERSTEIN; SNYDER, 2007).

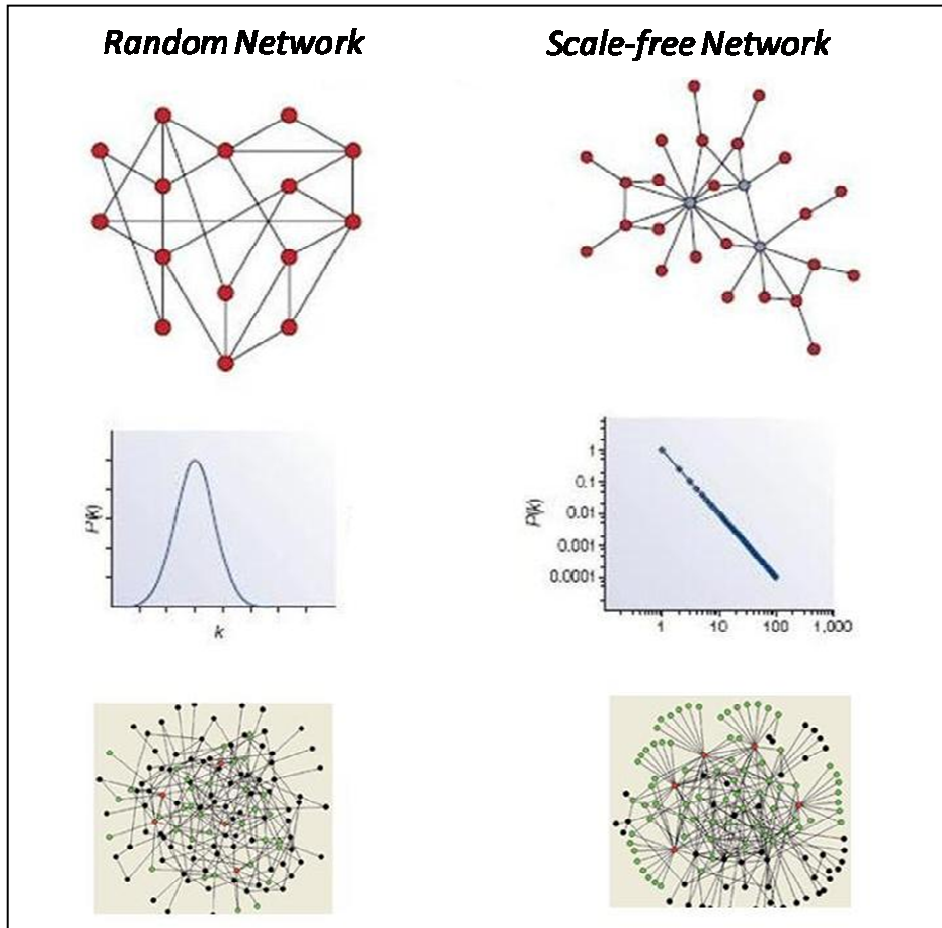


FIGURA 13 – PRINCIPAIS DIFERENÇAS ENTRE AS REDES COM E SEM ESCALA. AS REDES COM ESCALA (*RANDOM NETWORK*) APRESENTAM DISTRIBUIÇÃO NORMAL DOS NÓS, OU SEJA, A MAIORIA DELES APRESENTA GRAU DE DISTRIBUIÇÃO SIMILAR. JÁ AS REDES SEM ESCALA (*SCALE FREE NETWORK*) APRESENTAM GRANDE VARIEDADE NO GRAU DE DISTRIBUIÇÃO DOS NÓS, SENDO QUE A MAIORIA POSSUI POUCAS INTERAÇÕES, E POUCOS NÓS POSSUEM MUITAS INTERAÇÕES (*HUBS*). ADAPTADO DE BARABASI; OLTVAI, 2004

A análise de redes biológicas é uma maneira efetiva de descrever grupos de moléculas altamente inter-relacionadas, como genes e proteínas, por exemplo. Programas como o *Cytoscape*, por exemplo, são ferramentas poderosas que têm auxiliado aos pesquisadores visualizar, filtrar e explorar conjuntos de dados volumosos. Estas ferramentas contribuem para extrair informações biológicas a partir da análise de uma determinada rede. Tais programas permitem a fácil inserção e manipulação de dados, flexibilidade na representação dos nós e linhas de acordo com suas propriedades, e uma série de algoritmos para criar diferentes *layouts* gráficos. Juntamente com outras ferramentas para a análise de expressão e interação, estes programas podem ajudar a gerar hipóteses que descrevam a relação funcional entre genes e proteínas presentes em conjuntos de dados complexos (BELL; LEWITTER, 2006).

O programa *Cytoscape*, cuja aparência ilustra a FIGURA 14, foi desenvolvido em plataforma Java e está disponível gratuitamente para a comunidade científica no sitio eletrônico <http://cytoscape.org/>.

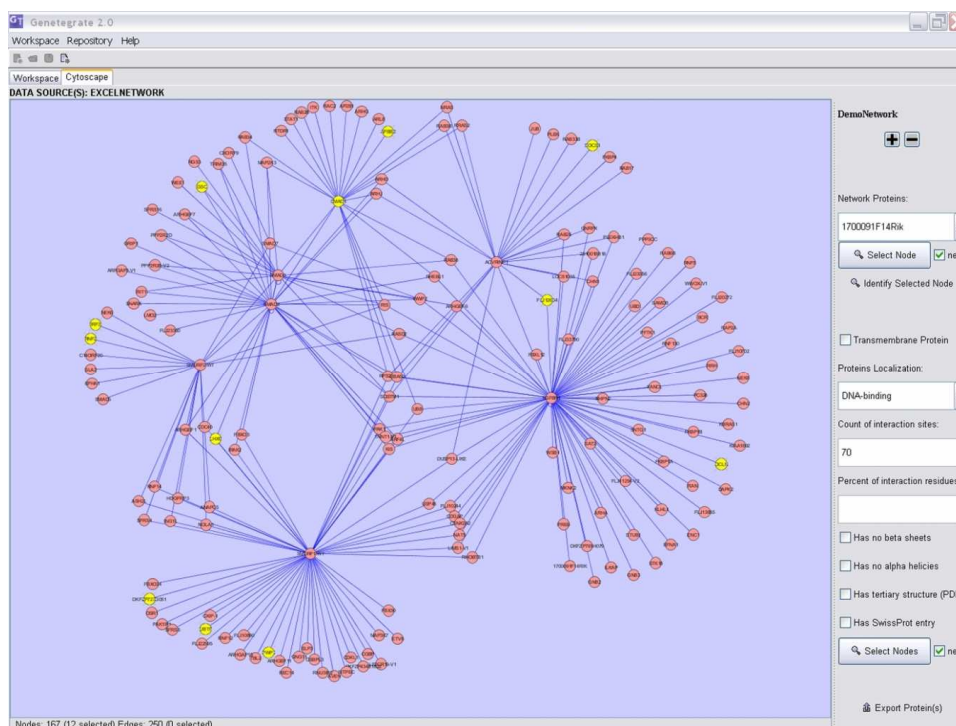


FIGURA 14 – PROGRAMA CYTOSCAPE: REDE DE INTERAÇÕES.
FONTE: SHANNON, 2003.

Consiste em um programa para a visualização de redes de interação molecular e integração destas interações com o perfil de expressão gênica em larga escala; além de outros tipos de dados moleculares em modelos unificados.

Embora seja aplicável a qualquer sistema de componentes e interações moleculares, o *Cytoscape* é mais potente quando usado em conjunto com grande quantidade de dados de interações entre proteína-proteína, proteína-DNA e interações gênicas, cujos dados estão cada vez mais disponíveis para humanos e organismos modelos de estudo. Características adicionais estão disponíveis como *plugins*. Estes estão disponíveis para redes e análises de perfil molecular, novos *layouts*, suporte para formatos de arquivos adicionais e conexões com bancos de dados. É possível adicionar dados próprios e construir redes de interação molecular a partir de arquivos de dados brutos que contenham listas de pares de interações como proteína-proteína ou proteína-DNA (SHANNON *et al.*, 2003).

Já o programa *Matisse* (*Module Analysis via Topology of Interactions and Similarity Sets*) permite o cruzamento de dados de interações protéicas com dados de expressão gênica obtidos pela técnica de microarranjo. O método utilizado por este programa busca módulos funcionais através da identificação de sub-redes conectadas aos dados de interação que exibem alta média de similaridade interna. A probabilidade de que um gene/proteína tenha sido atribuído a um determinado módulo funcional ao acaso é analisada, e então um valor estatístico para esta probabilidade é fornecido. A base estatística deste programa esta relacionada com o algoritmo os “vizinhos próximos” (*immediate neighbors* ou *best neighbors*), ou seja, ele examina a função dos genes/proteínas adjacentes, aqueles presentes na próxima camada da rede, e cruza com as funções dos genes/proteínas da camada anterior. Com isso, o programa analisa a probabilidade de que os genes da camada mais interna tenham sido atribuídos ao acaso a um determinado módulo funcional. Deste forma é possível identificar alterações na rede mais facilmente, bem como analisar as conseqüências de tais alterações (ULITSKY; SHAMIR, 2007).

As interações entre proteínas são de extrema importância para virtualmente todos os processos em uma célula viva. No presente projeto, foram estudadas as interações que ocorrem entre as proteínas do vírus da Dengue e as proteínas da célula hospedeira humana usando como instrumento de produção de

dados a bioinformática, com a finalidade de se visualizar estas interações de forma globalizadas e, assim, obter maior entendimento dos mecanismos da doença, bem como servir de base para novas abordagens terapêuticas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

O presente trabalho tem, como objetivo principal, construir um interatoma, com a finalidade de identificar e analisar interações que ocorrem entre as proteínas do vírus da Dengue e as proteínas de células hospedeiras humanas, evidenciando aquelas que possam ser potenciais alvos farmacológicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar proteínas do vírus da Dengue.
- Construir uma biblioteca de cDNA humano usando RNAm de células hepáticas e células de cérebro.
- Identificar as interações entre as proteínas estruturais do vírus e as proteínas humanas pelo método de duplo-híbrido em bactérias.
- Construir o interatoma utilizando programas de visualização de redes e analisá-lo com dados da literatura.
- Realizar o cruzamento dos dados obtidos no duplo-híbrido com dados de expressão gênica obtidos pela técnica de microarranjo de DNA.
- Analisar o interatoma, visando identificar interações essenciais para o ciclo viral e/ou para o desenvolvimento do quadro fisiopatológico da doença.

3. METODOLOGIA

3.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA

Neste trabalho foi utilizada a cepa do vírus da Dengue tipo 2 (DEN2) Thailand/16681/84. O RNA total desta cepa viral foi cedido gentilmente pelo Centro de Controle de Doenças para a Universidade de Stanford, Califórnia. A caracterização da cepa foi descrita em detalhe por KINNEY *et al.*, 1997. Para a construção das bibliotecas de DNA complementar (cDNA), foram utilizados RNA mensageiros isolados de células de fígado e cérebro humanos, obtidos comercialmente da empresa Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA).

3.2 SÍNTESE E CLONAGEM DAS FITAS DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA) DO VÍRUS

O RNA total da cepa viral DEN2 foi usado para sintetizar as fitas de DNA complementar, utilizando o método *SuperScript III*[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), como brevemente descrito a seguir. Todos os oligonucleotídeos utilizados no desenvolvimento deste projeto estão descritos na Tabela 1. Com base na extremidade 3' não traduzida do genoma RNA do vírus, o oligonucleotídeo iniciador 3' RNA (R) foi desenhado e utilizado na síntese da primeira fita de cDNA, juntamente com a enzima *SuperScript III*[®]. Oligonucleotídeos desenhados com base na seqüência da fase aberta de leitura do genoma foram utilizados a fim de excluir as regiões 5' e 3' não traduzidas. Estes foram usados na reação de amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR). Os fragmentos amplificados foram clonados nos vetores pCR4Blunt-TOPO[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), para a estocagem, e pTRIEX[®] (Novagen), que permite a utilização futura para a produção da poliproteína viral e de replicons em células de insetos, de mamíferos e em bactérias.

TABELA 1 – INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE SÍNTESE DAS FITAS DE cDNA E NAS AMPLIFICAÇÕES REALIZADAS POR PCR.

INICIADORES	SEQÜÊNCIAS
3' RNA (R)*	5' - GAACCTGTTGATTCAACAGCACC - 3'
Env (F)	5' - GAATTCAATGCGTTGCATAGGAATGTCAAAT - 3'
Env (R)	5' - CTCGAGGGCCTGCACCATGACTCCCAAATA - 3'
Cap (F)	5'- GAATTCAATGAATAACCAACGGAAAAAGGCG - 3'
Cap (R)	5' - CTCGAGCGCCATCACTGTTGGAATCAGCAT - 3'
prM (F)	5' - GAATTCATTCCATTTAACCACACGTAACGGAGAA - 3'
prM (R)	5' - CTCGAGTGTCATTGAAGGAGTGACAGCTGT - 3'
M (F)	5' - GAATTCATCAGTGGCACTCGTTCCACATGTG - 3'
M (R)	5' - CTCGAGTGTCATTGAAGGAGTGACAGCTGT - 3'
pBT (F)	5' - TCC GTT GTG GGG AAA GTT ATC - 3'
pBT (R)	5' - GGG TAG CCA GCA GCA TCC - 3'
pTRG (F)	5' - CAG CCT GAA GTG AAA GAA - 3'
pTRG (R)	5' - ATT CGT CGC CCG CCA TAA - 3'

* (R): *reverse*; (F): *forward*

3.3 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS GENES QUE CODIFICAM AS PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DO VÍRUS

Uma única poliproteína é codificada pelo genoma viral, a qual é posteriormente clivada em proteínas funcionais. As regiões que codificam as proteínas estruturais do vírus foram amplificadas utilizando oligonucleotídeos iniciadores desenhados com base na seqüência do genoma da cepa de DEN-2 (Tabela 1). Na seqüência dos iniciadores *Forward* foi adicionado o sítio da enzima de restrição EcoRI (GAATTC), e na seqüência dos iniciadores *Reverse*, foi adicionado o sítio da enzima de restrição XhoI (CTCGAG). Estes sítios possibilitaram a clonagem dos fragmentos amplificados no vetor pBT® (Stratagene, San Diego, EUA) utilizado no duplo-híbrido. Para a amplificação dos genes que codificam as proteínas Cap, Env e prM, foi usada a enzima de alta fidelidade *Pfu* (Stratagene, San Diego, EUA). As especificações descritas do

manual do fabricante foram seguidas, sendo preparado um volume final de reação de 50 μ l. O seguinte ciclo de PCR foi utilizado:

- | | | |
|-------------------|---|-----|
| 1) 95°C – 2' | | |
| 2) 95°C – 30" | } | 8X |
| 3) 57°C – 30" | | |
| 4) 72°C – 1kb/min | | |
| 5) 95°C – 30" | | |
| 6) 62°C – 30" | } | 22X |
| 7) 72°C – 1kb/min | | |
| 8) 72°C – 10' | | |
| 9) 4°C – | | |

Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor pBT para posterior utilização no sistema de duplo-híbrido em bactérias.

3.4 ISOLAMENTO DOS RNA MENSAGEIROS (RNAm) DE CÉLULAS DE FÍGADO E CÉREBRO HUMANOS

O RNA total de células humanas de fígado e de cérebro obtido comercialmente (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) serviu como material inicial para o isolamento do RNAm destas células, utilizando o procedimento *Dynabeads mRNA Purification Kit*[®] (Dyna/Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Este procedimento utiliza microesferas magnéticas que contém oligos dT ligados à superfície. De acordo com as instruções do fornecedor, em um tubo de reação, o RNA total foi misturado as microesferas, permitindo o contato entre a cauda poli-A presente na extremidade 3' dos RNAm e os oligos-dT, levando à sua hibridização. Este tubo foi colocado em contato com um ímã, ao qual as microesferas magnéticas foram atraídas juntamente com os RNAm. O sobrenadante foi, então, eliminado e os RNAm eluídos com tampão de eluição fornecido pelo próprio sistema.

3.5 SÍNTESE DAS FITAS DE cDNA DE CÉLULAS DE FÍGADO E DE CÉREBRO HUMANOS E CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE cDNA

A síntese das fitas de cDNA das células humanas de fígado e de cérebro foi realizada pelo método *SuperScript III*[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), utilizando os RNAm previamente isolados. Como descrito pelo fabricante, na síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado o oligo-dT contendo o sítio da enzima de restrição XhoI, juntamente com a enzima de transcrição reversa. Na extremidade 5' das fitas foi adicionado o adaptador contendo o sítio da enzima de restrição EcoRI. As bibliotecas de células de fígado e de cérebro humanos foram construídas pela clonagem dos fragmentos de cDNA no vetor pTRG[®] (Stratagene, San Diego, EUA).

3.6 IDENTIFICAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE PROTEÍNAS VIRAIS E HUMANAS PELO MÉTODO DE DUPLO-HÍBRIDO EM BACTÉRIAS

O sistema de duplo híbrido utilizado neste projeto foi o *BacterioMatch Two-Hybrid System*[®] (Stratagene, San Diego, EUA), baseado no trabalho de DOVE; JOUNG e HOCHSCHILD (1997). Este sistema permite detectar a interação entre proteínas com base na ativação de um circuito de transcrição, cujo esquema encontra-se na FIGURA 15. Resumidamente, a proteína de interesse, denominada “isca”, foi clonada no vetor pBT[®] fusionada ao gene que codifica a proteína repressora do bacteriófago λ , chamada λ cl, que contém um domínio de ligação ao DNA na porção N-terminal, e um domínio de dimerização na porção C-terminal. A proteína λ cl, fusionada a isca, se liga ao operador λ , que está posicionado a montante do promotor do gene repórter através do domínio de ligação ao DNA. Uma outra proteína ou uma biblioteca de cDNA (“alvo”) foi clonada no vetor pTRG[®] fusionada a região N-terminal do gene que codifica a subunidade α da enzima RNA polimerase. Quando a isca e o alvo interagiram, elas recrutaram e estabilizaram a ligação da RNA polimerase ao promotor, ativando a transcrição do gene repórter que confere resistência a ampicilina. A β -

galactosidase, o segundo gene repórter, foi expresso fornecendo um mecanismo adicional para validar a interação entre as proteínas “isca” e “alvo”.

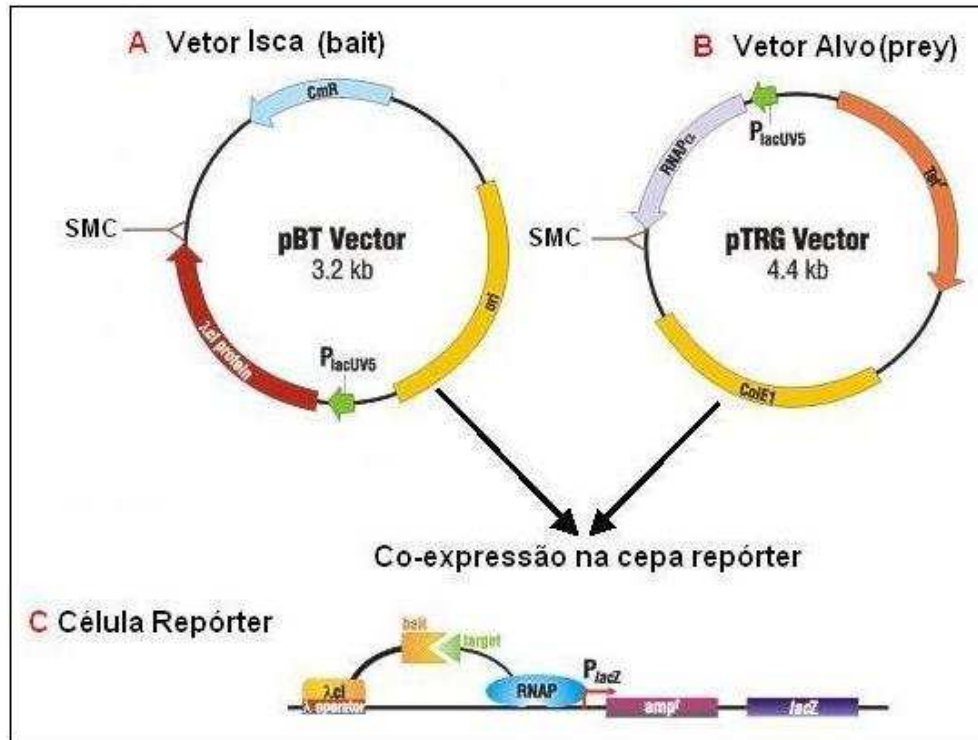


FIGURA 15 – SISTEMA DO DUPLO-HÍBRIDO EM BACTÉRIAS. **A** – VETOR pBT[®], NO QUAL FOI CLONADO O GENE “ISCA” DE INTERESSE. **B** – VETOR pTRG[®], NO QUAL FOI CLONADO UM GENE OU UMA BIBLIOTECA “ALVO”. **C** – ESQUEMA DOS GENES REPÓRTERES QUE FORAM ATIVADOS QUANDO OCORREU INTERAÇÃO ENTRE A “ISCA” E O “ALVO”. ADAPTADO DE DOVÉ, 1997.

Neste trabalho, as proteínas estruturais expressas pelo vírus da Dengue, que foram clonadas nos vetores pBT[®], atuaram como proteínas “isca”, e as bibliotecas de cDNA de fígado e de cérebro, ambas clonadas no vetor pTRG[®], representaram o “alvo”. Os plasmídeos pBT[®] e pTRG[®] foram co-transformados em bactérias contendo uma cópia episomal (plasmídeo) do gene repórter Ampicilina/LacZ . Esta reação foi plaqueada em meio *Luria Broth* (LB, Broth Base. Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) contendo os seguintes antibióticos: tetraciclina, 10 ug/ml (pTRG[®]); cloranfenicol, 35 ug/ml (pBT[®]); ampicilina, 100

ug/ml (repórter) e kanamicina, 50 ug/ ml (repórter). Na triagem primária, entre 50 e 400 colônias foram individualmente coletadas de cada duplo-híbrido e transferidas para placas de 96 poços contendo meio Soc. Após dispersão das colônias no meio, estas foram plaqueadas em meio suplementado com kanamicina (50 ug/ml), tetraciclina (12.5 ug/ml), cloranfenicol (34 ug/ml), X-gal (80 ug/ml) como método de validação adicional, pois permitiu a identificação das interações positivas pela coloração azul das colônias. Nesta segunda triagem, somente as colônias de intensidades azul média e forte foram coletadas de cada duplo-híbrido. Para confirmar as interações, estas colônias foram selecionadas e depositadas em meio LB contendo tetraciclina (12,5 ug/ml), a fim de isolar os plasmídeos pTRG[®] que continham as seqüências gênicas das proteínas humanas que interagiram com as proteínas virais. Este procedimento possibilitou a eliminação dos plasmídeos pBT[®], uma vez que apenas o pTRG[®] possuía o gene de resistência a tetraciclina. A co-transformação da cepa repórter foi, então, realizada com os plasmídeos pTRG[®] purificados e os plasmídeos pBT[®] recombinantes, a fim de confirmar as interações protéicas observadas. Esta reação foi plaqueada em meio LB com cloranfenicol (34 ug/ml), tetraciclina (12,5 ug/ml), kanamicina (50 ug/ml) e X-gal (80 ug/ml), e as colônias positivas apresentaram coloração azul escura, como ilustrado de forma esquemática na FIGURA 16. Na etapa seguinte, as interações positivas foram submetidas à minipreparação de plasmídeos e analisadas no centro *PAN Facility* de Sequenciamento da Universidade de Stanford, pelo método *Big Dye* (dideoxy), obtendo-se a seqüência dos genes que codificam as proteínas humanas que interagiram com as proteínas do vírus.

3.7 ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS OBTIDAS

A seqüência de cada gene foi submetida ao programa de análise de seqüências BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), que se caracteriza por fazer buscas em bancos de dados disponíveis e compará-las às preexistentes, possibilitando, assim, identificar as proteínas que são codificadas pelo gene cuja seqüência foi identificada no duplo-híbrido.

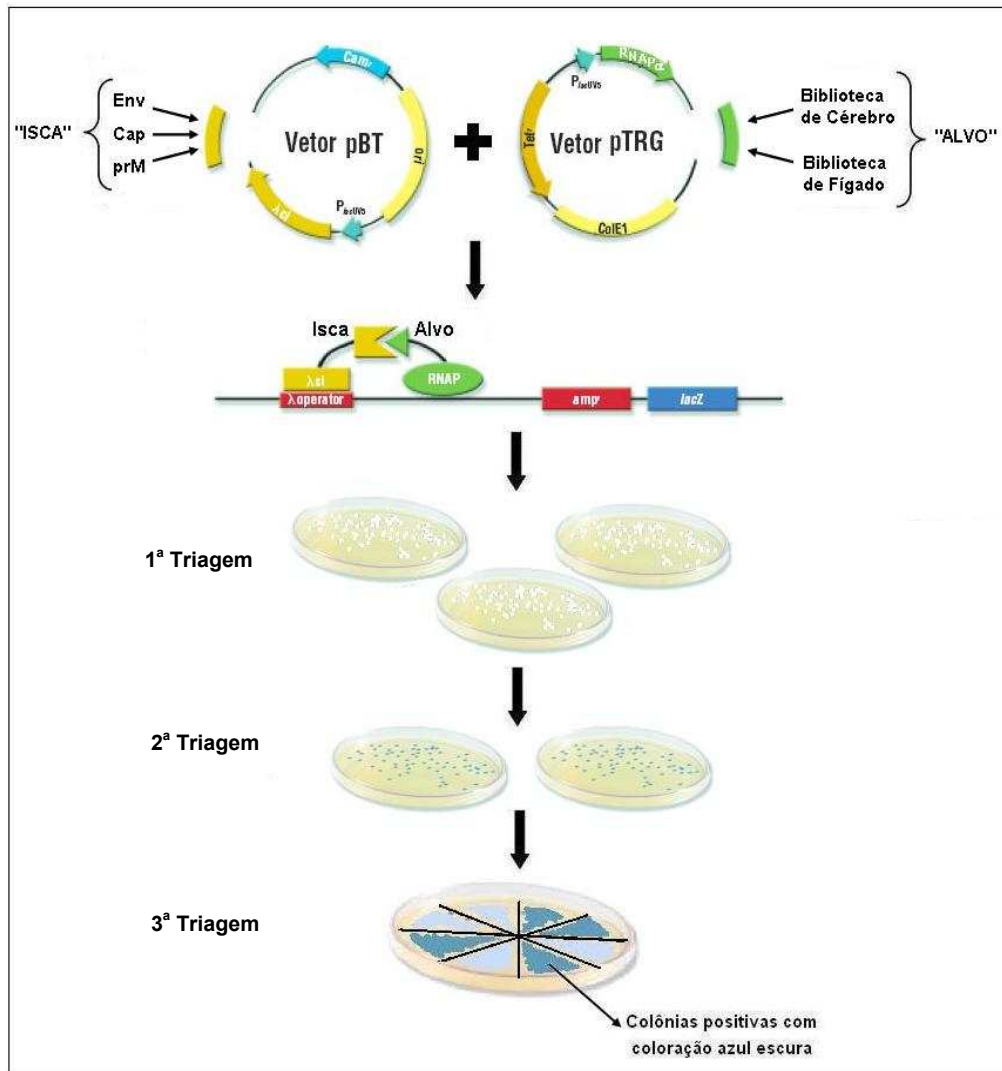


FIGURA 16: ESQUEMA DO CRUZAMENTO DOS VETORES NO DUPLO-HÍBRIDO: A 1^o TRIAGEM FOI REALIZADA APÓS O CRUZAMENTO DOS VETORES ISCA E ALVO. COLÔNIAS OBTIDAS FORAM USADAS NA 2^o TRIAGEM, PORÉM FOI ADICIONADO X-gal AO MEIO DE CULTURA, A FIM DE SELECIONAR COLÔNIAS COM COLORAÇÃO AZUL, AS QUAIS EXPRESSAM O GENE REPÓRTER DA β -GALACTOSIDASE. A 3^o TRIAGEM FOI REALIZADA COM AS COLÔNIAS OBTIDAS NA 2^o TRIAGEM, A FIM DE SELECIONAR AS COLÔNIAS COM COLORAÇÃO AZUL ESCURA, AS QUAIS POSSIVELMENTE REPRESENTAM INTERAÇÕES VERDADEIRAS.

3.8 CONSTRUÇÃO DO INTERATOMA

Para a construção do interatoma entre as proteínas do vírus e as das células hospedeiras humanas, foi utilizado o programa de visualização de redes

Cytoscape. As interações positivas obtidas por duplo-híbrido e submetidas a seqüenciamento e análise foram organizadas em duas planilhas, ambas contendo as proteínas virais (proteínas isca) e o tipo de interação. Uma das planilhas reuniu as proteínas de células de cérebro (proteínas alvo), e a outra as proteínas de células de fígado (proteínas alvo). Visto que o programa *Cytoscape* está conectado a bancos de dados *on line*, foi importante usar um sistema de identificação que fosse reconhecido pelo programa. Portanto, foram utilizados os números de identificação de cada gene (Gene ID), cuja proteína interagiu com as proteínas virais. Estas planilhas foram usadas para alimentar o programa *Cytoscape* em momentos distintos.

3.9 CRUZAMENTOS DOS DADOS DE INTERAÇÕES PROTÉICAS COM OS DADOS DE EXPRESSÃO GÊNICA UTILIZANDO O PROGRAMA *MATISSE*

O programa *Matisse* permite o cruzamento de dados de interações protéicas e dados de expressão gênica. Este programa está ligado ao banco de dados do *Gene Ontology*, uma colaboração internacional entre cientistas de vários bancos de dados biológicos, fundado com o objetivo de fornecer um vocabulário controlado para a descrição de funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares de produtos gênicos em qualquer organismo (<http://www.geneontology.org/>), o que permite atribuir um gene/proteína a um módulo funcional.

O *Matisse* possui uma base estatística que permite estimar os resultados de forma confiável. O programa analisa a probabilidade de um gene/proteína pertencer a um determinado módulo funcional e fornece o valor estatístico desta probabilidade. A base estatística deste programa esta relacionada com os “vizinhos próximos” (*immediate neighbors* e *best neighbors*), ou seja, ele examina a função dos genes/proteínas presentes na próxima camada da rede e cruza com as funções dos genes/proteínas da camada anterior. Com isso, analisa a probabilidade de que os genes da camada mais interna tenham sido atribuídos ao acaso a um determinado módulo funcional. A utilização do *Matisse* como

ferramenta de análise facilita a identificação de alterações na rede e a análise das conseqüências de tais alterações.

Este programa foi utilizado a fim de obter visão mais ampla e sistêmica da atuação do vírus na célula hospedeira, buscando identificar os tipos de alterações que poderiam ocorrer frente à infecção viral. Para isso, foi criado um arquivo *.xls* contendo os dados de interações entre proteínas humanas e virais obtidos no duplo-híbrido de cérebro juntamente com dados de expressão gênica de cérebro. Os dados de expressão foram obtidos em bancos de dados públicos de microarranjo disponíveis na rede mundial de computadores.

A rede construída no *Matisse*, cruzando dados de expressão e de interações protéicas, foi exportada para o programa *Cytoscape*, o qual permite melhor visualização, exploração e análise dos dados.

3.10 ANÁLISE DO INTERATOMA

O interatoma foi analisado com o auxílio de dados da literatura, visando identificar proteínas e interações essenciais para o ciclo viral e/ou para o desenvolvimento do quadro fisiopatológico da doença em humanos.

O programa *Cytoscape* permite a instalação de uma série de extensões (*plugins*) que atuam como programas auxiliares, os quais podem ser adicionados permitindo a ampliação das funções do programa. Uma das extensões instaladas durante o desenvolvimento do projeto, o *Agilent Literature Search*, foi utilizado para auxiliar a análise dos dados da literatura. Com o uso desta ferramenta, foi possível buscar por nomes de genes ou proteínas de interesse juntamente com unitermos que descrevem o tipo de relação que está sendo procurada. Por exemplo, procura-se por proteínas que interagiram diretamente com o vírus da Dengue. Portanto, como palavra chave utilizou-se “Clusterina” (ver resultados) juntamente com “vírus da Dengue” e/ou “apoptose”. A extensão busca informações em múltiplos bancos de dados textuais, como o *PubMed*, e gera uma representação computacional das associações, agrupadas em uma rede, contendo os genes ou proteínas e as ligações que indicam relações entre eles. Esta rede pode ser visualizada e analisada no *Cytoscape*. Esta extensão foi

utilizada a fim de minimizar a busca manual por cada gene ou proteína na literatura científica e permitir a análise dos dados de forma mais eficiente, colocando-os em um contexto biológico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SÍNTESE E CLONAGEM DAS FITAS DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA) DO VÍRUS

As fitas de cDNA virais foram sintetizadas e clonadas no vetor de pCRIIBlunt[®]. Utilizando este vetor como molde, a fase aberta de leitura do genoma viral foi amplificada e clonada nos vetores pCR4Blunt-TOPO[®] e pTRIEX[®]. Oligonucleotídeos com base na seqüência dos genes Cap, Env, prM e M do vírus, foram utilizados na reação de amplificação destes genes. Dez por cento das reações de PCR foram submetidas a corrida eletroforética em gel de agarose para verificar a amplificação destes genes. A foto deste gel pode ser visualizada na FIGURA 17.

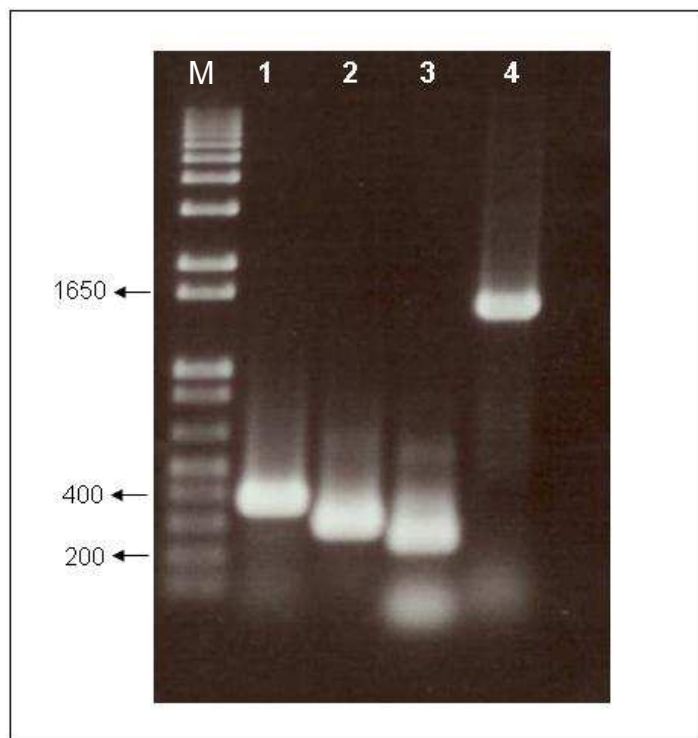


FIGURA 17: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE COM AS AMPLIFICAÇÕES DOS GENES VIRAIS OBTIDOS POR PCR: **M** – Marcador de Peso Molecular, **1** – Cap, **2** – prM, **3** – M, **4** – Env.

Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor pBT[®]. A digestão com as enzimas EcoRI e XhoI dos clones resultantes permitiu confirmar a inserção correta dos fragmentos dos genes Env e prM no vetor pBT[®], após corrida eletroforética em gel de agarose dos produtos digeridos, ilustrada na FIGURA 18. O gene M não foi utilizado nas subseqüentes análises realizadas no presente trabalho.

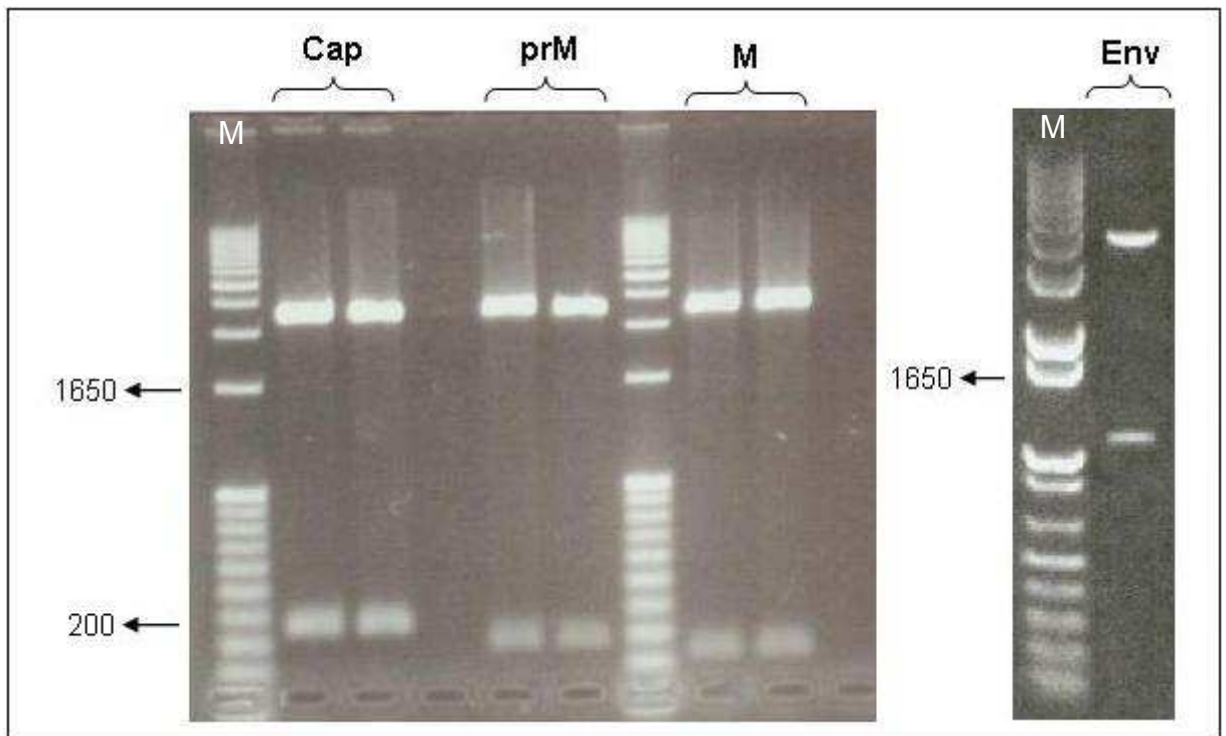


FIGURA 18: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE MOSTRANDO A DIGESTÃO DO VETOR pBT[®] CONTENDO OS GENES Cap, prM, M E Env COM AS ENZIMAS EcoRI E XhoI. M – Marcador de Peso Molecular.

4.2 DUPLO-HÍBRIDO E SEQUENCIAMENTO DAS INTERAÇÕES POSITIVAS

Após a clonagem dos genes estruturais do vírus no vetor pBT[®], e das bibliotecas de cérebro e fígado em vetores pTRG[®], procedeu-se a co-transformação destes em *Escherichia. coli* competentes. Esta foi realizada segundo protocolo indicado no manual do fabricante, com algumas modificações.

Com o vetor pBT[®]+Cap foi possível realizar os procedimentos do duplo-híbrido seguindo apenas as indicações do manual do fabricante. Primeiramente,

foi realizada a co-transformação do pBT[®]+Cap com o vetor pTRG[®] contendo a biblioteca de cérebro. Esta reação foi plaqueada e mantida em estufa a 30°C por 24 horas. Como mencionado anteriormente na Metodologia, foram realizadas três triagens, nos quais as mesmas condições de temperatura e tempo de incubação foram repetidas. A escolha de colônias com coloração azul forte na terceira e última triagem foi utilizada como um critério de seleção adicional, visto que as mesmas tendem a indicar uma interação protéica verdadeira. Exemplos de placas obtidas no duplo-híbrido da proteína Cap nas triagens podem ser observadas na FIGURA 19.

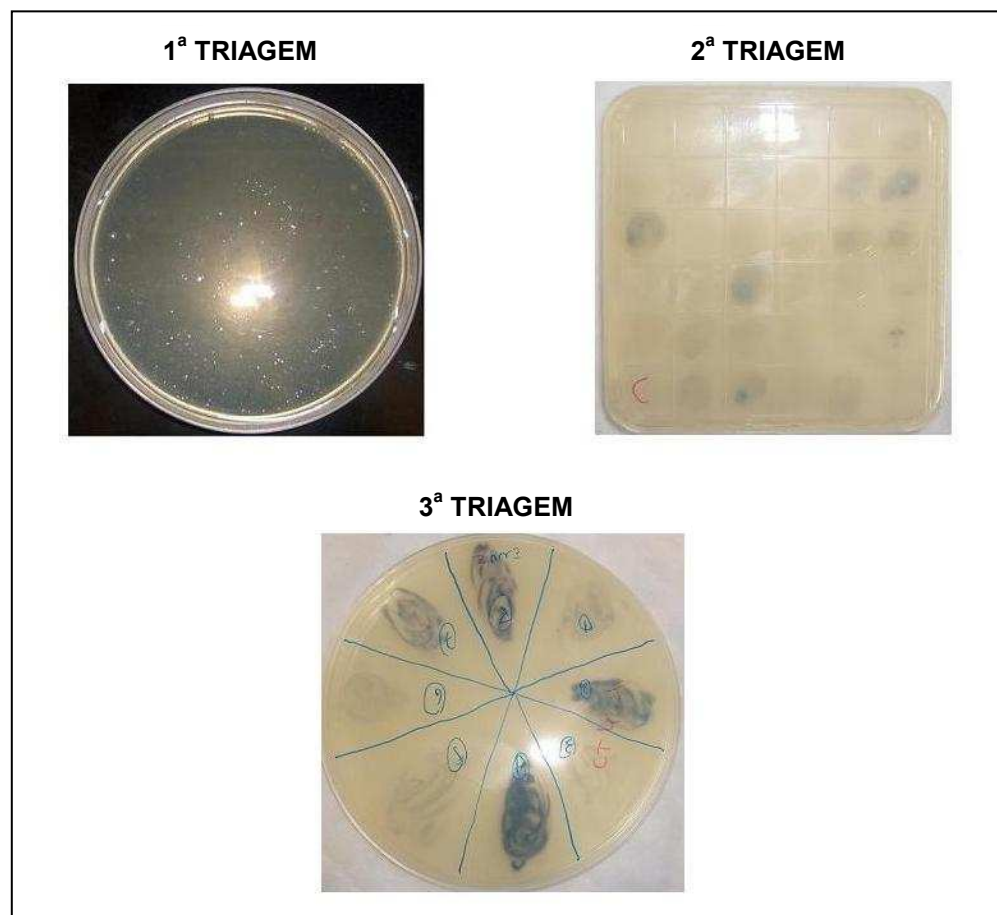


FIGURA 19 - PLACAS DE CULTURA OBTIDAS NO DUPLO-HÍBRIDO DA PROTEÍNA NAS TRES TRIAGENS, EVIDENCIANDO A QUANTIDADE DE COLÔNIAS E A COLORAÇÃO AZUL DAS COLÔNIAS NAS 2ª E 3ª TRIAGENS.

As colônias de coloração azul escura foram submetidas a minipreparação de plasmídeos, os quais foram sequenciados para a identificação das proteínas humanas que interagiram com a proteína estrutural Cap.

As mesmas etapas foram seguidas na realização do duplo-híbrido desta proteína com a biblioteca de fígado. Em um primeiro momento, os duplo-híbridos com os vetores pBT[®]+Env e pBT[®]+prM foram realizados seguindo o mesmo protocolo usado para a proteína Cap. Porém, não houve crescimento de nenhuma colônia nas placas mantidas a 30 °C por 24 horas. É provável que a alta toxicidade das proteínas virais para as células bacterianas tenha sido responsável por estes resultados.

Na tentativa de contornar esta situação, algumas modificações foram adotadas. Os procedimentos de co-transformação dos vetores pBT[®] e pTRG[®] e subsequentes plaqueamentos foram realizados como citado acima para a proteína Cap, sem alterações. Entretanto, a temperatura e o tempo de incubação das placas utilizados nas três triagens foram alterados, respectivamente, para 20 °C e por um período de 72 horas. Em seguida, as placas foram mantidas a 25 °C por 6 horas para que as colônias pudessem adquirir um tamanho ideal, visando sua utilização posterior com maior eficiência. Essas modificações no protocolo original levaram a obtenção de colônias, representando interações protéicas positivas. Na 3^a triagem, foram selecionadas as com coloração azul mais intensa, as quais foram submetidas a minipreparação de plasmídeos, que, por sua vez, também foram submetidos a sequenciamento para a identificação das proteínas humanas que interagiram com as proteínas estruturais. Estas modificações no protocolo foram realizadas para as proteínas Env e prM no duplo-híbrido tanto de cérebro como no duplo-híbrido de fígado.

Após análise dos dados do sequenciamento no programa BLAST, foi possível identificar nos duplos-híbridos de fígado e cérebro, respectivamente, 16 e 25 proteínas humanas que interagiram com as proteínas virais. Enquanto a FIGURA 20 ilustra em parte este procedimento, as TABELAS 2 e 3 mostram algumas das proteínas estruturais do vírus, o número de identificação (Gene ID) e o nome das proteínas humanas que interagiram com estas no duplo-híbrido de cérebro e de fígado, respectivamente.

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help My NCBI [Sign In] [Register]

NCBI BLAST blast suite/ Formatting Results - TGP75G6W011

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download

Nucleotide Sequence (1347 letters)

Query ID: lc|37791 Database Name: dbindex/9506/allcontig_and_rna
 Description: None Description: Human build 35.3 RNA, reference, and HuRef assemblies
 Molecule type: nucleic acid Program: BLASTN 2.2.19+ Citation
 Query Length: 1347

Other reports: Search Summary Taxonomy reports Distance tree of results Human genome view

Graphic Summary

Distribution of 12 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse over to see the define, click to show alignments

Color key for alignment scores

Query

Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
Transcripts							
NM_203339.1	Homo sapiens clusterin (CLU), transcript variant 2, mRNA	1691	1691	70%	0.0	99%	U E G M
NM_001831.2	Homo sapiens clusterin (CLU), transcript variant 1, mRNA	1691	1691	70%	0.0	99%	U E G M
Genomic sequences (show first)							
NW_001832127.1	Homo sapiens chromosome 8 genomic contig, alternate assembly (based on	731	1719	70%	0.0	100%	
NT_023666.17	Homo sapiens chromosome 8 genomic contig, reference assembly	746	1714	70%	0.0	100%	

Alignments Select All Get selected sequences Distance tree of results

```
>|_ref|NM_203339.1| UEGM Homo sapiens clusterin (CLU), transcript variant 2, mRNA
Length=2979

GENE_ID: 1191 CLU | clusterin [Homo sapiens] (Over 100 PubMed links)

Score = 1691 bits (1874), Expect = 0.0
Identical = 945/950 (99%), Gaps = 1/950 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 76   CTCTGGGAAGAGTCTAAGCCCTGCCCTGAACAGACCTGCATGAAGTCTACGCACGCGTC 135
Sbjct 630   CTCTGGGAAGAGTCTAAGCCCTGCCCTGAACAGACCTGCATGAAGTCTACGCACGCGTC 689
Query 136   TGCAGAAGTGGCTCAGGCCCTGGTGGCCGCCAGCTTGAGGAATTCCTGAACAGAGCTCG 195
Sbjct 690   TGCAGAAGTGGCTCAGGCCCTGGTGGCCGCCAGCTTGAGGAATTCCTGAACAGAGCTCG 749
Query 196   CCTTCTACTTCTGGATGAAATGGTACCCGATCGACTCCCTGCTGGAGAACGACCGCCAG 255
Sbjct 730   CCTTCTACTTCTGGATGAAATGGTACCCGATCGACTCCCTGCTGGAGAACGACCGCCAG 809
Query 256   CAGACGCACATGCTGGATGTCATGCAGGACCACTTCAGCCGCCGCTCCAGCATCATAGAC 315
Sbjct 810   CAGACGCACATGCTGGATGTCATGCAGGACCACTTCAGCCGCCGCTCCAGCATCATAGAC 869
Query 316   GAGCTCTCCAGGACAGGTTCTTCAACCCGGAGCCCGAGGATACCTACCACTACCTGCCC 375
... ..
```

FIGURA 20 - EXEMPLO DE UMA DAS ANÁLISES REALIZADAS NO PROGRAMA BLAST, COM AS SEQUÊNCIAS DOS GENES QUE CODIFICAM AS PROTEÍNAS HUMANAS ENCONTRADAS NO DUPLO-HÍBRIDO.

TABELA 2: INTERAÇÕES ENTRE AS PROTEÍNAS VIRAIS E HUMANAS RESULTANTE DO DUPLO-HÍBRIDO COM RNA DE CÉLULAS DE CÉREBRO.

CÉREBRO					
Proteína Viral	Gene ID / Proteína Humana		Proteína Viral	Gene ID / Proteína Humana	
Cap 1	5743	COX-2	prM 9	-	-
Cap 2	654264	TUBA3	prM 10	351	APP
Cap 3	654790	PCP4L1	prM 11	1193	CLIC2
Cap 4	4519	CYTB	prM 12	4519	CYTB
Cap 5	4519	CYTB	prM 13	-	-
Cap 6	5742	COX-1/COX-3	prM 14	4550	MTRNR2
Cap 7	5742	COX-1/COX-3	prM 15	4550	MTRNR2
Cap 8	4155	MBP	prM 16	4519	CYTB
Cap 9	9848	MFAP3L	prM 17	654264	TUBA3
Cap 10	4155	MBP	prM 18	55625	ZDHHC7
Cap 11	4519	CYTB	prM 19	4550	MTRNR2
Cap 12	4519	CYTB	prM 20	4519	CYTB
Cap 13	5742	COX-1/COX-3	Env 1	5742	COX-1/COX-3
Cap 14	5742	COX-1/COX-3	Env 2	1193	CLIC2
Cap 15	1191	CLU	Env 3	-	-
Cap 16	4519	CYTB	Env 4	4519	CYTB
Cap 17	23164	M-RIP	Env 5	4900	NRGN
Cap 18	4550	MTRNR2	Env 6	-	-
Cap 19	25769	NCKX2	Env 7	9670	IPO13
prM 1	-	-	Env 8	-	-
prM 2	4763	NF1	Env 9	4550	MTRNR2
prM 3	4519	CYTB	Env 10	7111	TMOD1
prM 4	9943	OXSR1	Env 11	4519	CYTB
prM 5	10099	TM4SF8	Env 12	9826	ARHGEF11
prM 6	22891	ZNF365	Env 13	3263	HPX
prM 7	1191	CLU	Env 14	570	BAAT
prM 8	-	-	Env 15	5265	SERPINA1

Cap = Capsídeo, prM = pré-Membrana, Env = Envelope.

4.3 CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DO INTERATOMA

O número de identificação dos genes que codificam as proteínas humanas foi utilizado para alimentar o programa *Cytoscape*. Esta plataforma suporta e reconhece as seguintes anotações funcionais de genes: *Gene Ontology*, banco de dados KEGG, modelos biológicos do *Systems Biology Markup Language (SBML)*, interações protéicas dos bancos de dados BIND e *TRASFAC*.

TABELA 3: INTERAÇÕES ENTRE AS PROTEÍNAS VIRAIS E HUMANAS RESULTANTE DO DUPLO-HÍBRIDO COM RNA DE CÉLULAS DE FÍGADO.

FÍGADO					
Proteína Viral	Gene ID / Proteína Humana		Proteína Viral	Gene ID / Proteína Humana	
Cap 21	5340	PLG	prM 29	-	-
Cap 22	5742	COX1	prM 30	-	-
Cap 23	6188	RPS3	prM 31	213	ALB
Cap 24	5265	SERPINA1	prM 32	-	-
Cap 25	5742	COX1	prM 33	-	-
Cap 26	9943	OXSRI	prM 34	213	ALB
Cap 27	-	-	prM 35	5265	SERPINA1
Cap 28	4550	MT-RNR2	Env 17	-	-
Cap 29	95	ACY1	Env 18	5265	SERPINA1
Cap 30	229	ALDOB	Env 19	10558	SPTLC1
Cap 31	4519	CYTB	Env 20	570	BAAT
prM 21	10140	TOB1	Env 21	5265	SERPINA1
prM 22	570	BAAT	Env 22	-	-
prM 23	5340	PLG	Env 23	5265	SERPINA1
prM 24	336	APOA2	Env 24	5340	PLG
prM 25	5004	ORM1	Env 25	10558	SPTLC1
PrM 26	5742	COX1	Env 26	10558	SPTLC1
PrM 27	10558	SPTLC1	Env 27	5004	ORM1
PrM 28	10558	SPTLC1			

Cap = Capsídeo, prM = pré-Membrana, Env = Envelope.

Assim que os dados foram inseridos no *Cytoscape*, uma rede padrão de visualização das interações foi automaticamente gerada. Entretanto, a forma de visualização desta rede foi alterada utilizando-se a ferramenta chamada "*Spring embedded layout*", facilitando a identificação de características importantes. A rede gerada com os dados obtidos no duplo-híbrido de cérebro e de fígado podem ser visualizadas nas FIGURAS 21 e 22, respectivamente. As principais funções das proteínas humanas que interagiram com Cap, Env e prM no duplo-híbrido estão relacionadas na TABELA 4.

Analisando-se a rede de interações de cérebro (FIGURA 21), pode-se observar a formação de um núcleo central por três proteínas estruturais do vírus, Cap, Env e prM, e outras três proteínas humanas, Ciclooxygenase 1 (COX-1), *Chloride Intracellular Channel 2* (Clic-2) e Clusterina (CLU).

TABELA 4: PRINCIPAIS FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS HUMANAS QUE INTERGIRAM COM AS PROTEÍNAS ESTRUTURAS DO VIRUS, Cap, Env E prM, NO DUPLO-HÍBRIDO REALIZADO COM CÉLULAS DE CÉREBRO E DE FÍGADO.

PROTEÍNA	PRINCIPAIS FUNÇÕES
ACY1	Atividade aminoacilase, hidrolase
ALB	Ligação ao DNA; regulador negativo da apoptose
ALDOB	Ligação de ATP; ligação de frutose
APP	Ligação do receptor de acetilcolina; ligação de cobre, heparina, zinco, ferro; atua nos processos de apoptose, adesão celular
APOA2	Ligação ao receptor de apolipoproteína
ARHGEF11	Ativador de GTPase; via de sinalização da proteína receptora acoplada a proteína G
BAAT	Atividade N-aciltransferase
CLIC2	Ligação a íons cloreto
CLU	Atua no processo de apoptose; função anti-apoptótica
COX 1	Regulação da resposta inflamatória
COX 2	Regulação da resposta inflamatória
COX 3	Regulação da resposta inflamatória
CYTB	Nenhuma informação disponível
HPX	Atividade de transporte de heme; regulador positivo da resposta imune humoral mediada por imunoglobulinas circulantes
KAP13	Transporte de proteínas para o núcleo (importinas)
MBP	Constituinte estrutural da bainha de mielina; resposta immune
MFAP3L	Proteína integral a membrana
MT-RNR2	Nenhuma informação disponível
NF1	Ativador de GTPase regulador negativo da via de transdução de sinal Ras
NRGN	Ligação a calmodulina
ORM1	Resposta inflamatória; regulação do processo do sistema imune
OSR1	Ligação de íons metálicos e ácidos nucleicos
P11RIP	Nenhuma informação disponível
PCP4L1	Nenhuma informação disponível
PLG	Atua no processo de apoptose e na coagulação sanguínea
SERPINA1	Atua no processo de coagulação sanguínea
SPTLC1	Atua na biossíntese de esfingolipídeos
SLC24A2	Ligação o receptor de apolipoproteína; atua no transporte de colesterol
TMOD1	Ligação a tropomiosina e actina
TOB1	Regulador negativo da via de sinalização BMP e da proliferação celular
TSPAN3	Auxilia eventos de transdução de sinal que atuam na regulação do desenvolvimento celular, ativação, crescimento e motilidade
ZNF365	Ligação de íons zinco
ZNF370	Ligação de íons metálicos

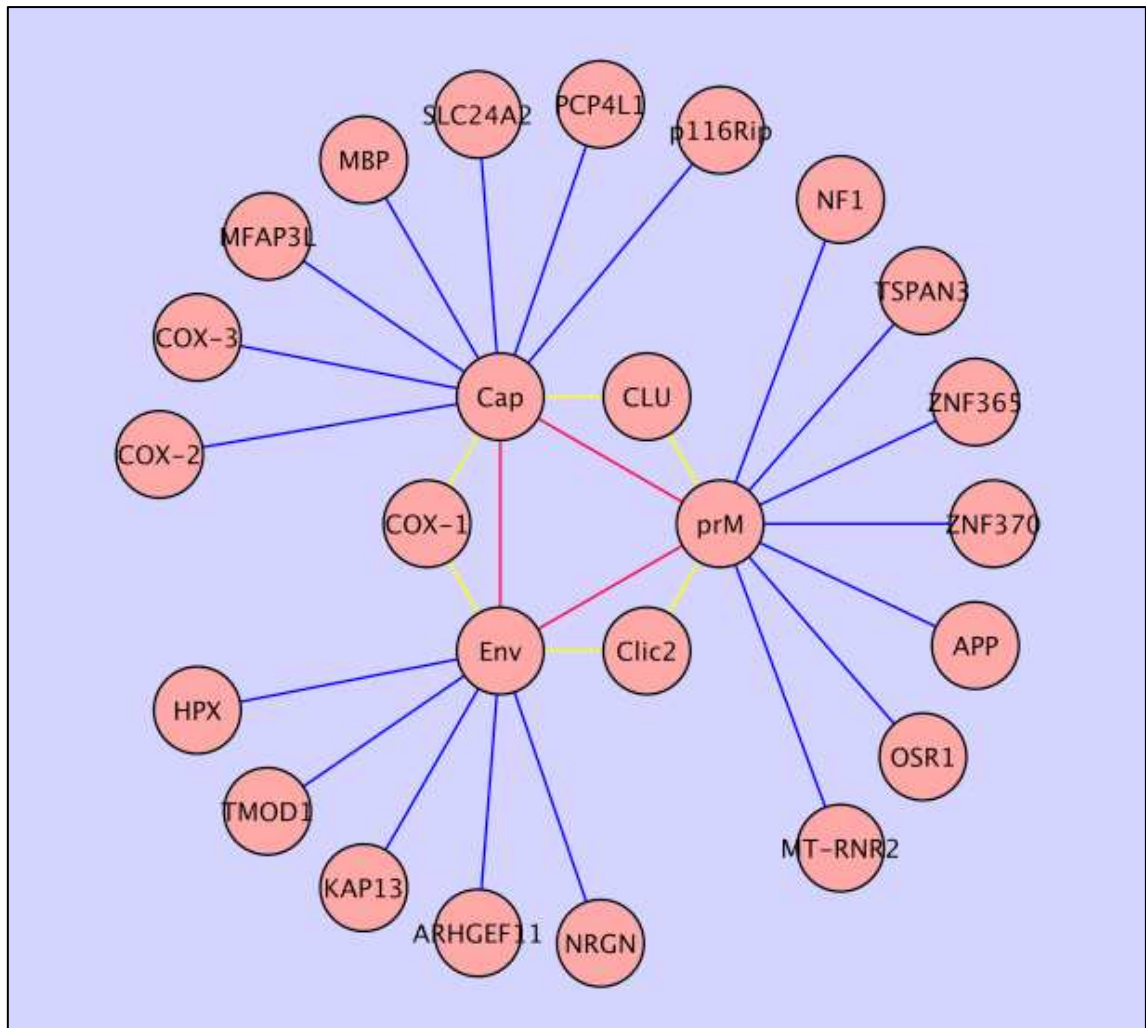


FIGURA 21 - REDE DE INTERAÇÕES ENTRE AS PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DO VÍRUS DA DENGUE E PROTEÍNAS DE CÉLULAS DE CÉREBRO HUMANO CRIADA PELO PROGRAMA CYTOSCAPE APÓS A INSERÇÃO DE DADOS.

Nesta rede, as proteínas humanas interagem com duas das três proteínas estruturais, sendo que COX-1 interage com Cap e Env, Clic-2 interage com Env e prM, e CLU interage com prM e Cap. A enzima COX-1 é responsável pela formação de prostanóides, importantes mediadores biológicos, incluindo prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, todos envolvidos na resposta inflamatória (STEER & CORBETT, 2003.).

Já a proteína Clic-2 é membro da família p64 e pertence a superfamília de canais iônicos, um grupo diverso de proteínas que regulam processos celulares fundamentais, incluindo a estabilização do potencial de membrana celular,

transporte transepitelial, manutenção do pH intracelular e regulação do volume celular (JENTSCH, 2002).

CLU é uma glicoproteína cujas funções ainda não foram totalmente esclarecidas. Acredita-se que esteja envolvida na inibição da apoptose em células cancerosas humanas (ZHANG, 2005), ou, ainda, que esteja relacionada a ativação do sistema complemento (TSCHOPP, 1994).

Observando-se a rede de interações de fígado (FIGURA 22), pode-se notar que as três proteínas estruturais Cap, Env e prM do vírus interagem com as proteínas humanas Plasminogênio (PLG) e Serpina.

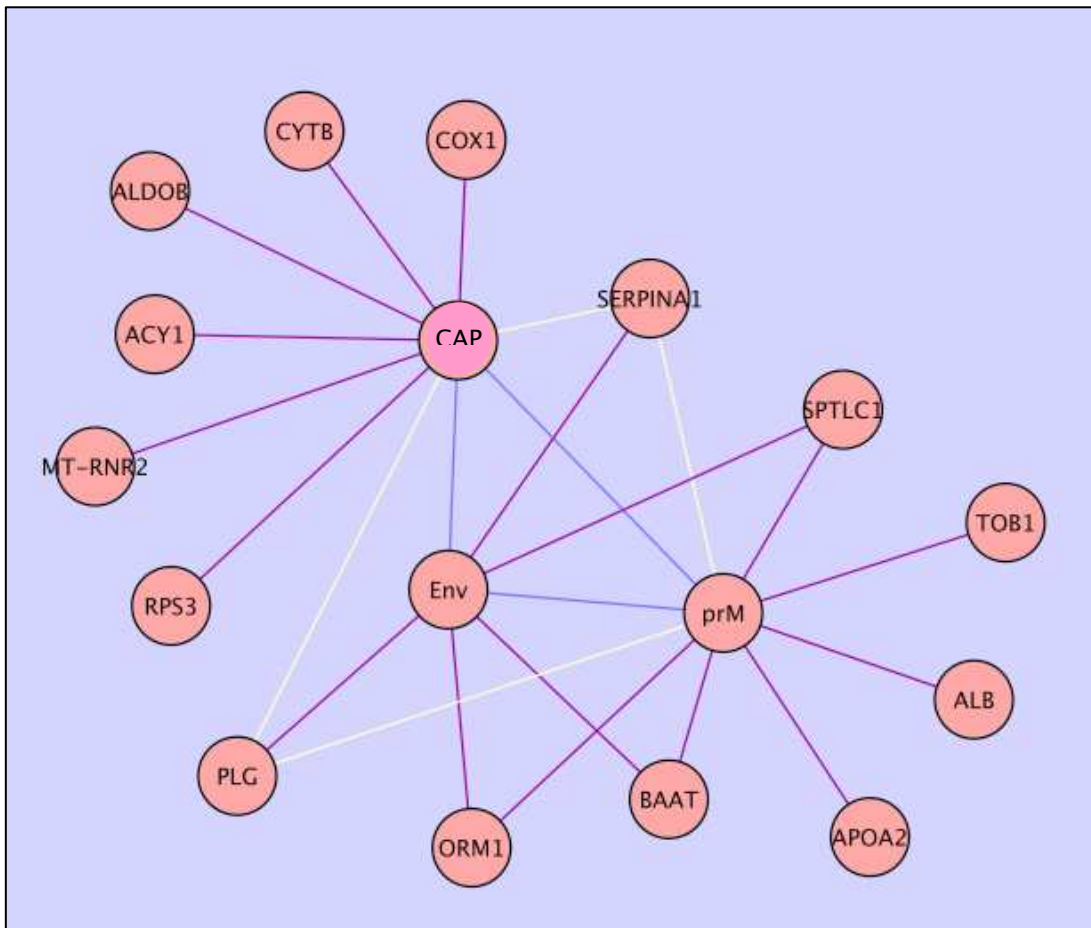


FIGURA 22 - REDE DE INTERAÇÕES ENTRE AS PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DO VÍRUS DA DENGUE E PROTEÍNAS DE CÉLULAS DE FÍGADO HUMANO GERADA PELO PROGRAMA CYTOSCAPE APÓS A INSERÇÃO DE DADOS.

A proteína PLG é um zimógeno circulante e convertido à enzima ativa Plasmina pela clivagem do peptídeo ligado entre os aminoácidos Arg560 e Val561, mediado pela Uroquinase e os ativadores do PLG. Recentemente foi observado, também, que PLG atua como inibidor do processo de morte celular por apoptose. A Plasmina pertence à família das serinas proteases e sua principal função é dissolver coágulos de fibrina. Esta é inativada pela proteína Serpina. A proteína Serpina é um inibidor de serinas proteases, cujos principais alvos são a elastase, a plasmina, a trombina, a tripsina, a chimotripsina e o ativador do plasminogênio (SCHNEIDER, CHEN, SOBEL, 2008).

Algumas proteínas humanas foram encontradas tanto no duplo-híbrido de cérebro como no duplo-híbrido de fígado. Tal fato pode vir a ser de grande interesse para estudos posteriores, uma vez que pode indicar proteínas essenciais para a infecção do vírus da Dengue em diferentes órgãos e tecidos humanos. Na FIGURA 23 é possível visualizar o cruzamento entre as redes de interações protéicas de cérebro e fígado, ressaltando as proteínas que interagem em ambos os órgãos.

A análise das redes geradas fornece inúmeras possibilidades para novas investigações. Por exemplo, ao interagir com CLU, de que forma as proteínas virais poderiam interferir na rede normal de interações desta proteína? A FIGURA 24 ressalta a rede da Clusterina, onde é possível visualizar as proteínas com as quais ela interage. Entre elas estão as C9, C8b e C7, que participam do sistema complemento.

Acredita-se que, ao interagir com estas proteínas, a CLU seja responsável pela ativação do sistema complemento quando na presença de um patógeno (MERI & JARVA, 1998). Tal sistema é integrante da resposta imune inata e auxilia na remoção de patógenos do organismo (KOCH-BRANDT & MORGANS, 1996). Uma vez que as proteínas prM e Cap interagem com a CLU, é possível supor que alterações no funcionamento normal desta proteína possam vir a ocorrer. Por exemplo, as proteínas estruturais do vírus, ao interagirem com a CLU, poderiam inibir sua função de ativadora do sistema complemento, fazendo com que o mesmo não seja ativado. Desta forma, o vírus não seria identificado de imediato pelo sistema imune, o que serviria como uma forma de escape imunológico.

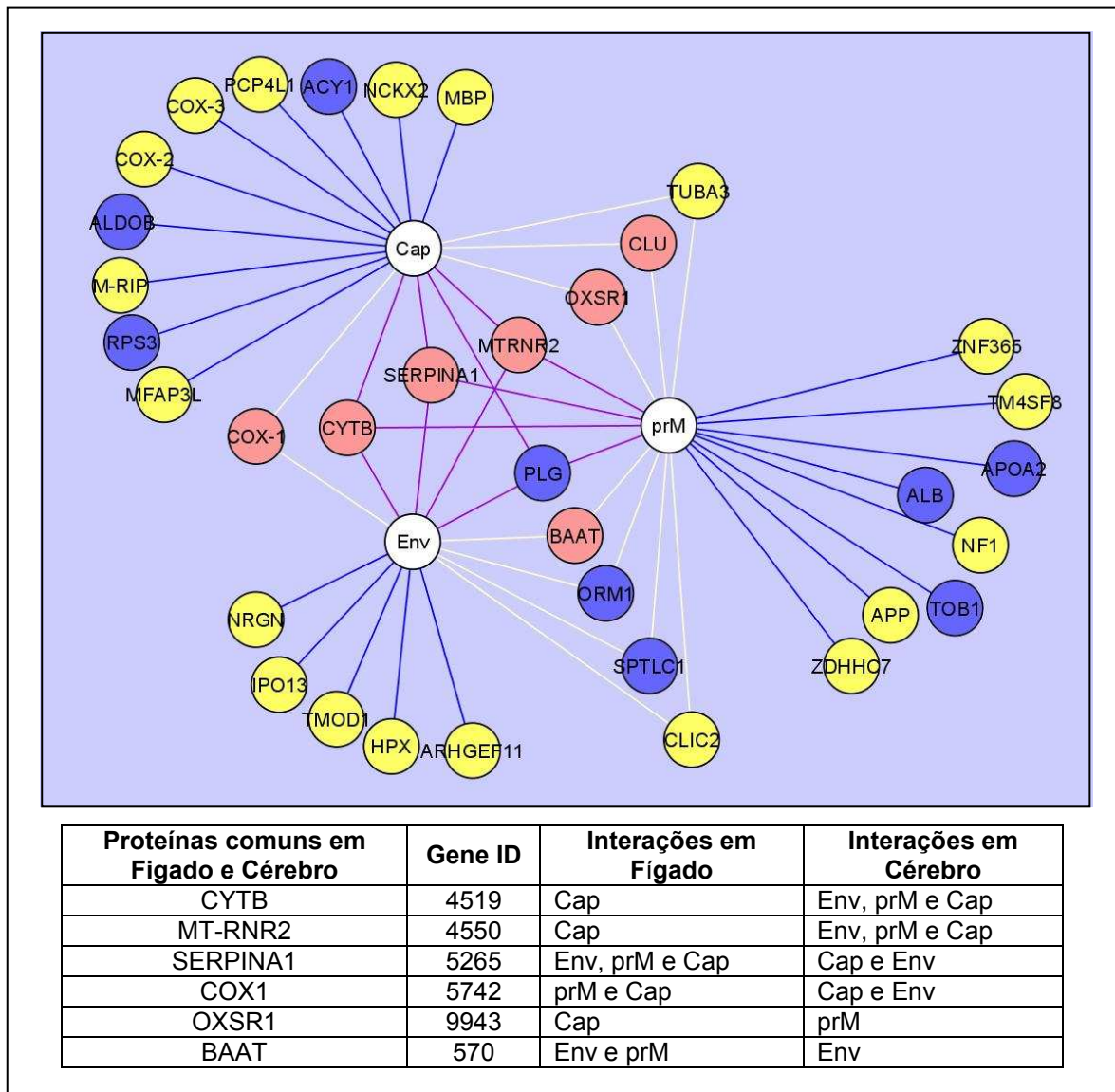


FIGURA 23 – CRUZAMENTO DAS REDES DE INTERAÇÕES PROTÉICAS DE FÍGADO (AZUL) E DE CÉREBRO (AMARELO) RESSALTANDO AS PROTEÍNAS QUE FORAM ENCONTRADAS EM AMBOS OS DUPLO-HÍBRIDOS (ROSA). EM BRANCO ESTÃO REPRESENTADAS AS PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DO VÍRUS DA DENGUE.

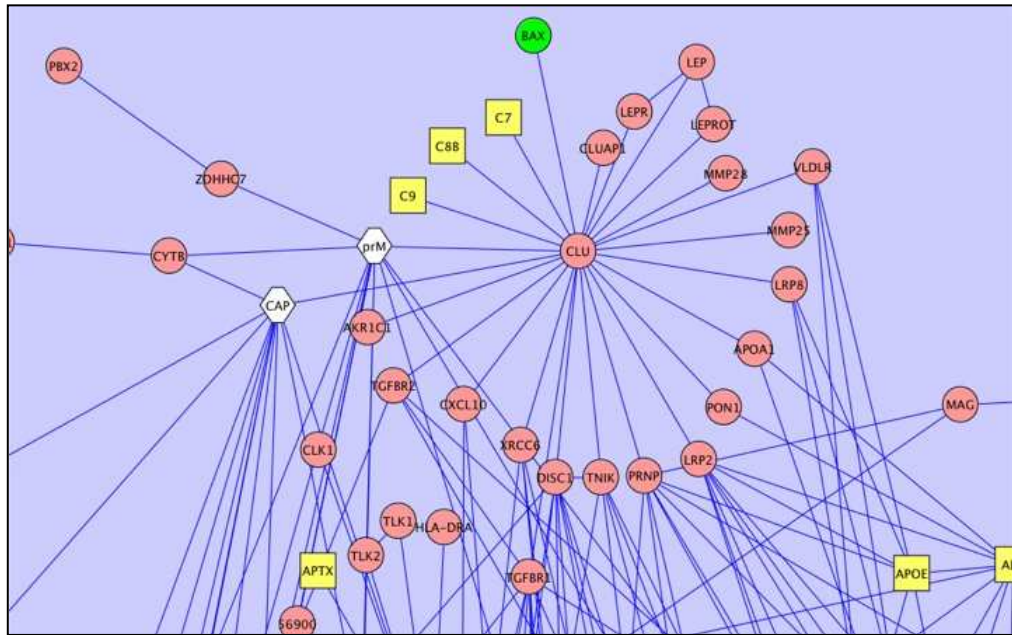


FIGURA 24 - REDE DE INTERAÇÕES PROTÉICAS DA CLUSTERINA: VISTA PARCIAL. DESTAQUE PARA AS INTERAÇÕES COM **C9**, **C8B** E **C7**, QUE PARTICIPAM DO SISTEMA COMPLEMENTO, E COM **BAX**, QUE APRESENTA FUNÇÃO PRÓ-APOPTÓTICA.

Observa-se, também, que a CLU interage com BAX, uma proteína indutora da apoptose. Há relatos de que a CLU possa atuar na inibição da apoptose em células cancerosas, possivelmente interferindo com sua ativação na mitocôndria (ZHANG, 2005). Neste contexto, seria interessante investigar se as proteínas Cap e/ou prM poderiam, ao interagir com a CLU, fortalecer a interação desta com BAX, a fim de inibir a indução da apoptose nas células hospedeiras.

Outros cenários podem ser criados e muitas questões podem ser levantadas pela análise de redes de interações celulares, as quais permitem a observação global de processos celulares, além de identificar em quais contextos tais proteínas estão envolvidas, em quais processos participam e qual a sua essencialidade em determinados processos.

Como visto anteriormente, a biologia de sistemas visa a integração de dados provindos de metodologias diversas, como, por exemplo, o cruzamento de dados de expressão gênica e de interações protéicas. Com a finalidade de analisar as informações obtidas por duplo-híbrido juntamente com dados de expressão gênica, o programa *Matisse* foi utilizado, visto que este realiza o cruzamento entre estes tipos de dados e gera automaticamente uma rede deste

cruzamento. Inicialmente foi estruturada uma planilha contendo os dados de expressão gênica de cérebro, infectado pelo vírus da Dengue, disponíveis em bancos de dados públicos obtidos pela técnica de microarranjo (FINK, *et al*, 2007), e os dados de interações protéicas, obtidos no duplo-híbrido de cérebro. A planilha utilizada para alimentar o programa reuniu os números de identificação de todos os genes analisados no microarranjo, das proteínas humanas encontradas no duplo-híbrido, bem como as proteínas estruturais do vírus da Dengue. Como já dito, as análises proteômicas geram grandes quantidades de dados, e, sendo assim, a planilha estruturada apresentou diversas páginas e, portanto, não pôde ser anexada ao presente trabalho. Entretanto, para efeitos de ilustração, parte desta planilha está apresentada abaixo, na FIGURA 25, e a rede gerada pelo programa *Matisse* pode ser visualizada na FIGURA 26.

Rank	NAME	GenBank Acc	Gene Name	Gene Symbo	LocusId	Log(base2) of R/
1	IMAGE:49336	H15418::H15	Carbonic anhydrase 1	CA10	56934	4.908
2	IMAGE:51796	H23524::H23	Synaptotagmin 4	SYT4	6860	4.814
3	IMAGE:17006	A1003154	Zinc finger protein 483	ZNF483	158399	4.778
4	IMAGE:15716	AA932696	Family with sequence similarity 107A	FAM107A	11170	4.665
5	IMAGE:52927	H29251::H29	Brain and testis 2	BAALC	79870	4.657
6	IMAGE:43866	H05091::H05	Dynein, cytoplasmic 111	DYNC111	1780	4.623
7	IMAGE:51156	H18833::H18	DIRAS family 2	DIRAS2	54769	4.621
8	IMAGE:37986	R61372::R61	Zinc finger protein 212	ZIC2	7546	4.59
9	IMAGE:88451	AA629991	KIAA1946	KIAA1946	165215	4.569
10	IMAGE:38266	AA069414::A	Glia fibrillary acidic protein	GFAP	2670	4.549
11	IMAGE:50636	H17923::H17	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2B	CAMK2B	816	4.535
12	IMAGE:45776	H08780::H08	Amphiphysin 1	AMPH	273	4.526
13	IMAGE:64736	AA199717::A	Microtubule-associated protein 2	MAP2	4137	4.526
14	IMAGE:40696	R55798::R55	N-ethylmaleimide-sensitive factor	NAPB	63908	4.503
15	IMAGE:24461	N54901	Fibronectin type 5 domain 5	FNDC5	252995	4.444
16	IMAGE:44566	H05445::H05	Growth associated protein 43	GAP43	2596	4.44
17	IMAGE:39186	R54443::R54	Dynein, cytoplasmic 111	DYNC111	1780	4.385
18	IMAGE:29826	N70841::N70	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta 1	GABBR1	2550	4.352
19	IMAGE:23066	A1650713	Stathmin-like protein 2	STMN2	11075	4.34
20	IMAGE:24326	A1885314	Bassoon (pre-BSDN)	BSN	8927	4.307
21	IMAGE:18817	A1290868	Transcribed locus			4.291
22	IMAGE:78486	AA447618::A	Interneurin 1A	INA	9118	4.263
23	IMAGE:52316	H23162::H23	Carbonic anhydrase 1	CA10	56934	4.238
24	IMAGE:66936	AA236793::A	CDNA DKFZp547P042 (from clone)			4.215
25	IMAGE:28036	N49273::N49	Sodium channel 2A2	SCN2A2	6326	4.178
26	IMAGE:82536	AA504496::A	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2B	CAMK2B	816	4.151
27	IMAGE:39446	R51617::R51	G protein-coupled receptor 158	GPR158	57512	4.149
28	IMAGE:16696	A1056507	SRX (sex-specific)	SOX2	6657	4.093
29	IMAGE:33621	R44090::R44	KIAA0789 gene	KIAA0789	9671	4.091
30	IMAGE:51346	H21040::H21	Chromosome 14orf132		56967	4.08
31	IMAGE:49926	H28986::H28	Brain and testis 2	BAALC	79870	4.046
32	IMAGE:37406	R49695::R49	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha 1	GABRA1	2554	4.03
33	IMAGE:20986	A1421603	ATPase, calcium-transporting 2B2	ATP2B2	491	4.017
34	IMAGE:71366	AA284329::A	Glycoprotein 66B	GPM6B	2824	3.999
35	IMAGE:34076	W56303::W56	KIAA0802	KIAA0802	23255	3.99
36	IMAGE:25166	A1968032	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta 2	GABBR2	9568	3.988
37	IMAGE:26566	N25344::N25	Transcription factor 7	TCEAL7	56849	3.987
38	IMAGE:32516	W49799::W49	Taglin 3	TAGLN3	29114	3.986
39	IMAGE:29946	R42395::R42	Fibroblast growth factor 1	FGF1	2246	3.948
40	IMAGE:19476	A1339352	Synaptotagmin 4	SYT4	6860	3.942
41	IMAGE:24486	A1923970	Cathepsin F	CTSF	8722	3.906
42	IMAGE:28901	N62735::N62	Sodium channel 2A2	SCN2A2	6326	3.898
43	IMAGE:83816	AA457374::A	Stearyl-CoA-dependent	SCD5	79966	3.858
44	IMAGE:18406	H28119::H28	Amyloid beta protein	APBB1	322	3.855
45	IMAGE:87806	AA775405	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta 2	GABBR2	9568	3.841
46	IMAGE:23356	R38700::R38	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha 6	GABRA6	2559	3.841
47	IMAGE:22386	A1631139	CDNA FLJ114	DNM3	26052	3.837
48	IMAGE:46286	H09111::H09	Furry homolog	FRY	10129	3.833

FIGURA 25 - PLANILHA PARCIAL, ESTRUTURADA COM DADOS DE EXPRESSÃO GÊNICA E DE INTERAÇÕES PROTÉICAS DE CÉREBRO UTILIZADA PARA ALIMENTAR O PROGRAMA *MATISSE*.

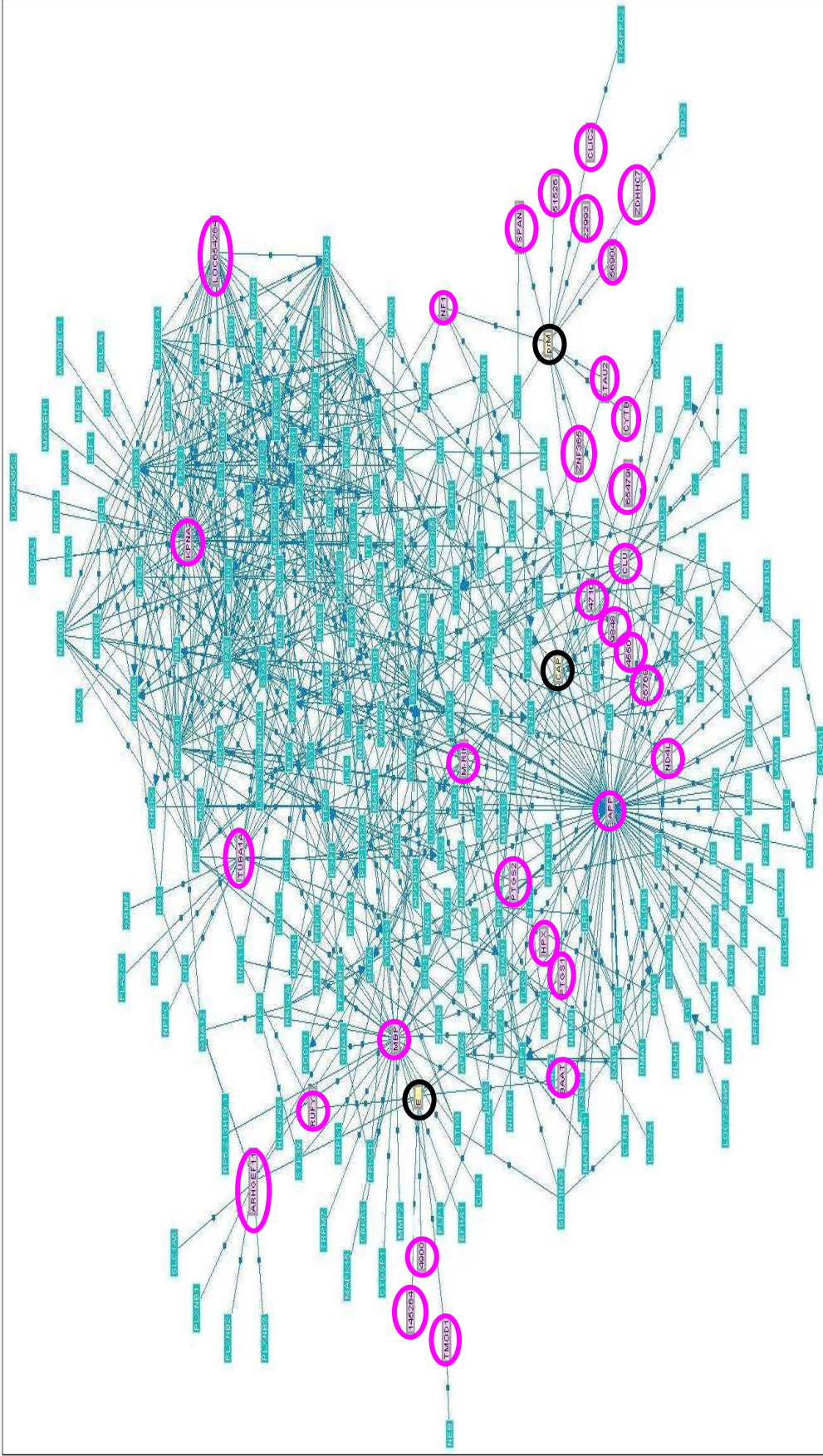


FIGURA 26 - PROGRAMA MATISSE: REDE GERADA PELO CRUZAMENTO DE DADOS DE EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS INFECTADAS COM VÍRUS DA DENGUE COM OS DADOS DE INTERAÇÕES PROTÉICAS OBTIDOS NO DUPLO-HÍBRIDO COM cDNA DE CÉLULAS DE CÉREBRO. CÍRCULOS PRETOS INDICAM OS GENES ESTRUTURAIS DO VÍRUS DA DENGUE; CÍRCULOS EM ROSA RESSALTAM AS PROTEÍNAS DE CÉREBRO CUJA INTERAÇÃO FOI IDENTIFICADA PELA TÉCNICA DE DUPLO-HÍBRIDO. RETÂNGULOS TURQUESA REPRESENTAM OS GENES DE CÉREBRO CUJA EXPRESSÃO ENCONTRAVA-SE AUMENTADA NA TÉCNICA DE MICROARRANJO E QUE MOSTRARAM INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS HUMANAS E AS VIRÁIS.

As redes de interação podem ser compreendidas como várias camadas de elementos interagindo entre si. Por exemplo, a camada mais interna interage com aquela adjacente a ela, e assim por diante. No programa *Matisse* podem ser observadas várias camadas da rede. A FIGURA 27 ilustra pelo menos três delas, onde a primeira camada corresponde às proteínas virais que interagem entre si; a segunda corresponde àquela construída com os dados do duplo-híbrido, ou seja, as interações encontradas entre as proteínas virais e as proteínas humanas de cérebro.

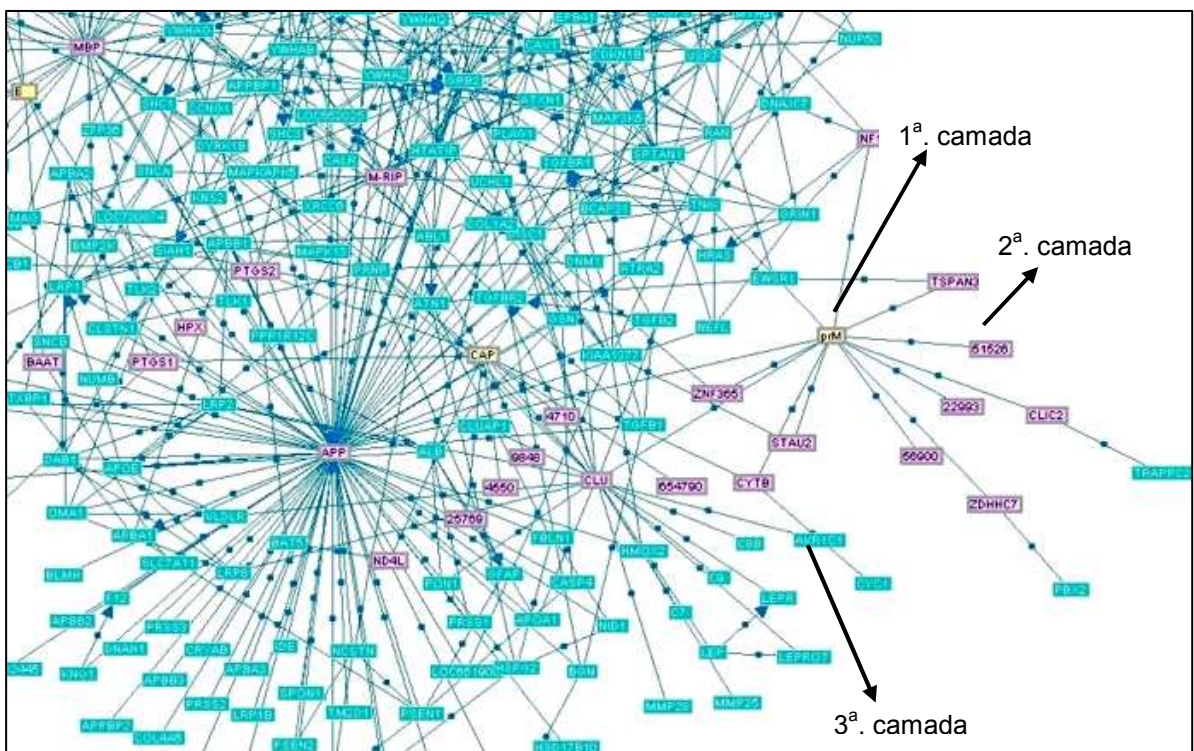


FIGURA 27 - REDE PARCIAL GERADA NO MATISSE, MOSTRANDO AS DISTINTAS CAMADAS PRESENTES NA REDE. 1ª. CAMADA (AMARELO): PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DO VÍRUS DA DENGUE. 2ª. CAMADA (ROSA): PROTEÍNAS HUMANAS QUE INTERAGIRAM COM AS PROTEÍNAS VIRAIS NO DUPLO-HÍBRIDO. 3ª. CAMADA (AZUL): PROTEÍNAS HUMANAS QUE APRESENTARAM ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO GÊNICA E QUE INTERAGIRAM COM AS PROTEÍNAS HUMANAS DA 2ª. CAMADA.

Já a terceira camada corresponde às proteínas cuja expressão estava alterada no microarranjo de DNA e que, por sua vez, interagiram com as proteínas de cérebro encontradas no duplo-híbrido. A quarta camada corresponde

às proteínas identificadas no microarranjo que interagem com as proteínas da segunda camada, e assim por diante.

A rede obtida no *Matisse* foi, então, exportada para o programa *Cytoscape*, visto que este é um programa que possui um número maior de ferramentas para análise de dados. Necessário se faz esclarecer que foram importados apenas os genes com expressão alterada no microarranjo (FINK, *et al*, 2007) que interagiram diretamente com as proteínas humanas identificadas no duplo-híbrido (FIGURAS 28 e 29).

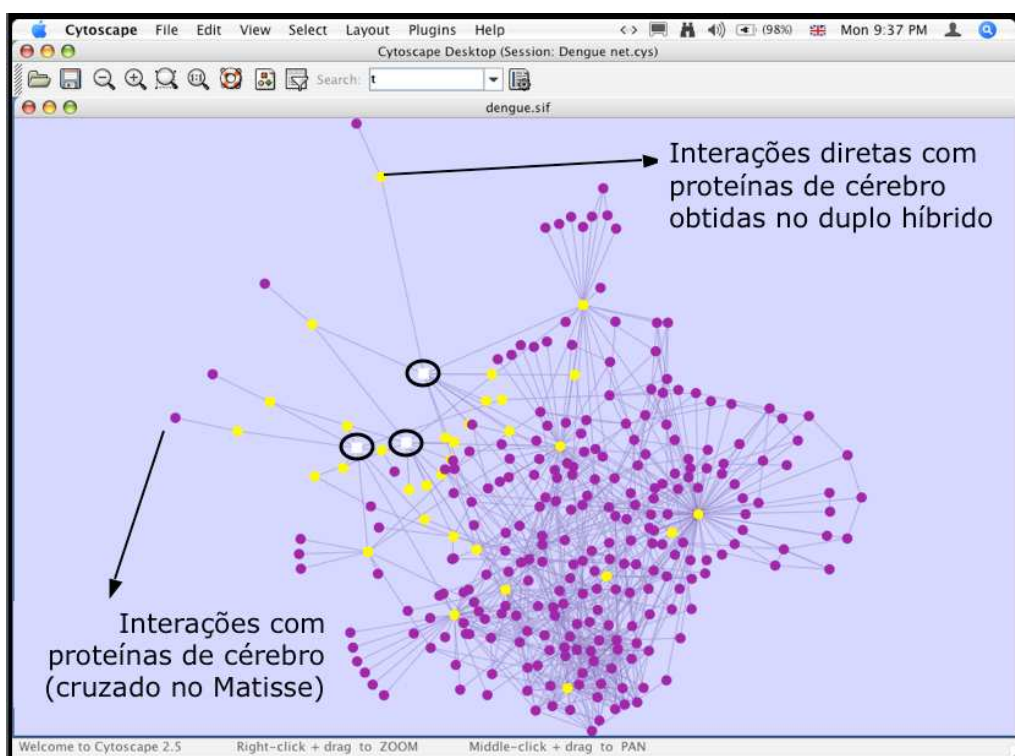


FIGURA 28 - REDE PARCIAL CONSTRUÍDA NO PROGRAMA *MATISSE* E EXPORTADA PARA O PROGRAMA *CYTOSCAPE* CONTENDO AS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO DUPLO-HÍBRIDO (AMARELO) E OS GENES COM EXPRESSÃO ALTERADA NO MICROARRANJO (ROXO) REALIZADO COM CÉLULAS INFECTADAS PELO VÍRUS DA DENGUE QUE INTERAGIRAM COM ESTAS. EM BRANCO AS PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DO VÍRUS DA DENGUE.

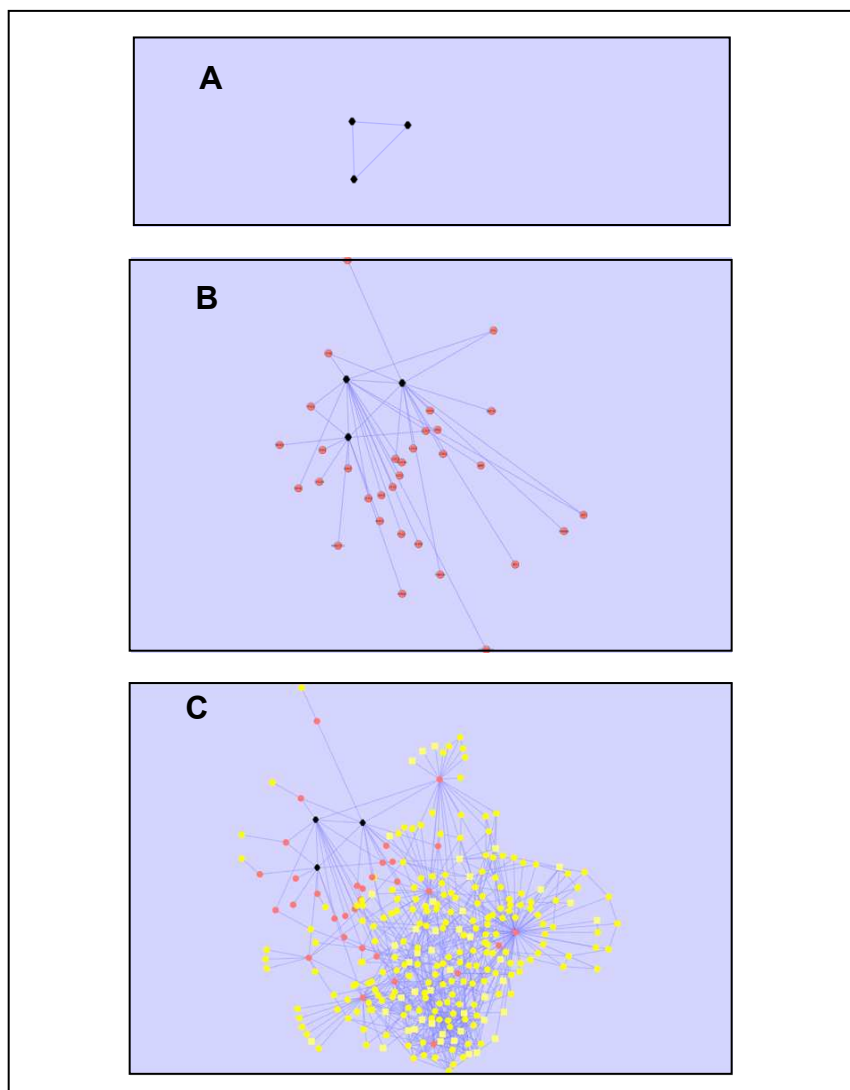


FIGURA 29 - PROGRESSÃO DAS CAMADAS DA REDE VISUALIZADA NO CYTOSCAPE. **A** – 1^a. CAMADA DA REDE GERADA NO MATISSE, FORMADA PELAS PROTEÍNAS DO VIRUS DA DENGUE. **B** – PROTEÍNAS HUMANAS ENCONTRADAS QUE INTERAGIRAM COM AS PROTEÍNAS VIRAIS NO DUPLO-HÍBRIDO. **C** – EM AMARELO, AS PROTEÍNAS QUE TIVERAM A EXPRESSÃO ALTERADA NO MICROARRANJO E QUE INTERAGIRAM COM A 2^a. CAMADA DA REDE.

Análise do grupo de proteínas humanas encontradas no duplo-híbrido com as quais o vírus interage e o grupo de genes cuja expressão encontrava-se alterada no microarranjo, foi possível perceber que tais grupos divergem totalmente entre si (ANEXOS 1 e 2) e questões e hipóteses puderam ser

formuladas. Por exemplo, o fato do conjunto de dados divergir entre si pode indicar que, ao entrar na célula hospedeira, o vírus interaja apenas com as proteínas já presentes na célula no momento da infecção, sem causar ativação da expressão de genes envolvidos na resposta anti-viral neste primeiro momento. Tal resposta seria ativada posteriormente, e as proteínas envolvidas então seriam distintas daquelas presentes na célula no momento inicial da infecção.

Muitas das proteínas celulares que são moduladas na resposta anti-viral, apresentam certo nível de expressão basal. Ao se analisar os dados do microarranjo realizado com linhagens celulares infectadas com o vírus da Dengue e os dados obtidos no duplo-híbrido (ANEXOS 1 e 2), foi interessante notar que as proteínas estruturais do vírus não interagiram com nenhuma destas proteínas. Ao contrário, os dados obtidos mostraram que as proteínas virais interagiram apenas com aquelas que não sofreram alteração na expressão gênica durante o processo de infecção.

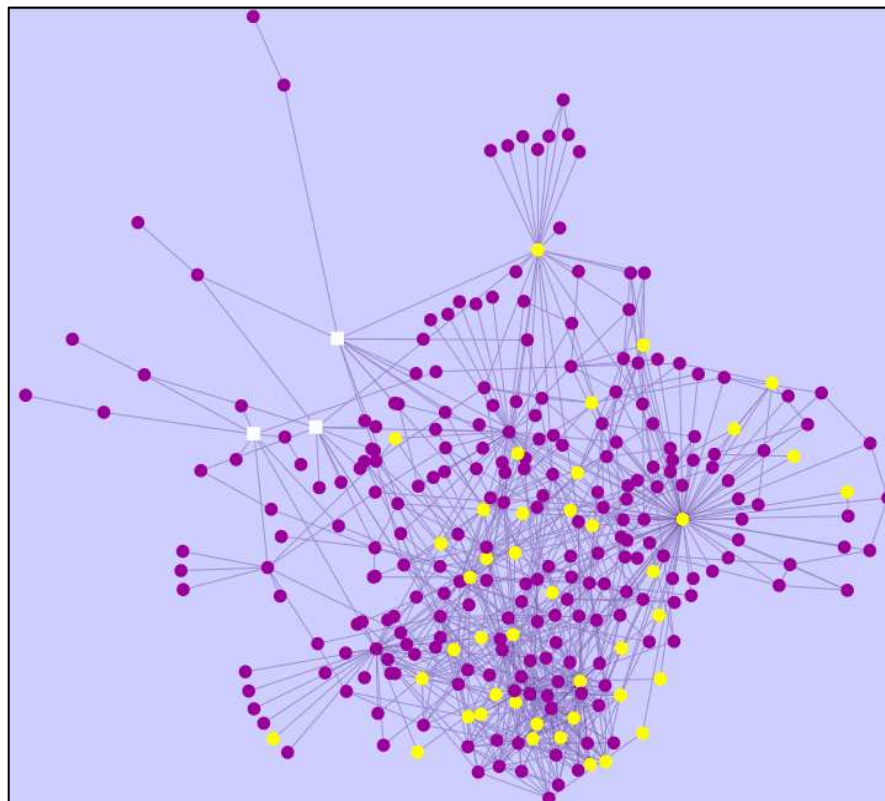
Outras questões podem ainda ser levantadas, como por exemplo, por que o vírus não interagiria com proteínas cuja expressão altera-se em resposta a infecção da célula? Sabendo-se que, muitas vezes, a expressão de uma proteína altera-se em resposta a estímulos externos, como por exemplo, sinais celulares ou patógenos (GERLIER, VALENTIN; 2009), seria esta uma forma de escape imune do vírus da Dengue, onde o mesmo evitaria interagir com proteínas cuja expressão altera-se em resposta a presença de patógenos? Bem, é possível que o vírus atue desta forma, na tentativa de evadir o sistema imune celular. Para tanto, interagiria com proteínas da célula, a fim de utilizá-las a seu favor, ou para limitar a atuação das mesmas, a fim de que não ocorra uma resposta anti-viral logo no início da infecção ou, ainda, para inibir a função de algumas proteínas celulares cruciais na identificação do vírus pela célula. Seguindo este raciocínio, pode-se sugerir que a resposta anti-viral ocorreria em um momento tardio, após o reconhecimento do vírus pela célula hospedeira. A expressão das proteínas envolvidas nesta resposta seriam aumentadas ou ativadas, as quais, por sua vez, atuariam na tentativa de eliminar o vírus.

No *Cytoscape*, foi possível visualizar e identificar de maneira gráfica mais clara os módulos funcionais, uma vez que o *Cytoscape* permite também a importação de dados do *Gene Ontology*. Os módulos funcionais com valor

estatístico significativo para um $p > 10^{-20}$ foram analisados, a fim de encontrar aqueles que possam ter relação com a resposta anti-viral ou com a evasão do vírus de tal resposta. Neste contexto, dentre identificou-se o módulo da apoptose, com $p = 10^{-23}$ (FIGURA 30). A Tabela 4 ressalta as proteínas envolvidas neste módulo funcional, sendo que as proteínas estruturais do vírus interagem diretamente com duas delas, APP e CLU. Este módulo é interessante do ponto de vista do presente trabalho, visto que para o vírus não é interessante causar apoptose na célula que está sendo infectada, pelo menos nos primeiros momentos da infecção, pois com isso não poderia se replicar e produzir novas partículas virais.

Em busca de compreender qual o tipo de interação funcional que as proteínas estruturais do vírus da Dengue faz com as proteínas identificadas neste módulo, as seqüências das três proteínas estruturais, Cap, Env e prM, foram submetidas a análise de seqüências do BLAST, a fim de identificar motivos relacionados a funções já conhecidas em outras proteínas.

Nesta análise, a seqüência da proteína de Membrana (presente nas formas maduras do vírus após a clivagem de prM) apresentou similaridade com a da proteína *Bcl-2* humana com função anti-apoptótica em humanos, *Bcl-2* (FIGURA 31) tendo-se como relevante o fato de que a família de proteínas *Bcl-2* possui membros tanto com função anti-apoptótica como pró-apoptótica. Neste contexto, os vírus parecem ter evoluído de forma a infectar células hospedeiras com sucesso, uma vez que dependem destas para se reproduzir e formar novas partículas virais. Assim, neste processo de evolução, é possível que os vírus tenham mimetizado a função de algumas proteínas celulares, com o intuito de burlar ou evadir a resposta anti-viral da célula ou apenas retardar a mesma para que tivessem tempo suficiente para a produção de novas partículas virais antes da célula iniciar o processo de eliminação do vírus ou de morte celular.



Gene	GENE ID	Gene	GENE ID	Gene	GENE ID	Gene	GENE ID
ABL1	25	CASP8	841	NOL3	8996	SNCA	6622
ALB	213	*CLU	1191	PRKCA	5578	STAT1	6772
APOE	348	COL4A3	1285	PRKCZ	5590	STK4	6789
*APP	351	HDAC1	3065	PSEN1	5663	TGFB1	7040
APPBP1	8883	HTRA2	27429	PSEN2	5664	TNFRSF1A	7132
BCAP31	10134	IKBKG	8517	RELA	5970	TNFRSF1B	7133
BRCA1	672	IL1A	3552	RIPK1	8737	TP53BP2	7159
C8B	732	KNG1	3827	RIPK2	8767	TRADD	8717
C9	735	MAP3K5	4217	RIPK3	11035	TRAF1	7185
CASP2	835	MAPK1	5594	ROCK1	6093	TRAF2	7186
CASP4	837	NFKBIA	4792	SIAH1	6477	YWHAG	7532

* Proteínas envolvidas em morte celular que interagem diretamente com o as proteínas estruturais prM e/ou Cap.

FIGURA 30 - REDE VISUALIZADA NO CYTOSCAPE RESSALTANDO, EM AMARELO, AS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO MÓDULO FUNCIONAL DA APOPTOSE, IDENTIFICADAS NA TABELA.

Ainda, é possível que nas infecções causadas pelo vírus da Dengue, esta proteína identificada com a presença de um domínio Bcl-2 anti-apoptótico na proteína de Membrana interaja com proteínas celulares no momento da entrada na célula, e iniba ou retarde a resposta apoptótica. Ou ainda, que a proteína de Membrana “seqüestre” ou mantenha “presa” as proteínas celulares envolvidas no processo de apoptose, impedindo a ativação deste nos primeiros momentos da infecção viral.



Pfam-A	Description	Entry type	Sequence		HMM		Bits score	E-value	Alignment mode	Show/hide alignment
			Start	End	From	To				
Flavi_propep	Flavivirus polyprotein propeptide	Family	1	86	1	88	200.7	3.5e-57	ls	Show
Avian_gp85	Avian retrovirus envelope protein, gp85	Family	69	88	242	261	3.6	0.42	fs	Show
Flavi_M	Flavivirus envelope glycoprotein M	Family	88	162	1	75	167.0	4.9e-47	ls	Show
Bcl-2	Apoptosis regulator proteins, Bcl-2 family	Family	99	113	92	107	6.5	0.0095	fs	Hide

#HMM *->lkenilaeWiqenGGW<-*

#MATCH 1+++ +++W+ + G W

#SEQ LETR-TEIWMSEGAW 113

FIGURA 31 - NA BUSCA POR DOMÍNIOS UTILIZANDO A SEQUÊNCIA DA PROTEÍNA DE MEMBRANA DO VÍRUS DA DENGUE, OBSERVOU-SE SIMILARIDADE COM O DOMÍNIO ANTI-APOPTÓTICO PRESENTE NA PROTEÍNA *Bcl-2* DE HUMANOS.

Alguns vírus causam inibição da apoptose nas células hospedeiras em favor da sua própria replicação, como ocorre, por exemplo, com o vírus causador do Sarcoma de Kaposi, ou KSV (*Kaposi sarcoma virus*), e o Virus Epstein-Barr (EBV) (CHENG, *et al*, 1997; LY, *et al*, 2006). A fim de investigar a presença deste mesmo módulo em outros vírus e observando-se que o domínio é pequeno e espaçado, alinhou-se uma seqüência da proteína de Membrana do vírus da Dengue com as dos vírus da Herpes, do sarcoma de *Kaposi* e da proteína *Bcl-2* humana utilizando-se o programa *Clustal W*, disponível *on line* no sitio www.ebi.ac.uk/clustalw/. Os resultados deste alinhamento estão apresentados na FIGURA 32.

Os vírus causadores do Sarcoma de *Kaposi* e da Herpes, que possuem funções sabidamente anti-apoptóticas, apresentam o mesmo domínio *Bcl-2* identificado na proteína estrutural de Membrana do vírus da Dengue. Pela análise dos resultados obtidos e, neste contexto de similaridade, é possível sugerir que o vírus da Dengue iniba a resposta apoptótica da célula hospedeira nos estágios iniciais da infecção, a fim de evadir ou retardar o processo de morte da célula hospedeira.

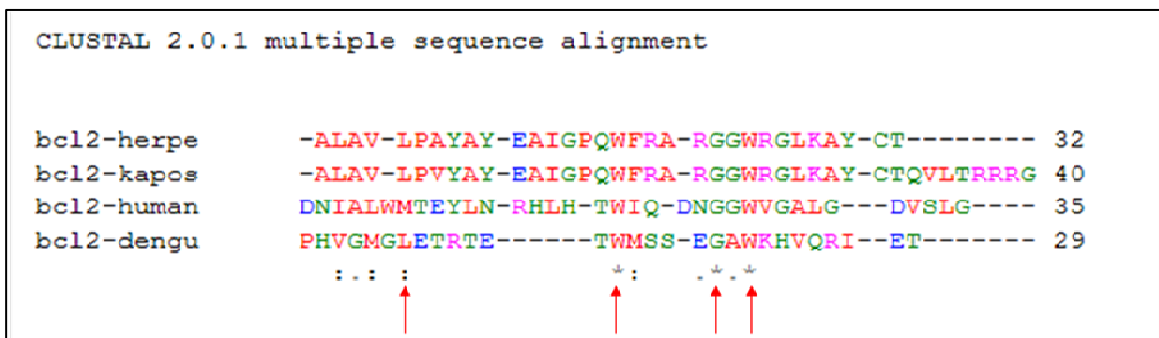


FIGURA 32 - ALINHAMENTO COM MÚLTIPLAS SEQÜÊNCIAS REALIZADO NO PROGRAMA *Clustal W*, QUE POSSIBILITOU IDENTIFICAR O MESMO DOMÍNIO ANTI-APOPTOTICO Bcl-2 ENCONTRADO NA PROTEINA DE MEMBRANA DO VIRUS DA DENGUE NOS VIRUS CAUSADORES DA HERPES E DO SARCOMA DE KAPOSI.

Estes resultados são apenas preliminares e necessitam de uma série de validações biológicas, a fim de confirmar (ou refutar) as hipóteses levantadas. Para tanto, tem-se a intenção de utilizar RNA de interferência (RNAi) para inibir a função de algumas das proteínas identificadas na rede, a fim de se buscar a essencialidade destas em diversos processos, como na entrada do vírus na célula hospedeira, na replicação viral, na formação de novas partículas virais e, também, confirmar a ação anti-apoptótica da proteína de Membrana na célula hospedeira.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho fundamentou-se na construção do interatoma entre as proteínas estruturais Capsídeo, Envelope, pré-Membrana do vírus da Dengue e as das células de cérebro e fígado humanos, utilizando o método de duplo-híbrido em bactérias para a obtenção dos dados, o qual possibilitou a identificação de 25 e 16 proteínas humanas, respectivamente.

Comparação com dados da literatura possibilitou a identificação de proteínas com funções interessantes como, por exemplo, a interação de Cap e prM com Clusterina, proteína cujas funções aparentam estar envolvidas na inibição da apoptose em células cancerosas e na ativação do sistema complemento. Outras proteínas como COX-1, COX-2 e COX-3 (envolvidas na resposta inflamatória) e Plasminogênio (com função inibidora de apoptose) são de interesse visto que interagem diretamente com proteínas estruturais do vírus da Dengue e estão relacionadas a processos que envolvem hemocinética e as respostas imune e inflamatória.

O tipo de abordagem holística utilizada, que contempla o processo de infecção viral como um todo, possibilitou questionamentos que não seriam possíveis de outra maneira. Ou seja, permitiu analisar os processos celulares de forma integrada e, assim, visualizá-los e compreendê-los sob novos ângulos.

Com o intuito de inserir os dados obtidos por duplo-híbrido no contexto celular de infecção, estes foram cruzados com dados de expressão gênica de células infectadas pelo vírus da Dengue. Através da análise da rede gerada, foi possível identificar módulos funcionais com valor estatístico significativo que apresentavam funções relacionadas à resposta da célula frente à infecção viral. Um desses módulos envolve o processo de apoptose, despertando grande interesse do ponto de vista do presente trabalho.

Outras análises foram realizadas a fim de aumentar o entendimento da ligação deste processo celular e a atuação do vírus da Dengue nas células hospedeiras humanas. As sequências das proteínas estruturais do vírus, Cap, prM e Env, foram analisadas, o que possibilitou a identificação de um domínio

anti-apoptótico *Bcl-2*, também presente em outros vírus cujos proteomas contém proteínas com função sabidamente anti-apoptótica, como o HHV8 e o EBV.

Estes resultados geraram questões importantes, que devem ser estudadas em detalhes, a fim de validá-las ou não. Dentre elas, destacaram-se as hipóteses de que o vírus da Dengue apresentaria funções anti-apoptótica e pró-hemorragica nos momentos iniciais da infecção das células hospedeiras humanas. Sem duvidas, esses resultados são encorajadores e estimulam a realização de diversos ensaios pertinentes, incluindo a técnica de RNA de interferência (RNAi), por exemplo, para sua validação.

6. REFERÊNCIAS

- ALBERT, R. 2005. Scale-free networks in cell biology. *J Cell Sci*, v.118, p.4947-57.
- BARABASI, A. L.; OLTVAI, Z. N. 2005. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet*, v.5, p.101-13.
- BELL, G. W.; LEWITTER, F. 2006. Visualizing networks. *Methods Enzymol*, v.411, p.408-21.
- BREITKREUTZ, B. J.; STARK, C.; TYERS, M. 2003. The GRID: the general repository for interaction datasets. *Genome Biol*, v.4, p.r23.
- CAM B. V., FONSMARK L., HUE N. B., PHUONG N. T., POULSEN A., HEEGAARD E. D. 2001. Prospective case-control study of encephalopathy in children with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*, v.6, p.848-51.
- CHENG E. H., NICHOLAS J., BELLOWES D. S., HAYWARD G. S., GUO H. G., REITZ M. PS., HARDWICK JM. 1997. A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.94, p.690-4.
- CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. 2006. Recent advances in deciphering viral and host determinants of Dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol*, v.80, p.11418-31.
- Dengue*. 2007. Disponível em: <www2.prefeitura.sp.gov.br>. Acesso em 04 de janeiro de 2008.
- Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever*. Geneva, 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/ith/en/>> Acesso em 14 de dezembro de 2008.
- DOVE, S. L.; JOUNG, J. K.; HOCHSCHILD, A. 1997. Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein-protein contacts. *Nature*, v.386, p.627-30.
- FINK, J.; GU, F.; VASUDEVAN, S. G. 2006. Role of T cells, cytokines and antibody in Dengue fever and Dengue haemorrhagic fever. *Rev Med Virol*, v.16, p.263-75.
- FINK, J., GU, F., LING, L., TOLFVENSTAM, T., OLFAT, F., CHUANG, K. C., AW, P., GEORGE, J., KUZNETSOV, V. A., Schreiber, M., Vasudevan, S. G., Hibberd, M. L. 2007. Host gene expression profiling of Dengue virus infection in cell lines and patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 1, p. 1-11
- GE, H.; WALHOUT, A. J.; VIDAL, M. 2003. Integrating 'omic' information: a bridge between genomics and systems biology. *Trends Genet*, v.19, p.551-60.
- GERLIER, D., VALENTIN H. 2009. Measles virus interaction with host cells and impact on innate immunity. *Curr Top Microbiol Immunol*, v.329, p.163-91.
- GUBLER, D. J. 1998. Dengue and Dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*, v.11, p.480-96.
- HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. 1990. The Dengue viruses. *Clin Microbiol Rev*, v.3, p.376-96.

- JONES R. *Systems biology*. São Francisco, agosto, 2004. Disponível em: <<http://www.macdevcenter.com/pub/a/mac/2004/08/20/bioinformatics.html>> Acesso em: 14 de maio de 2007.
- KINNEY, R. M.; BUTRAPET, S.; CHANG, G. J.; TSUCHIYA, K. R.; ROEHRIG, J. T.; BHAMARAPRAVATI, N.; GUBLER, D. J. 1997. Construction of infectious cDNA clones for Dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology*, v.230, p.300-8.
- KITANO, H. 2002a. Computational systems biology. *Nature*, v.420, p.206-10.
- KITANO, H. 2002b. Systems biology: a brief overview. *Science*, v.295, p.1662-4.
- KOCH-BRANDT C., MORGANS C. 1996. Clusterin: a role in cell survival in the face of apoptosis? *Prog Mol Subcell Biol*. v.16, p.130-49.
- KOHN, K. W. 1999. Molecular interaction map of the mammalian cell cycle control and dna repair systems. *Mol Biol Cell*, v.10, p.2703-34.
- KURANE, I.; TAKASAKI, T. 2001. Dengue fever and Dengue haemorrhagic fever: challenges of controlling an enemy still at large. *Rev Med Virol*, v.11, p.301-11.
- LI LY, LIU MY, SHIH HM, TSAI CH, CHEN JY. 2006. Human cellular protein VRK2 interacts specifically with Epstein-Barr virus BHRF1, a homologue of Bcl-2, and enhances cell survival. *J Gen Virol*, v.87, p.2869-78
- MALAVIGE, G. N.; FERNANDO, S.; FERNANDO, D. J.; SENEVIRATNE, S. L. 2004. Dengue viral infections. *Postgrad Med J*, v.80, p.588-601.
- MELINO, S.; PACI, M. 2007. Progress for Dengue virus diseases. Towards the NS2B-NS3pro inhibition for a therapeutic-based approach. *FEBS J*. n.12, p.2986-3002.
- MERI S, JARVA H. 1998. Complement regulation. *Vox Sang* v.2, p.291-302.
- MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S. C. 2003. A LIGAND-BINDING pocket in the Dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.100, p.6986-91.
- MOLÉS, J. P.; SCHILLER, J. T.; TESNIERE, A.; LEIGH, I. M.; GUILHOU, J. J.; SEGUIN, N. B. 1994. Analysis of HPV16 E6 and mutant p53-transfected keratinocytes in reconstituted epidermis suggests that wild-type p53 inhibits cytokeratin 19 expression. *J Cell Sci*, v.107, p.411-435.
- MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. 2005. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*, v.3, p.13-22.
- PEREIRA, M; SANTUCCI, S. G. *Doenças: Dengue*. São Paulo, 2000. Disponível em <http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/Dengue_f_amarela/texto_Dengue_pro.htm> Acesso em 29 de agosto de 2007.
- POKIDYSHEVA, E.; ZHANG, Y.; BATTISTI, A. J.; BATOR-KELLY, C. M.; CHIPMAN, P. R., XIAO, C.; GREGORIO, G. G.; HENDRICKSON, W. A.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. 2006. Cryo-em reconstruction of Dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell*, v.124, p.485-93.

- RIGAU-PEREZ, J. G.; CLARK, G. G.; GUBLER, D. J.; REITER, P.; SANDERS, E. J.; VORNDAM, A. V. 1998. Dengue and Dengue haemorrhagic fever. *Lancet*, v.352, p.971-7.
- SCHEFFNER, M.; MUNGER, K.; HUIBREGTSE, J. M.; HOWLEY, P. M. 1992. Targeted degradation of the retinoblastoma protein by human papilloma virus E7 – E6 fusion proteins. *EMBO J*, v.11, p.2425-31.
- SCHNEIDER DJ, CHEN Y, SOBEL BE. 2008. The effect of plasminogen activator inhibitor type 1 on apoptosis. *Thromb Haemost*, n.100, p.1037-40.
- SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N. S.; WANG, J. T.; RAMAGE, D.; AMIN, N.; SCHWIKOWSKI, B.; IDEKER, T. 2003. CYTOSCAPE: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*, v.13, p.2498-504.
- STARK, C.; BREITKREUTZ, B. J.; REGULY, T.; BOUCHER, L.; BREITKREUTZ, A.; TYERS, M. 2006. BIOGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res*, v.34, p.d535-9.
- STERR, S. A.; CORBETT, J. A. 2003. The role of COX-2 during viral infection. *Viral Immunol*, v.16, p.447-60.
- TROUGAKOS IP, LOURDA M, ANTONELLOU MH, KLETSAS D, GORGOULIS VG, PAPASSIDERI IS, ZOU Y, MARGARITIS LH, BOOTHMAN DA, GONOS ES. 2009. Intracellular clusterin inhibits mitochondrial apoptosis by suppressing p53-activating stress signals and stabilizing the cytosolic Ku70-Bax protein complex. *Clin Cancer Res*, v.15; p.48-59.
- TSCHOPP, J.; FRENCH, L. E. 1994. Clusterin: modulation of complement function. *Clin Exp Immunol*, v.2, p.11-4.
- ULITSKY I., SHAMIR R. Identification of functional modules using network topology and high-throughput data. *BMC Syst Biol*, v.1, p.1-17.
- VIDAL, M. 2005. Interactome modeling. *FEBS Lett*, v.579, p.1834-8.
- Virus classification*. 2009. Disponível em: <http://www.bio-medicine.org/biology-definition/Virus_classification/>. Acesso em 02 de fevereiro de 2009.
- WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P.; MURPHY, B. R. 2007. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature Rev Microbiol*, v.5, p.518-28.
- WU, S. J.; GROUARD-VOGEL, G.; SUN, W.; MASCOLA, J. R.; BRACHTEL, E.; PUTVATANA, R.; LOUDER, M. K.; FILGUEIRA, L.; MAROVICH, M. A.; WONG, H. K.; BLAUVELT, A.; MURPHY, G. S.; ROBB, M. L.; INNES, B. L.; BIRX, D. L.; HAYES, C. G.; FRANKEL, S. S. 2000. Human skin Langerhans cells are targets of Dengue virus infection. *Nat Med*, v.6, p.816-20.
- ZHANG H., KIM J.K., EDWARDS C.A., XU Z., TAICHMAN R., WANG C.Y. 2005. Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated BAX. *Nat Cell Biol*, n.9, p.909-15
- ZHU, X.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. 2007. Getting connected: analysis and principles of biological networks. *Genes Dev*, v.21, p.1010-24.

7. ANEXOS

ANEXO 1: GENES COM EXPRESSÃO ALTERADA NO MICROARRANJO REALIZADO COM CÉLULAS HUMANAS INFECTADAS PELO VÍRUS DA DENGUE.

Número	Gene	GENE ID
1	CCL4	NM_002984
2	CCL5	NM_002985
3	IP10	NM_001565
4	I-TAC	NM_005409
5	IL11b	NM_000881
6	IL8	NM17017
7	NFKBIA	NM_020529
8	NFKBIB	NM_002503
9	TNFAIP	NM_006290
10	ATF3	NM_004024
11	G1P2	NM_005101
12	G1P3	NM_002038
13	IFI44	NM_006417
14	IFIT1	NM_001548
15	IFIT2	AF026944
16	IFIT3-1	AF026943
17	IFIT3-2	NM_001549
18	IFNB1	NM_002176
19	ISGF3G	NM_006084
20	MX1	NM_002462
21	OAS1	NM_016816
22	OAS2	NM_002535
23	OAS3	NM_006187
24	OASL	AF063611
25	VIPERIN-1	AF026941
26	VIPERIN-2	AF026942
27	IER3	NM_003897

28	IFIH	AL080107
29	IFIT5	NM_012420
30	IFRG28	AJ251832
31	MDA5	AF095844
32	SP110	NM_004510
33	STAT1-1	AK022231
34	STAT1-2	NM_007315
35	BIRC3	NM_001165
36	C17orf27	AB046774
37	DTX3L	AK025135
38	HERC5	NM_016323
39	HERC6	NM_017912
40	PSMB9	NM_002800
41	RNF36	AL360161
42	UBE2L6	NM_004223
43	USP15	AF106069
44	USP18	NM_017414
45	AB037725	AB037725
46	AF086367	AF086367
47	AGR2	NM_006408
48	AK000877	AK000877
49	AK021733	AK021733
50	AK021936	AK021936
51	AL049423	AL049423
52	AL110204	AL110204
53	ATP6B1	NM_001692
54	B2M	NM_004048
55	BG610654	AK000422
56	BHLHB2	NM_003670
57	BST2	NM_004335
58	BTBD2	NM_017797
59	BTG3	NM_006806

60	C14orf161	AK024360
61	C15ORF2	NM_018958
62	CBFA1	AF053952
63	CHEK2	NM_007194
64	CITED2	NM_006079
65	CNN1	NM_001299
66	D17210	D17210
67	DAAM1	AB014566
68	DDX58	NM_014314
69	DUSP1(1)	AJ227912
70	DUSP1(2)	NM_004417
71	EGR1	NM_001964
72	ENSest7951	ENSest7951
73	FIP2	AF061034
74	FLJ11021	AK001883
75	FLJ20035	AK001649
76	FLJ20156	NM_017691
77	FLJ22761	AK026414
78	FLJ34585	AK022228
79	FOS(1)	NM_005252
80	FOS(2)	NM_005252
81	GADD45A	NM_001924
82	GEM	NM_005261
83	GENX-3414	NM_003943
84	GHRGV9A	AF230800
85	H1F2	NM_005319
86	HEY1	NM_012258
87	HSP70B	NM_002155
88	HSPA1B	NM_005346
89	HSPF1	NM_006145
90	IER5	NM_016545
91	IGFBP6	M62402

92	ITGB3	NM_000212
93	JUN(1)	NM_002228
94	JUN(2)	NM_002228
95	KIAA0590	AK023912
96	KIAA1404	AK023836
97	KLF6(1)	AL117595
98	KLF6(2)	NM_001300
99	KRT17	NM_000422
100	KYNU	NM_003937
101	LBA1	AB002340
102	LGP2	AK021416
103	LOC283737	AL133446
104	LOC93082	AL389981
105	LPIN1	D80010
106	LRRN3	AL442092
107	LY6E(1)	NM_002346
108	LY6E(2)	NM_002346
109	MGC40405	AB046797
110	MGC45731	AK027019
111	PARP14	AB033094
112	PLK2	NM_006622
113	pLSB8	U03241
114	PMAIP1	D90070
115	PTTG1	NM_004219
116	RAB27A	NM_004580
117	REC8L1	NM_005132
118	RGS2	NM_002923
119	RND1	NM_014470
120	RRAD	NM_004165
121	SDCBP	NM_005625
122	SHB	NM_003028
123	SPAG9	NM_003971

124	SUMO2	NM_006937
125	TES	NM_015641
126	TNIP1	NM_006058
127	TOP1	J03250
128	TSPYL2	AF273046
129	TULP3	NM_003324
130	VIP	NM_003381
131	WBP5	NM_016303
132	ZC3HAV1	NM_020119

ANEXO 2: PROTEÍNAS HUMANAS QUE INTERAGIRAM COM AS PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DO VÍRUS NO DUPLO-HÍBRIDO

Número	Proteínas Humanas	GENE ID
1	APP	351
2	ARHGEF11	9826
3	BAAT	570
4	CLIC2	1193
5	CLU	1191
6	COX-1/COX-3	5742
7	CYTB	4519
8	COX-2	5743
9	HPX	3263
10	IPO13	9670
11	MBP	4155
12	MFAP3L	9848
13	M-RIP	23164
14	MTRNR2	4550
15	NCKX2	25769
16	NF1	4763
17	NRGN	4900
18	OCSR1	9943
19	PCP4L1	654790
20	SERPINA1	5265
21	TM4SF8	10099
22	TMOD1	7111
23	TUBA3	654264
24	ZNF365	22891

E SE TUDO ESTIVER
ERRADO...?



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)