



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
CURSO BIOMEDICINA

LUIZA MATTOS FERNANDES DE SOUSA

**CONSTRUÇÃO DE UM SISTEMA PLASMIDIAL PARA
DETECÇÃO ESPECÍFICA DO VÍRUS DA DENGUE EM
INFECCÃO DE LINHAGENS CELULARES**

SALVADOR – BA

2023

LUIZA MATTOS FERNANDES DE SOUSA

**CONSTRUÇÃO DE UM SISTEMA PLASMIDIAL PARA
DETECÇÃO ESPECÍFICA DO VÍRUS DA DENGUE EM
INFECÇÃO DE LINHAGENS CELULARES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Gustavo Regis da
Silva

SALVADOR – BA

2023

LUIZA MATTOS FERNANDES DE SOUSA

**CONSTRUÇÃO DE UM SISTEMA PLASMIDIAL PARA DETECÇÃO ESPECÍFICA
DO VÍRUS DA DENGUE EM INFECÇÃO DE LINHAGENS CELULARES**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina e aprovada em sua forma final pelo Curso de Biomedicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Salvador – BA, 11 de novembro de 2023.

Carlos Gustavo Regis da Silva

Prof. Dr. Carlos Gustavo Regis da Silva
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Cinthia Vila Nova Santana

Prof. Dra. Cinthia Vila Nova Santana
ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

Suzana Ramos Ferrer

Prof. Dra. Suzana Ramos Ferrer
ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

Dedico este trabalho a todos os que me ajudaram ao longo desta caminhada. Em especial minha mãe, amigos, professores e orientador.

AGRADECIMENTOS

A minha família por sempre me incentivar nos estudos e na minha graduação, a minha mãe por todo suporte e carinho nessa caminhada, aos meus professores por compartilhar os conhecimentos e acolhimento, ao meu orientador Carlos pelos dois anos na iniciação científica de muito aprendizado e conhecimento, aos meus amigos pelo apoio e torcida durante esses 4 anos.

*"A ciência é muito mais que um corpo de conhecimentos.
É uma maneira de pensar." Carl Sagan*

RESUMO

A infecção pelo vírus da dengue (DENV) representa um sério desafio para a saúde pública. Nos países tropicais e subtropicais, aproximadamente 3 bilhões de indivíduos estão em situação de vulnerabilidade à infecção pelo DENV. Ainda são necessárias ferramentas para auxiliar para melhor entender a biologia do DENV. Estratégias para a detecção de células infectadas *in vitro* com o DENV estão disponíveis. Entretanto, há limitações em sua utilização. Portanto, o objetivo deste trabalho é gerar uma construção plasmidial capaz de detectar o vírus da Dengue quando transfectada em células Vero. Para isso, uma construção correspondente a fita inversa e complementar (fita negativa) contendo a região 5' não traduzida, parte da sequência codificante, gene da proteína fluorescente verde e a região 3' não traduzida foram clonadas no plasmídeo pcDNA3.1 myc/his. Esse plasmídeo foi inserido por transfecção em células Vero. Após o processo de seleção, as células foram infectadas com DENV2 e não apresentaram fluorescência. Há pouco conhecimento sobre a replicação da fita negativa do DENV2, e algum elemento não descrito pode ser necessário para a permitir o funcionamento dessa construção plasmidial. O sistema de seleção por antibiótico também pode ter impactado na produção de proteína e, conseqüentemente, na construção plasmidial.

Palavras-chave: Dengue, enhanced green fluorescent protein (EGFP), Negative-Sense RNA Viruses.

RESUMO EM LÍNGUA ESTRANGEIRA
(ABSTRACT - inglês)

Dengue virus (DENV) infection poses a serious challenge to public health. In tropical and subtropical countries, approximately 3 billion individuals are vulnerable to DENV infection. Tools are still needed to better understand DENV biology. Strategies for the detection of infected cells with DENV *in vitro* are available. However, there are limitations in their use. Therefore, the aim of this work is to generate a plasmid construction capable of specifically detecting the DENV when transfected into Vero cells. To achieve this, a corresponding reverse and complementary strand (negative strand) containing the untranslated 5' region, part of the coding sequence, green fluorescent protein gene, and the untranslated 3' region were cloned into the pcDNA3.1 myc/his plasmid. This plasmid was introduced into Vero cells through transfection. After the selection process, the cells were infected with DENV2 but did not exhibit fluorescence. There is limited knowledge about the replication of the negative strand of DENV2, and some undescribed element may be necessary to enable the functioning of this plasmid construction. The antibiotic selection system may have also impacted protein production and, consequently, the plasmid construction.

Keywords: Dengue, enhanced green fluorescent protein (EGFP), Negative-Sense RNA Viruses.

SUMÁRIO

1. Artigo	10
2. Regras da revista	27

1. Artigo Científico

Construção de um sistema plasmidial para detecção específica do vírus da dengue em infecção de linhagens celulares.

AUTORES

Luiza Mattos Fernandes de Sousa ^{1,2}, Maria Fernanda Rios Grassi ^{1,2}, Fred Luciano Neves Santos ¹, Geraldo Gileno de Sá Oliveira ¹, Carlos Gustavo Regis da Silva ¹.

1- INSTITUTO GONÇALO MONIZ - FIOCRUZ BAHIA

R. Waldemar Falcão, 121 - Candeal, Salvador - BA, 40296-710

2- ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

R. Silveira Martins, 100 - Cabula, Salvador - BA, 41150-100

RESUMO

A infecção pelo vírus da dengue (DENV) representa um sério desafio para a saúde pública. Nos países tropicais e subtropicais, aproximadamente 3 bilhões de indivíduos estão em situação de vulnerabilidade à infecção pelo DENV. Ainda são necessárias ferramentas para auxiliar para melhor entender a biologia do DENV. Estratégias para a detecção de células infectadas *in vitro* com o DENV estão disponíveis. Entretanto, há limitações em sua utilização. Portanto, o objetivo deste trabalho é gerar uma construção plasmidial capaz de detectar o vírus da Dengue quando transfectada em células Vero. Para isso, uma construção correspondente a fita inversa e complementar (fita negativa) contendo a região 5' não traduzida, parte da sequência codificante, gene da proteína fluorescente verde e a região 3' não traduzida foram clonadas no plasmídeo pcDNA3.1 myc/his. Esse plasmídeo foi inserido por transfecção em células Vero. Após o processo de seleção, as células foram infectadas com DENV2 e não apresentaram fluorescência. Há pouco conhecimento sobre a replicação da fita negativa do DENV2, e algum elemento não descrito pode ser necessário para a permitir o funcionamento dessa construção plasmidial. O sistema de seleção por antibiótico também pode ter impactado na produção de proteína e, conseqüentemente, na construção plasmidial.

PALAVRAS-CHAVE

Dengue, enhanced green fluorescent protein (EGFP), Negative-Sense RNA Viruses.

PATROCÍNIOS

Instituto Gonçalo Moniz - IGM Fiocruz

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB

INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da dengue (DENV) é um grave problema de saúde pública. Em países tropicais e subtropicais, estima-se que cerca de 3 bilhões de pessoas vivem sob risco de serem infectadas pelo DENV (1). Recentemente, durante a pandemia em 2020, houve um aumento no número de casos de dengue, sendo considerado um vírus de importância pública que perdeu apenas para o COVID-19 em relação ao número de casos (2). Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO), o Brasil apresentou o maior número de casos na América em 2023, com 1.515.460 casos, sendo 654 casos graves, considerada assim uma endemia no país (3).

O vírus possui 4 sorotipos (DENV 1-4) e sua transmissão ocorre pela picada do mosquito vetor infectado, que se reproduz em lugares úmidos com água parada, muitas vezes presente em locais residenciais. Esse vírus se restringe apenas aos primatas na sua gama de hospedeiros vertebrados até então confirmados (4). Essa infecção pode causar desde sintomas febris moderados até doença hemorrágica e síndrome do choque grave, podendo levar à morte (5). A doença pode ser classificada em 3 estágios (febre hemorrágica de dengue, febre de dengue e febre não diferenciada) e sua taxa de mortalidade pode chegar até 20% (6).

Em 2023, a vacina (Qdenga) foi aprovada pela ANVISA para uso contra o DENV, entretanto ela ainda não está disponível no SUS, apenas nos sistema privado de saúde. Ela possui proteção contra os 4 sorotipos e é indicada para crianças acima de 4 anos e adultos até 60 (7). No Brasil, não há tratamento com antivirais disponíveis e poucos indivíduos têm acesso ao diagnóstico laboratorial. Assim, o principal método de controle para prevenção das infecções pela dengue é o controle da população de mosquitos transmissores, através da remoção de criadouros no domicílio ou no peridomicílio ou utilização inseticida ou repetentes (8). Portanto, ainda se fazem necessárias ferramentas que possam auxiliar no desenvolvimento tecnológico para o combate ao DENV.

Esse tipo de vírus apresenta capsídeo em formato esférico, envolvido por uma bicamada lipídica do envelope viral. Seu genoma é constituído de uma molécula de RNA de fita

positiva, 3 proteínas estruturais, que vão gerar o capsídeo, envelope e proteína M do vírus e 7 não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) responsáveis pela replicação viral e outros processos moleculares de importância para a infecção viral (6). Durante o processo de replicação viral, o genoma da fita positiva serve como molde para a produção de uma fita negativa, essa fita negativa é, em seguida, utilizada como molde para a produção de outras fitas positivas que são efetivamente empacotadas nas partículas virais (9).

Alguns trabalhos anteriores mostram plasmídeos que ao serem transfectados em células permitem a identificação da infecção pelo vírus da dengue (10,11,12). Dois sistemas foram utilizados. Em um deles, é produzida uma proteína fluorescente verde (EGFP) quimera ancorada ao retículo endoplasmático que possui um sítio de clivagem para a protease viral seguido de uma sequência de localização nuclear. Após a infecção pelo DENV, a protease viral cliva em seu sítio e a proteína EGFP é translocada para o núcleo da célula (10). No segundo sistema, proteínas fluorescentes (M-Neptune e GFP) são produzidas com um inibidor ligados por um sítio de clivagem da protease viral. Após a infecção há uma separação do inibidor e da proteína fluorescente por ação da protease viral, permitindo a detecção da fluorescência (12). Uma das limitações desses trabalhos é a expressão da fluorescência basal relativamente alta que dificulta a interpretação e uso dessas células, principalmente na citometria de fluxo, além da detecção tardia da infecção. Nosso trabalho envolve o delineamento de estratégias para geração de sistemas onde não haja expressão de fluorescência nas células não infectadas. O presente trabalho visa gerar uma construção plasmidial capaz de detectar especificamente o vírus da dengue quando transfectada em células Vero. Esse tipo de construção pode auxiliar em estudos *in vitro* para triagem de novos compostos antivirais, na titulação viral e em ensaios de neutralização, uma ferramenta importante na avaliação de vacinas.

METODOLOGIA

Material e Métodos

1. Tipo do estudo

Esse estudo é do tipo experimental. Por se tratar de estudo *in vitro* não há necessidade de submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos e à Comissão de Ética no Uso de Animais.

2. Clonagem

A construção dos plasmídeos pcDNA3.1 myc/his contendo a fita negativa (não traduzida) envolve algumas reações de PCR e clonagens:

Uma sequência de DNA foi sintetizada contendo a região 5' e 3' do vírus da dengue 2 e uma parte da região traduzida correspondente à proteína do capsídeo, nomeada FN-DENV2. Essa sequência foi clonada pelo fabricante no plasmídeo pUC57-kan. Esse plasmídeo não era compatível com as enzimas de restrição que utilizamos, por isso seria necessário transferir para outro plasmídeo. Nesse caso, o escolhido foi o pCR2.1. Nessa clonagem, os plasmídeos pCR2.1 e pUC57-kan-FN-DENV2 foram digeridos com as enzimas *Bam* HI e *Xba* I (Thermo Fisher). Os produtos de digestão foram resolvidos em gel de agarose 1%, as bandas cortadas do gel e purificadas utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA). O plasmídeo pCR 2.1 e o inserto FN-Denv2 foram ligados utilizando T4 DNA ligase (Thermo Fisher). O produto de ligação foi transformado em bactérias quimiocompetentes *E. coli* TOP10 e clones foram selecionados para crescimento e purificação dos plasmídeos por miniprep (13). Os clones purificados foram novamente digeridos com as enzimas *Bam* HI e *Xba* I (Thermo Fisher) para confirmar a clonagem. Todos os procedimentos envolvendo enzimas e kits foram realizados segundo as instruções dos fabricantes.

Para as reações de PCR foi utilizada a enzima Platinum Taq Hi-Fi polymerase (Thermo Fisher) segundo as instruções do fabricante. Em uma PCR foram utilizados iniciadores para amplificação do gene GFP e foi utilizado o plasmídeo pEGIP como molde. O produto de PCR foi clonado no sítio de *Eco* RV (Thermo Fisher) gerando o plasmídeo pCR2.1-EGFP.

Os plasmídeos pCR2.1-FN-DENV2 e pCR2.1-EGFP foram digeridos com as enzimas *Nde* I e *Not* I (Thermo Fisher) segundo recomendações do fabricante. Os produtos de digestão foram resolvidos em gel de agarose 1%, as bandas cortadas do gel e purificadas utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA). O plasmídeo pCR2.1-FN-DENV2 e o inserto EGFP foram ligados utilizando T4 DNA ligase (Thermo Fisher). O produto de ligação foi transformado em bactérias quimiocompetentes *E. coli* TOP10 e clones foram selecionados para crescimento e purificação dos plasmídeos por miniprep (13). Os clones purificados foram novamente digeridos com as enzimas *Nde* I e *Not* I (Thermo Fisher) para confirmar a clonagem. Todos os procedimentos envolvendo enzimas e kits foram realizados segundo as instruções dos fabricantes. Esse plasmídeo foi identificado como pCR2.1-FN-DENV2-EGFP.

Por fim, os plasmídeos pcDNA3.1 myc/his e pCR2.1-FN-DENV2-EGFP foram digeridos com as enzimas *Bam* HI e *Xba* I (Thermo Fisher) segundo recomendações do fabricante. Os produtos de digestão foram resolvidos em gel de agarose 1%, as bandas recortadas do gel e purificadas utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA). O plasmídeo pcDNA3.1 myc/his e o inserto FN-DENV2-EGFP foram ligados utilizando T4 DNA ligase (Thermo Fisher). O produto de ligação foi transformado em bactérias quimiocompetentes *E. coli* TOP10 e clones foram selecionados para crescimento e purificação dos plasmídeos por miniprep (13). Os clones purificados foram novamente digeridos com as enzimas *Bam* HI e *Xba* I (Thermo Fisher) para confirmar a clonagem. Todos os procedimentos envolvendo enzimas e kits foram realizados segundo as instruções dos fabricantes. Esse plasmídeo foi identificado como pcDNA3.1-FN-DENV2-EGFP e foi sequenciado para a plataforma tecnológica da Fiocruz.

3. Cultura de células Vero

Células epiteliais de rim isoladas de um macaco verde africano (células Vero) foram cultivadas aderidas a garrafas de cultura em meio D-MEM “high glicose” (Sigma Aldrich), 10 % de soro fetal bovino e antibióticos (100 ug/mL de estreptomicina e 100 unidades/mL de penicilina, Thermo Fischer). Para passagem das células para novo meio, as células foram lavadas com PBS 1x e tratadas com 0,05% tripsina/EDTA (Thermo Fischer). Em seguida, as células foram diluídas (1/5) em meio novo. As células foram mantidas em incubadora a 37 °C e 5 % de gás carbônico (CO₂).

4. Cultura de células C6/36

Células de mosquito *Aedes albopictus* C6/36 foram cultivadas aderidas a garrafas de cultura em meio L15 (Leibovitz), 5 % de soro fetal bovino, 5 % de caldo triptose fosfato e antibióticos (100 ug/mL de estreptomicina e 100 unidades/mL de penicilina, Thermo Fischer). Para passagem das células para novo meio, as células foram lavadas com PBS 1x e tratadas com 0,05% tripsina/EDTA. Em seguida, as células foram diluídas (1/5) em meio novo. As células foram mantidas em incubadora a 28 °C.

5. Propagação do DENV 2

DENV 2 foi produzido em células C6/36. Brevemente, vírus obtidos do extrato de camundongos foram diluídos em meio L15 na proporção 1 : 1. As células em crescimento exponencial (com confluência de 80%) foram lavadas e incubadas com o vírus. As placas foram mantidas por 1 hora com agitação a cada 15 minutos a 28 °C. No final foi adicionado, meio L15, 2% de soro fetal bovino e 5 % de caldo triptose fosfato. Após 10 dias, os vírus foram coletados após centrifugação a 4.000 xg, distribuídos em tubos criogênicos e congelados a - 80 °C para posterior uso.

6. Transfecção por eletroporação

Para modificação permanente, os plasmídeos pcDNA3.1-FN-DENV2-EGFP, pcDNA3.1, pEGFP-C3 foram transfectados em células Vero por eletroporação. Brevemente, células Vero cultivadas em garrafas de 75 cm³ foram lavadas com PBS 1x e tratadas com 0,05%

tripsina/EDTA. Em seguida, as células foram removidas, centrifugadas a 200 xg por 5 minutos e lavadas uma vez com meio RPMI. As células foram ajustadas para a concentração de 1×10^6 células/mL. O volume de 100 uL dessa células foi colocada na cubeta de eletroporação com 5 ug de cada um dos DNA plasmídeos. O aparelho de eletroporação foi ajustado para 300 V e 500 uF e foi dado um único pulso de choque elétrico. Após isso, as células foram diluídas em meio D-MEM “high glicose”, 10 % de soro fetal bovino e antibióticos (100 ug/mL de estreptomicina e 100 unidades/mL de penicilina). As células foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% CO₂. As células modificadas foram selecionadas em meio contendo o antibiótico G418 1 mg/mL (o plasmídeo pcDNA 3.1 A myc/his contém um gene de resistência para esse antibiótico). As células foram examinadas por microscopia em diferentes tempos.

7. Infecção com DENV 2

Células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1-FN-DENV2-EGFP foram distribuídas na quantidade de $1,5 \times 10^5$ por poço em uma placa de 24 poços em meio D-MEM “high glicose”, 10 % de soro fetal bovino e antibióticos (100 ug/mL de estreptomicina e 100 unidades/mL de penicilina). Após 6 horas, o meio foi removido e as células lavadas com PBS 10 x. DENV propagados em células C6/36 foram incubados por 1 hora em estufa a 37 °C e 5% CO₂, e foram homogeneizados a cada 15 minutos. Após 1 hora, adicionou-se meio D-MEM “high glicose”, 2 % de soro fetal bovino e antibióticos (100 ug/mL de estreptomicina e 100 unidades/mL de penicilina). As células foram observadas após 24 horas em microscópio invertido de fluorescência DMI8 (Leica microsystems).

RESULTADOS

Construção do plasmídeo

Referente a clonagem para a produção do plasmídeo, todas as etapas foram bem sucedidas. No final produzimos o plasmídeo pcDNA3.1-FN-DENV2-EGFP. Dois clones foram selecionados para obtenção do plasmídeo. Todos os clones foram confirmados como positivos pois apresentavam a banda de correspondente ao plasmídeo (aproximadamente 5,4 kb) e ao inserto (aproximadamente 1,8 kb) (Figura 1).

A transfecção do plasmídeo pcDNA3.1-FN-DENV2-EGFP em células Vero não produz fluorescência

A primeira transfecção em células Vero, quando examinada ao microscópio indica que não há expressão de EGFP nas células infectadas com o plasmídeo pcDNA3.1-FN-DENV2-EGFP (Figura 2B). Assim, foi checada a primeira etapa do sistema que corresponde a ausência de fluorescência na ausência de infecção.

A transfecção do plasmídeo pcDNA3.1-FN-DENV2-EGFP em células Vero não produz fluorescência após infecção com DENV 2

Células Vero transfectadas com os plasmídeos pcDNA3.1-FN-DENV2-EGFP e pEGFP-C3 foram selecionadas com antibiótico Gentamicina 1mg/mL por 16 dias. A célula Vero transfectada e selecionada com o plasmídeo pcDNA3.1-FN-DENV2-EGFP não produz fluorescência após a infecção (Figura 3, B). As células Vero transfectadas e selecionadas com o plasmídeo pEGFP-C3 apresentaram uma diminuição no número de células e uma diminuição na intensidade da fluorescência.

DISCUSSÃO

Apesar do desenvolvimento científico no campo das arboviroses, ainda são necessárias ferramentas para auxiliar em áreas estratégicas do combate à infecção pelo vírus da Dengue. Neste trabalho, examinamos a possibilidade da replicação da fita negativa do RNA viral ser utilizada para uma construção plasmidial que permita a identificação da infecção pelo vírus da Dengue através da produção de fluorescência. Entretanto, nas condições testadas essa construção não se mostrou eficiente. Alguns fatores podem ter contribuído para isso: primeiro, não há, na literatura, uma descrição dos elementos necessários para replicação da fita negativa do vírus e essa construção foi feita considerando os fatores utilizados para a replicação da fita positiva. Segundo, a construção no plasmídeo pcDNA3.1 myc/his A e o sistema de seleção utilizado podem ter afetado a expressão da fita negativa.

A replicação da fita positiva envolve elementos proteicos e elementos nas regiões 5' e 3' não traduzidas do RNA genômico, 3'UTR e 5'UTR respectivamente. A proteína NS5 é uma enzima capaz de sintetizar RNA utilizando como molde moléculas de RNA é responsável por sintetizar a fita negativa de RNA a partir de uma fita positiva (14). Em seguida, novas fitas positivas são produzidas a partir dessas fitas negativas também por ação de NS5. A proteína NS3 também é importante pois possui atividade de helicase necessária para separar as fitas de RNA durante o processo de replicação (15). NS1 desempenha papel essencial e auxilia na montagem do complexo de replicação (16). NS2A é um outro componente do complexo de replicação cuja função exata é pouco conhecida (17). E NS4A regula a atividade de helicase NS3 (18). Em nosso sistema todos os elementos proteicos estão presentes devido processo de infecção da célula. No RNA viral, a formação de estruturas em “loop” ocorre nas regiões 5'UTR e 3'UTR. Na região 5'UTR, o primeiro “loop” identificado como SLA funciona como o promotor da replicação e onde se liga NS5 (19). Além disso, há sequência nessas regiões responsável pela ciclização não covalente do RNA viral, um processo importante durante o processo de replicação viral. Todos esses elementos do RNA viral foram incluídos em nossa construção. Entretanto, não há informações sobre outros elementos que possam ser

importantes especificamente para a replicação da fita negativa. A criação de ferramentas para estudo da replicação da fita negativa pode ser essencial para identificação mais precisa desses elementos.

Os plasmídeos pcDNA3.1 e pEGFP-C3 possuem o gene de resistência ao antibiótico neomicina, utilizado para a seleção das células transfectadas. A gentamicina, o antibiótico usado, age inibindo a síntese proteica e pode ter afetado a produção da fita negativa da nossa construção plasmidial. A interferência na síntese proteica, pode ser monitorada pelo controle de transfecção com o plasmídeo pEGFP-C3. Após 16 dias de seleção com a gentamicina na concentração de 1 mg/mL, as células apresentaram uma diminuição na intensidade de fluorescência e, também, uma diminuição do número de células fluorescentes. Dessa forma, o método de seleção utilizado pode ter interferido diretamente na produção dos RNAs de fita negativa assim como influenciou na síntese da proteína fluorescente. Uma possível troca no plasmídeo contendo um gene de resistência a um antibiótico que não interfira na síntese protéica, seria uma perspectiva para o trabalho apresentado. Além disso, a exposição prolongada das células pode ter sido um fator importante e interferido no seu metabolismo e assim uma seleção de menos dias também poderia ser mais adequada.

O desenvolvimento de ferramentas para teste de novas substâncias com efeito antiviral, pesquisas clínicas com vacinas e diagnóstico é ainda necessário para implementação de estratégias de combate ao DENV2. O estudo da replicação da fita negativa do DENV possui lacunas de conhecimento que precisam ser resolvidas para que os mecanismos de replicação viral possam ser utilizados no desenvolvimento de uma construção plasmidial adequada. Uma vez superadas as dificuldades encontradas, esse plasmídeo poderia ser utilizado para modificar permanentemente células Vero para esse fim. Em testes de compostos antivirais e na avaliação de anticorpos neutralizantes, essas células podem ser infectadas com o vírus e quantificadas por citometria de fluxo. Dessa forma, esses ensaios poderiam ser feitos de forma mais rápida, em maior escala e com menos erros na interpretação dos resultados.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos os colaboradores dos laboratórios LASP e LAPEM da Fiocruz Bahia. Agradecemos as Plataformas Tecnológicas da Fundação Oswaldo Cruz pelo acesso ao microscópio e pelas imagens.

CONFLITO DE INTERESSES

Não houve conflito de interesses.

CONTRIBUIÇÃO DO AUTOR

LMFS - realização e planejamento de experimentos, análise de resultados e escrita do artigo.

MFRG - planejamento de experimentos e análise de resultados.

GGSO - planejamento de experimentos e análise de resultados.

FLNS - planejamento de experimentos e análise de resultados.

CGRS - realização e planejamento de experimentos, análise de resultados e escrita do artigo.

REFERÊNCIAS

1. Bhatt, S., Gething, P., Brady, O. *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496, 504–507 (7 de abril de 2013; c). <https://doi.org/10.1038/nature12060>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature12060#citeas>
2. Who.int/. World Health Organization. (2021). Dengue and severe dengue. [Atualizado em 17 de março de 2023; citado em 30 de setembro de 2023]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
3. Pan American Health Organization / World Health Organization. Epidemiological Update: Dengue, chikungunya and Zika. 10 June 2023. Washington, D.C. PAHO/WHO; 2023. Disponível em: <https://opendata.paho.org/en> .
4. Chen R, Vasilakis N. Dengue--quo tu et quo vadis? *Viruses*. 2011 Sep;3(9):1562-608. doi: 10.3390/v3091562. Epub 2011 Sep 1. PMID: 21994796; PMCID: PMC3187692.
5. Wiemer D, Frickmann H, Krüger A. Denguefieber : Klinik, Epidemiologie, Entomologie, Erregerdiagnostik und Prävention [Dengue fever : Symptoms, epidemiology, entomology, pathogen diagnosis and prevention]. *Hautarzt*. 2017 Dec;68(12):1011-1020. German. doi: 10.1007/s00105-017-4073-6. PMID: 29147722; PMCID: PMC7096031.
6. Harapan H, Michie A, Sasmono RT, Imrie A. Dengue: A Minireview. *Viruses*. 2020 Jul 30;12(8):829. doi: 10.3390/v12080829. PMID: 32751561; PMCID: PMC7472303.
7. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa [Internet]. Anvisa aprova nova vacina contra a dengue; 2 mar 2023 [atualizado em: 16 de março de 2023; citado 30 out 2023]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2023/anvisa-aprova-nova-vacina-para-a-dengue>
8. Ministério da Saúde [Internet]. Dengue; [citado 30 out 2023]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dengue>

9. Zanotto PMA, Leite LCC. The Challenges Imposed by Dengue, Zika, and Chikungunya to Brazil. *Front Immunol.* 2018 Aug 28;9:1964. doi: 10.3389/fimmu.2018.01964. PMID: 30210503; PMCID: PMC6121005.
10. McFadden MJ, Mitchell-Dick A, Vazquez C, Roder AE, Labagnara KF, McMahon JJ, Silver DL, Horner SM. A Fluorescent Cell-Based System for Imaging Zika Virus Infection in Real-Time. *Viruses.* 2018 Feb 24;10(2):95. doi: 10.3390/v10020095. PMID: 29495257; PMCID: PMC5850402.
11. Medin CL, Valois S, Patkar CG, Rothman AL. A plasmid-based reporter system for live cell imaging of dengue virus infected cells. *J Virol Methods.* 2015 Jan;211:55-62. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.10.010. Epub 2014 Oct 28. PMID: 25445884; PMCID: PMC4342618.
12. Arias-Arias JL, MacPherson DJ, Hill ME, Hardy JA, Mora-Rodríguez R. A fluorescence-activatable reporter of flavivirus NS2B-NS3 protease activity enables live imaging of infection in single cells and viral plaques. *J Biol Chem.* 2020 Feb 21;295(8):2212-2226. doi: 10.1074/jbc.RA119.011319. Epub 2020 Jan 9. PMID: 31919100; PMCID: PMC7039541.
13. Sambrook, Joseph. *Molecular Cloning. Capítulo 1.* United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1987. 2nd ed.
14. Benarroch D, Selisko B, Locatelli GA, Maga G, Romette JL, Canard B. The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue virus protein NS3 are Mg²⁺-dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core. *Virology.* 2004 Oct 25;328(2):208-18. doi: 10.1016/j.virol.2004.07.004. PMID: 15464841.
15. Yon C, Teramoto T, Mueller N, Phelan J, Ganesh VK, Murthy KH, Padmanabhan R. Modulation of the nucleoside triphosphatase/RNA helicase and 5'-RNA triphosphatase activities of Dengue virus type 2 nonstructural protein 3 (NS3) by interaction with NS5,

the RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem.* 2005 Jul 22;280(29):27412-9. doi: 10.1074/jbc.M501393200. Epub 2005 May 24. PMID: 15917225.

- 16.** Youn S, Li T, McCune BT, Edeling MA, Fremont DH, Cristea IM, Diamond MS. Evidence for a genetic and physical interaction between nonstructural proteins NS1 and NS4B that modulates replication of West Nile virus. *J Virol.* 2012 Jul;86(13):7360-71. doi: 10.1128/JVI.00157-12. Epub 2012 May 2. PMID: 22553322; PMCID: PMC3416313.
- 17.** Xie X, Zou J, Puttikhunt C, Yuan Z, Shi PY. Two distinct sets of NS2A molecules are responsible for dengue virus RNA synthesis and virion assembly. *J Virol.* 2015 Jan 15;89(2):1298-313. doi: 10.1128/JVI.02882-14. Epub 2014 Nov 12. PMID: 25392211; PMCID: PMC4300643.
- 18.** Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol.* 2006 Sep;87(Pt 9):2605-2614. doi: 10.1099/vir.0.81844-0. PMID: 16894199.
- 19.** Liu ZY, Qin CF. Structure and function of cis-acting RNA elements of flavivirus. *Rev Med Virol.* 2020 Jan;30(1):e2092. doi: 10.1002/rmv.2092. Epub 2019 Nov 28. PMID: 31777997.

FIGURAS

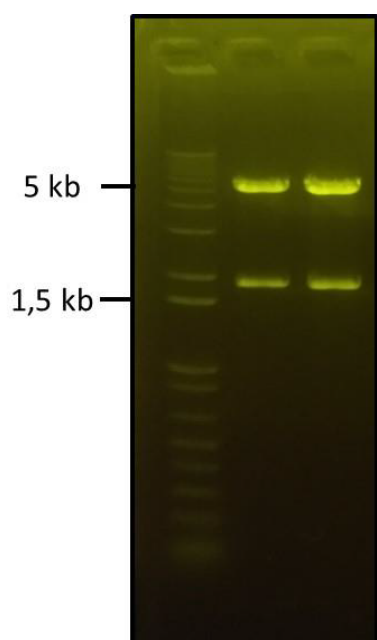


Figura 1 - Digestão dos plasmídeos pcDNA3.1-FN-DENV2-EGFP. As amostras foram resolvidas em gel de agarose 1%.

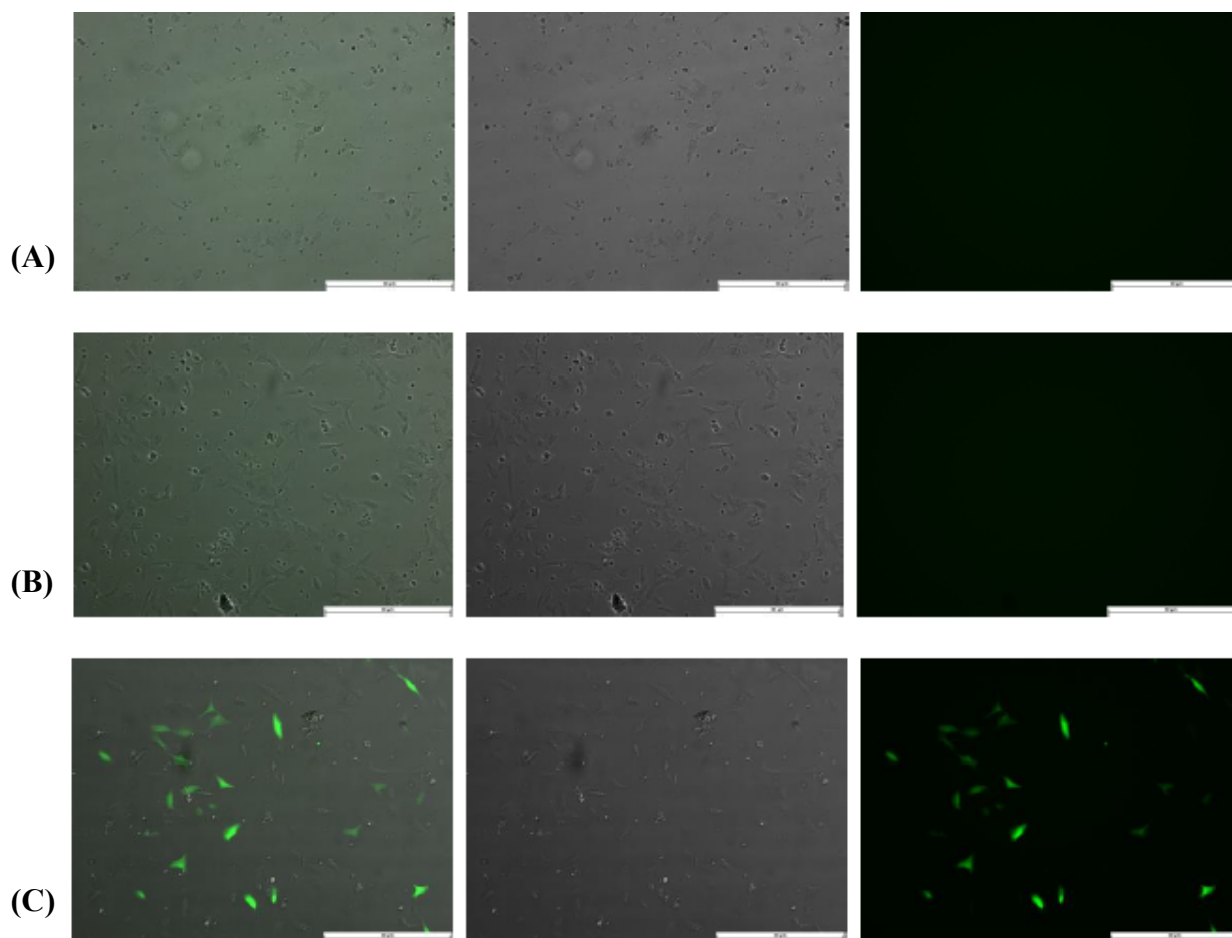


Figura 2 – Transfecção de células Vero. (A) Células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1; (B) Células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1-FN-DENV2-EGFP; (C) Células transfectadas com o plasmídeo pEGFP-C3.

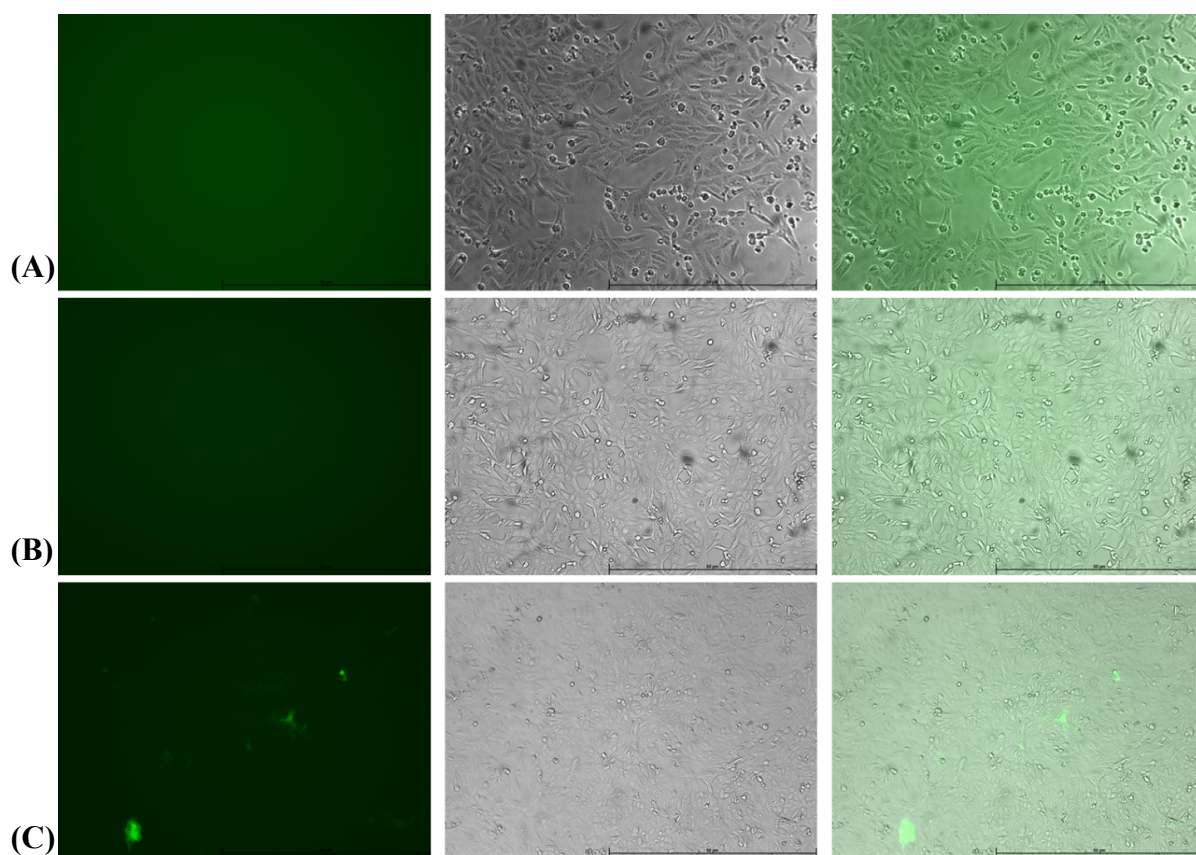


Figura 3- Infecção de células Vero transfectadas. (A) Células transfectadas com plasmídeo pcDNA3.1-FN-DENV2-EGFP sem vírus. (B) Células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1-FN-DENV2-EGFP infectadas com DENV2; (C) Células transfectadas com o plasmídeo pEGFP-C3.

2. Regras da revista

Revista: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Regras para Submissão:

Todos os manuscritos deverão conter, além do título e do resumo, detalhes completos dos autores e instituições, agradecimentos por qualquer assistência técnica ou financeira, bem como indicar quaisquer conflitos de interesse. Este formato de texto flexível será utilizado para a análise inicial e revisão por pares.

O manuscrito deverá ser elaborado em software padrão de processamento de texto e deverá ser impresso (fonte 12) em espaço duplo em todo o texto, legendas de figuras e referências, com margens de no mínimo 3 cm. As figuras deverão vir na extensão tiff, com resolução mínima de 300 dpi. As tabelas e legendas das figuras deverão ser apresentadas todas juntas em um único arquivo. As figuras devem ser carregadas separadamente como arquivo suplementar.

Título : com até 250 caracteres

Nomes dos autores : sem títulos ou graduações

Afiliações institucionais : endereço completo de todos os autores

Resumos: Forneça um resumo de até 200 palavras. Os resumos dos artigos de pesquisa devem ser estruturados em 5 seções como segue: FUNDAMENTOS, OBJETIVOS, MÉTODOS, RESULTADOS e PRINCIPAIS CONCLUSÕES, cada seção abordando respectivamente o problema, o objetivo do estudo, a principal abordagem metodológica, os achados mais importantes e as conclusões do estudo. o estudo.

Palavras-chave : 3-6 itens devem ser fornecidos. Devem ser usados termos da lista Medical Subject Headings (Mesh) do Index Medicus.

Patrocínios : indicar as fontes de apoio financeiro.

Introdução : deve definir o objetivo do estudo, fornecer um breve resumo (não uma revisão) de trabalhos anteriores relevantes e indicar quais novos avanços foram feitos na investigação. Não deve incluir dados ou conclusões do trabalho que está sendo relatado.

Materiais e Métodos: devem fornecer informações completas e claras para permitir que o estudo seja repetido por outros. As técnicas padrão precisam apenas ser referenciadas. Entretanto, se uma modificação tiver sido feita em um protocolo padrão, ela deverá ser claramente descrita.

Ética: Caso o trabalho de investigação utilize recursos naturais (plantas, microrganismos, amostras de biodiversidade) os autores devem fornecer uma declaração de que o trabalho de investigação está em conformidade com os regulamentos nacionais sobre este assunto.

Resultados: devem ser um relato conciso das novas informações descobertas, com o mínimo de julgamento pessoal. Não repetir no texto dados já descritos em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve enfatizar a relevância das novas informações e relacionar as novas descobertas com o conhecimento existente. Somente citações inevitáveis devem ser incluídas.

Agradecimentos: devem listar e dar crédito total a todos aqueles (exceto os autores) que ajudaram na realização do trabalho de pesquisa (incluindo as organizações financiadoras).

Conflito de interesses: os autores devem divulgar qualquer conflito de interesses relacionado ao seu trabalho de pesquisa.

Contribuição do autor: indicar a contribuição de cada autor para o trabalho de pesquisa.

Figuras: apresentadas em formato tiff com mínimo de 300 dpi. As fotografias devem ser bem focadas, bem contrastadas e, se montadas em placa, as figuras devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos. A ampliação deve ser indicada por uma linha ou barra na figura e referenciada, se necessário, na legenda (por exemplo, barra = 1 mm). As placas e figuras de linha devem caber em uma coluna (8 cm) ou em toda a largura (16,5 cm) da página e devem ser menores que o comprimento da página para permitir a inclusão da legenda. As letras e os números nas figuras devem ter tamanho legível após redução ou impressão. Uma fotografia colorida ou ilustração relacionada é utilizada nas redes sociais da Revista (Twitter, Instagram e Facebook) para breve informação sobre o conteúdo dos artigos aceitos. Os autores são convidados a enviar ilustrações com legendas de seu manuscrito para divulgação nas redes sociais.

Tabelas: devem complementar, e não duplicar, o texto e devem ser numeradas com algarismos romanos. Um breve título descritivo deve aparecer acima de cada tabela, com quaisquer explicações ou notas de rodapé (identificadas com a, b, c, etc.) abaixo.

Material suplementar: refere-se aos arquivos que os autores fornecem para publicação junto com seu artigo. Geralmente devem ser peças adicionais ao artigo que não puderam ser incluídas no fascículo, como apêndices, planilhas, tabelas, figuras impossíveis de produzir dentro do artigo. Esses arquivos serão enviados aos revisores para revisão por pares, juntamente com os arquivos principais do artigo.

Recomendamos que os arquivos Suplementares estejam no seguinte formato:

- Excel ou qualquer planilha devem ser carregados em formato PDF ou fornecer link para acesso aos arquivos
- Figuras suplementares com cinco ou mais peças favor fornecer um arquivo PDF com o máximo de figuras possível.

Recomendamos fornecer arquivos de tamanho pequeno para download rápido.

REGRAS REFERÊNCIAS

Deve ser preciso. Somente citações que aparecem no texto devem ser referenciadas. Artigos em Preprint Servers só podem ser citados se for fornecido um DOI.

Artigos não publicados, a menos que sejam aceitos para publicação, não devem ser citados. O trabalho aceito para publicação deve ser referido como “no prelo” e o link do periódico para o manuscrito aceito ou uma carta de aceitação do periódico deve ser fornecido. Dados não publicados somente deverão ser citados no texto como “observações não publicadas”, devendo ser fornecida uma carta de autorização do autor. As referências ao final do artigo deverão ser listadas em ordem numérica e na mesma ordem em que são citadas no texto.

Para garantir que suas referências sejam publicadas conforme solicitado, envie arquivos sem Mendeley Hyperlink ou similar. Referências criadas com marcas de edição causarão correções inadequadas durante o processo de edição, causando atrasos.

O TÍTULO DAS REVISTAS

Deve ser abreviado de acordo com o NLM Title Abbreviation for Journals atualmente indexado no MEDLINE. Para obter detalhes, visite <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog?term=currentyindexed>

CITAÇÕES NO TEXTO

Um número é atribuído a uma fonte na ordem em que ela é citada no texto. Se a fonte for referida novamente, o mesmo número será usado.

Use algarismos arábicos sobrescritos (1,2,3,4,5,6,7,8,9) dentro de colchetes curvos.

Liste cada número de referência separado por vírgula ou por travessão para uma sequência de números consecutivos. Não deve haver espaços entre vírgulas ou travessões. Ex.: (1,3,6-8).

A citação no texto é colocada imediatamente após o texto, que se refere à fonte citada.

Ex.: Estas observações foram consistentes com aquelas feitas na Venezuela, no Brasil e na Guiana Britânica. (1-4)

O nome do autor também pode ser incluído no texto.

Ex.: O método de quantificação da viabilidade dos ovos foi adaptado de Farnesi et al. (1)

NO FINAL DO PAPEL USE OS SEGUINTE ESTILOS

Artigo de revista

Chagas C, Villela E. Forma cardíaca da tripanossomiase americana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1922; 14(1): 05-61.

Livro e Tese

Forattini OP. Entomologia médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmaniose, Bartonelose. Vol. 4. São Paulo: Edgard Blucher; 1973. 658 pp

Morel CM. Genes e antígenos de parasitas. Um manual de laboratório. 2ª edição. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1983. xxii + 580 pp.

Mello-Silva CC. Controle alternativo e alterações fisiológicas em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 pela ação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* NEB (Euphorbiaceae) [Tese de doutorado]. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2005. 85 pp.

Capítulo do livro

Cruz OG. A profilaxia da malária no centro e sul do Brasil. In : Ross R, A prevenção da malária. Londres: John Murray; 1911. 390-8.

Artigo de revista na Internet

Abood S. Iniciativa de melhoria da qualidade em lares de idosos: a ANA desempenha um papel consultivo. *Sou J Nurs* [Internet]. 2002 [citado em 12 de agosto de 2002]; 102(6). Disponível em: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>.

Monografia na Internet

Foley KM, Gelband H, editores. Melhorando os cuidados paliativos para o câncer [monografia] [Internet]. Washington: Imprensa da Academia Nacional; 2001 [citado em 9 de julho de 2002]. Disponível em: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

Página inicial/site

Cancer-Pain.org [página inicial na Internet]. Nova York: Associação de Recursos Online do Câncer, Inc.; c2000-01 [atualizado em 16 de maio de 2002; citado em 9 de julho de 2002]. Disponível em: <http://www.cancer-pain.org/>.

Parte de uma página inicial/site

da American Medical Association [página inicial na Internet]. Chicago: A Associação; c1995-2002 [atualizado em 23 de agosto de 2001; citado em 12 de agosto de 2002]. Escritório de ligação de prática de grupo da AMA; [cerca de 2 telas]. Disponível em: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>.

BANCO DE DADOS NA INTERNET

Banco de dados aberto

Who's Certified [banco de dados na Internet]. Evanston (IL): O Conselho Americano de Especialistas Médicos. c2000 - [citado em 8 de março de 2001]. Disponível em: <http://www.abms.org/newsearch.asp>

Banco de dados fechado

Jablonski S. On-line Síndromes de Anomalia Congênita Múltipla/Retardo Mental (MCA/MR) [Internet]. Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina (EUA). c1999 [atualizado em 20 de novembro de 2001; citado em 12 de agosto de 2002]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html.

Parte de um banco de dados no Internet

MeSH Browser [Internet]. Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina (EUA); 2002. Meta-análise; 2003 [citado em 10 de junho de 2003]; [cerca de 15h]. Disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>.